

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA
ISOFORMA 5-HT5A DEL RECEPTOR DE SEROTONINA EN
HIPOCAMPO DE RATAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

VIOLETA GARCÍA SANTOYO

DIRIGIDA POR

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2012



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA
ISOFORMA 5-HT5A DEL RECEPTOR DE SEROTONINA EN
HIPOCAMPO DE RATAS”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA
VIOLETA GARCÍA SANTOYO**

**DIRIGIDA POR
Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES**

SINODALES

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES _____
DIRECTOR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA _____
SINODAL

Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ _____
SINODAL

Dra. MA. TERESA DE JESÚS GARCÍA GASCA _____
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	
I. ANTECEDENTES	1
I.1. Interacciones moleculares	1
I.2. Señalización	2
I.2.1 Receptores de superficie celular	3
I.2.2. Receptores acoplados a proteínas G	3
I.2.2.1. Activación de los receptores acoplados a proteínas G	7
I.2.2.2. Tipos de ligandos de receptores acoplados a proteínas G	9
I.3. Serotonina	9
I.3.1 Receptores de serotonina	10
I.4. Hipocampo	14
I.5. Hipocampo y receptor de serotonina 5-HT5A	15
I.6. Estudio de la expresión génica	15
I.6.1. PCR tiempo real	16
II. HIPÓTESIS	20
III. OBJETIVOS	21
III.1. General	21
III.2. Específicos	21
IV. METODOLOGÍA	22
IV.1. Materiales	22
IV.1.1. Materiales y equipos	22
IV.1.2. Material biológico	22

IV.1.3. Reactivos y Kits	22
IV.2. Métodos	23
IV.2.1. Extracción y purificación de ARN total utilizando TRIzol®	24
IV.2.2. Determinación de la concentración y pureza de ARN	24
IV.2.3. Tratamiento con DNasa	25
IV.2.4. Síntesis de ADNc	25
IV.2.5. PCR tiempo real	25
IV.2.5.1. Comprobación <i>in silico</i> de la especificidad de los oligonucleótidos	25
IV.2.5.2. Componentes de la reacción	26
IV.2.5.3. Programa de amplificación	26
IV.2.5.4. Diseño experimental	27
IV.2.6. Cuantificación del ARNm	27
IV.2.6.1 Cuantificación absoluta	27
IV.2.6.2 Cuantificación relativa	28
IV.2.6.3 Análisis estadístico	28
V. RESULTADOS	29
V.1. Estandarización de las condiciones de amplificación	29
V.2. Obtención de las curvas estándar	30
V.3. Cuantificaciones absolutas	32
V.4. Cuantificación relativa	34
VI. DISCUSIÓN	36
VII. CONCLUSIONES	41
VIII. REFERENCIAS	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Receptores de superficie celular	4
2.	Receptor acoplado a proteínas G	5
3.	Mecanismo de transducción de receptores acoplados a proteínas G	6
4.	Síntesis de serotonina	11
5.	Regiones del hipocampo	15
6.	Fases de la PCR tiempo real	17
7.	Etapas de la cinética de reacción de la PCR tiempo real	19
8.	Amplificación del fragmento del gen del receptor de serotonina 5- <i>HT5A</i>	29
9.	Amplificación de los fragmentos de los genes de el receptor de serotonina 5- <i>HT5A</i> y <i>actina</i> bajo las mismas condiciones	30
10.	Curva de amplificación de las diluciones del gen del receptor de serotonina 5- <i>HT5A</i> y su regresión lineal	31
11.	Curva de amplificación de las diluciones del gen de <i>actina</i> y su regresión lineal	32
12.	Cuantificación absoluta de la expresión del gen del receptor de serotonina 5- <i>HT5A</i> .	33
13.	Cuantificación absoluta de la expresión del gen de <i>actina</i> .	34
14.	Cuantificación relativa	35
15.	Esquema del posible efecto de la serotonina periférica sobre la regulación del gen del <i>receptor de serotonina 5-HT5A</i> .	40

RESUMEN

La serotonina es un neurotransmisor que regula varios procesos en el organismo, como la ingesta y la memoria, entre otros. Esto lo hace mediante la interacción con sus receptores, los cuales están agrupados en las familias 5-HT1, 5-HT2, 5-HT3, 5-HT4, 5-HT5, 5-HT6 y 5-HT7; así mismo, cada familia de receptores está compuesta por distintas isoformas y cada isoforma está involucrada en la regulación de diferentes procesos. Una de las familias que hasta el momento no se sabe con exactitud qué tipo de procesos controla es la 5-HT5; que cuenta con las isoformas 5-HT5A y 5-HT5B, de las cuales, en humanos, sólo la 5-HT5A es funcional. El receptor 5-HT5A se ha localizado en varias regiones del sistema nervioso central, con un alto nivel de expresión en el hipocampo, donde se ha observado que existe un cambio en los niveles de expresión durante el desarrollo del cerebro; por lo tanto se ha especulado acerca de las distintas funciones de este receptor dependiendo de su localización, tejido específico y respuesta al microambiente celular; por ello, el objetivo de este trabajo fue conocer si existen modificaciones en la expresión del receptor 5-HT5A en el hipocampo de ratas tratadas con serotonina, y verificar la modulación de la expresión del receptor por serotonina, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Los datos mostraron una disminución estadísticamente significativa en los niveles relativos de expresión de ARNm del receptor de serotonina 5HT5A con el tratamiento agudo y un aumento en la transcripción del receptor en los hipocampos sometidos a dosis continuas.

I. ANTECEDENTES

I.1. Interacciones moleculares

Las moléculas se encuentran unidas e interactúan entre sí mediante enlaces covalentes y no covalentes. En los sistemas biológicos, las interacciones no covalentes como los enlaces iónicos, los enlaces de hidrógeno, las atracciones de Van der Waals y las fuerzas hidrofóbicas e hidrofílicas son de gran importancia, ya que permiten que las moléculas interactúen durante tiempos cortos o prolongados, acción que es fundamental en los procesos que integran a los sistemas vivos al desencadenar actividades biológicas (Mathews y Van Holde, 2001; Alberts y col., 2004; Karp, 2007).

Los enlaces iónicos son atracciones electrostáticas entre iones cargados negativamente e iones cargados positivamente; por ejemplo, las interacciones que existen entre una molécula de ADN (carga negativa) y una proteína (carga positiva). Los enlaces de hidrógeno son interacciones polares en las que un átomo de hidrógeno cargado electropositivamente, es parcialmente compartido entre dos átomos cargados electronegativamente; por ejemplo, la doble cadena de ADN está unida por estas interacciones de manera muy estable; sin embargo, también puede separarse y permitir la interacción con otras moléculas. Las atracciones de Van der Waals se presentan porque la nube de electrones que rodea una molécula produce un dipolo oscilante que polariza a una molécula vecina. Este tipo de fuerzas son muy comunes en todas las interacciones biológicas, por ejemplo, entre las uniones antígeno-anticuerpo, donde el contacto entre moléculas es muy cercano. Las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas se presentan en moléculas que pueden o no interactuar con el agua; por ejemplo, los azúcares son moléculas polares solubles en agua, mientras que los esteroides son moléculas apolares insolubles en agua (Alberts y col., 2004; Karp, 2007).

Dentro de los sistemas biológicos, debido al movimiento aleatorio de las moléculas, existen interacciones al azar entre unas y otras. En algunos casos, estas

interacciones son muy débiles y pasajeras, debido a que sus superficies de contacto son poco parecidas; pero cuando las áreas de contacto entre una molécula y otra son afines, existen varias interacciones débiles, volviendo esta unión una interacción estable y específica, por lo tanto puede durar por un tiempo prolongado; tal es el caso de las uniones entre un receptor y su ligando, en las cuales la estabilidad de la interacción es importante para activar cascadas de señalización (Mathews y Van Holde, 2001; Alberts y col., 2004; Karp, 2007).

I.2. Señalización

En los sistemas vivos, la comunicación entre las células se da por medio de diversas moléculas, como aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos, esteroides, retinoides, derivados de ácidos grasos, óxido nítrico y monóxido de carbono; creando así una gran red de contacto a través de señales entre organismos unicelulares, o a través de todo un organismo pluricelular. Para poder pasar el mensaje de una célula a otra, es decir, de una célula señalizadora a una célula receptora o diana, la célula señalizadora libera una molécula llamada ligando que interactúa con la célula diana mediante una proteína llamada receptor (Lodish y col., 2003; Alberts y col., 2004).

Las células que constituyen a un organismo pluricelular se encuentran a distintas distancias una de la otra; sin embargo todas se comunican entre sí. Una de las clasificaciones del tipo de señalización que se presenta entre célula y célula es de acuerdo al origen del ligando con respecto a su receptor. En la señalización autócrina, la célula señalizadora es la célula diana, es decir, el ligando interactúa con el receptor de la célula que lo liberó. La señalización parácrina se presenta cuando el ligando es reconocido por células vecinas a la célula secretora. En la señalización yuxtácrina la molécula señal se encuentra anclada en la membrana e interactúa con el receptor de la célula vecina. En la señalización endócrina, el ligando es secretado a circulación y transportado hacia diferentes células distribuidas por todo el organismo, recorriendo grandes distancias (Lodish y col., 2003; Alberts y col., 2004).

Para que las señales puedan ser reconocidas, es necesario que cada ligando se una a un receptor específico, ya que, así como existen diferentes tipos de ligandos, existen distintos tipos de receptores que, al ser activados, desencadenan diversas vías y mecanismos celulares (Lodish y col., 2003; Alberts y col., 2004).

I.2.1 Receptores de superficie celular

Los receptores de superficie celular se clasifican en tres clases principales de acuerdo al mecanismo de transducción que utilizan (Figura 1). Los receptores asociados a canales iónicos, cuya señalización está mediada por neurotransmisores que abren o cierran los canales, permitiendo así el paso de iones a través de la membrana, lo que se traduce en un cambio de potencial que afecta la actividad de otras proteínas dependientes de voltaje; este mecanismo es utilizado en la señalización sináptica (Alberts y col., 2004; Karp, 2007). Los receptores asociados a actividad enzimática, presentan actividad intrínseca o están acoplados a enzimas; para que el receptor sea funcional, es necesario que dimerice, lo que provoca la fosforilación del mismo en la parte citosólica y de otras proteínas que se encuentran en el citosol; este tipo de receptores participan en la división y diferenciación celular mediante la regulación de la expresión de genes (Lodish y col., 2003; Karp, 2007). Los receptores acoplados a proteínas G, son proteínas que contienen siete hélices alfa transmembranales y están unidas por un dominio citosólico a una proteína trimérica de unión a GTP (proteína G) la cual media la interacción entre el receptor y la proteína diana (Alberts y col., 2004; Karp, 2007).

I.2.2. Receptores acoplados a proteínas G

Los receptores acoplados a proteína G (GPCR) son la familia de receptores más abundantes encontrados en la superficie celular. El extremo amino terminal está en la parte extracelular, las siete alfa hélices atraviesan la membrana y están unidas por asas de diferentes tamaños y el extremo carboxilo terminal se localiza en el citosol. Las tres asas que se encuentran expuestas en la superficie forman el área

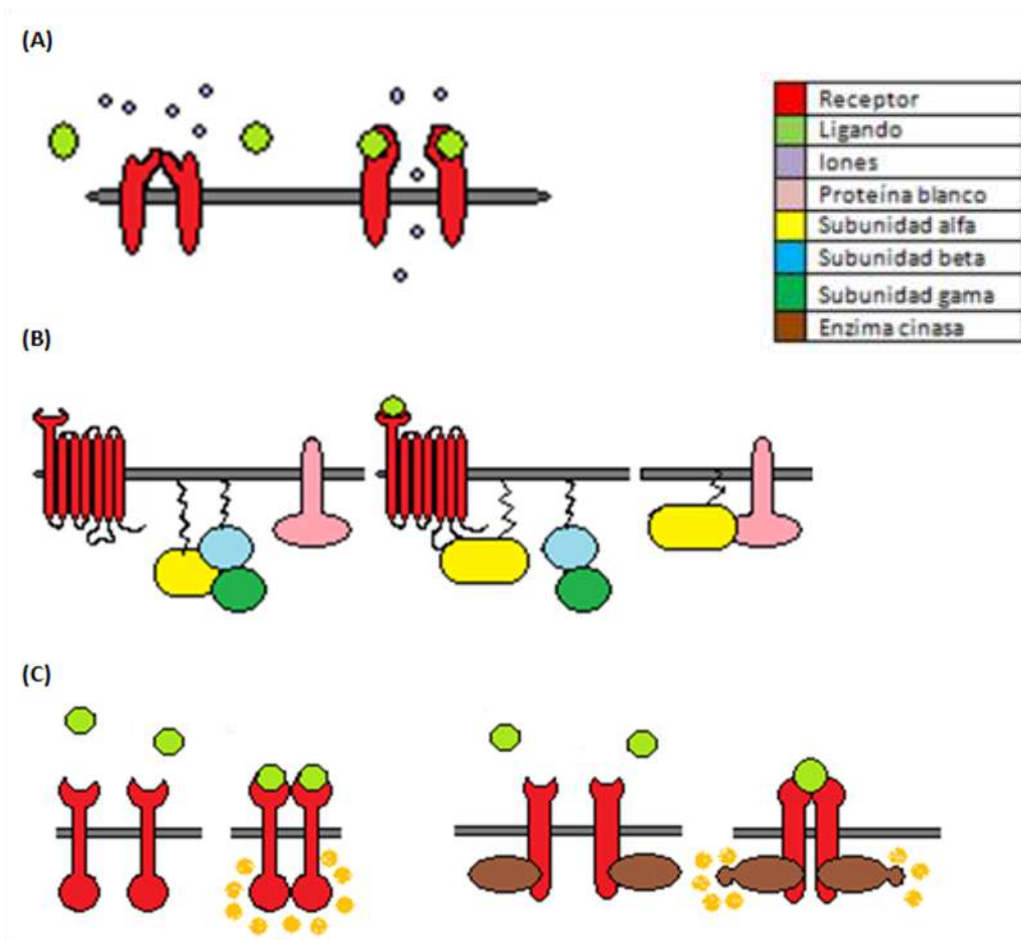


Figura 1. Receptores de superficie celular. De acuerdo al mecanismo de transducción que utilizan, los receptores de la superficie celular se clasifican en tres clases principales, receptores asociados a canales iónicos (A), receptores acoplados a proteínas G (B) y receptores asociados a actividad enzimática (C) (de autoría propia).

de contacto con el ligando (Figura 2), mientras que las asas al interior de la célula sirven de unión para las proteínas G (Lodish y col., 2003; Karp, 2007). Las proteínas G están ancladas a la membrana celular y se conforman de tres subunidades denominadas alfa (α), beta (β) y gama (γ) (Lodish y col., 2003; Alberts y col., 2004; Karp, 2007).

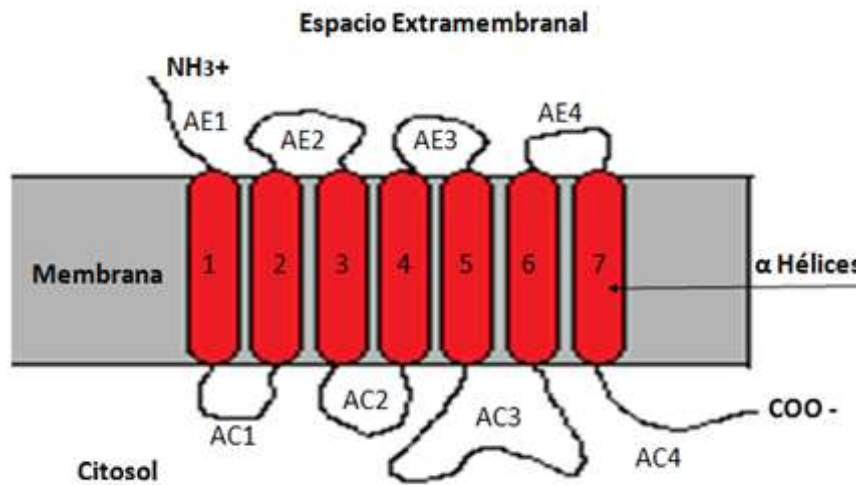


Figura 2. Receptor acoplado a proteínas G (de autoría propia).

Al unirse los ligandos con los GPCR, los receptores sufren un cambio estructural en el sitio de unión al ligando; este cambio es transmitido a través de la membrana y provoca que las asas citosólicas cambien de conformación, lo que permite que una proteína G se una al receptor; esta interacción induce un cambio en la subunidad α de la proteína G, lo que le permite liberar GDP y unirse a GTP; cuando la subunidad α se encuentra unida con el GTP, ésta vuelve a cambiar de conformación, lo que provoca la disociación de la subunidad α del complejo β - γ . Una vez separada del complejo (Figura 3), la subunidad α puede interactuar y activar la proteína diana (Lodish y col., 2003; Alberts y col., 2004; Karp, 2007). En algunos casos, el complejo β - γ es el que interacciona con la proteína efectora (Lodish y col., 2003; Alberts y col., 2004).

Mientras el receptor esté activo, puede interaccionar y activar varias proteínas G. Para terminar con la respuesta a la señal, y evitar una actividad excesiva, es necesario que todo el mecanismo regrese a su conformación basal o inactiva. Para desensibilizar el receptor a la señal es necesaria la fosforilación del dominio citoplasmático del receptor; esta acción la ejerce la cinasa del receptor unido a

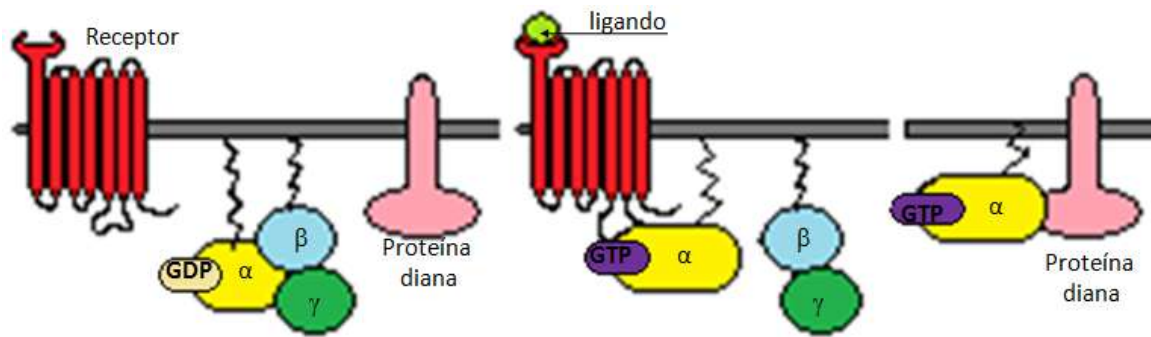


Figura 3. Mecanismo de transducción de receptores acoplados a proteínas G (de autoría propia).

proteína G (GRK), que fosforila sitios de serina y treonina. La configuración que adquiere el receptor al unirse al ligando, le permite interactuar y activar proteínas G, pero también lo hace susceptible a ser fosforilado por las cinasas GRK. Una vez fosforilado el receptor, a él se une con gran afinidad una proteína llamada arrestina, que compite por sitio de unión a proteína G, evitando así la activación de éstas. Las moléculas de arrestina unidas al receptor fosforilado, también son capaces de unirse a proteínas de clatrina; de tal manera que la interacción entre la arrestina y la clatrina provoca la internalización del receptor mediante endocitosis. Una vez endocitados, los receptores pueden ser desfosforilados y regresar a la superficie o pueden ser degradados en los lisosomas. En cuanto a la proteína G; la subunidad alfa se desactiva por la hidrólisis del GTP a GDP. La subunidad alfa tiene débil actividad GTPasa, lo que hace que se desactive a sí misma; pero esta hidrólisis puede aumentar por efecto de los reguladores de la señalización de proteína G (RGS). Una vez hidrolizado el GTP a GDP, la subunidad alfa se une al complejo beta-gama, formando así el complejo inactivo con las tres subunidades (Alberts y col., 2004; Karp, 2007).

Las proteínas G heterotriméricas presentan diferentes formas que se clasifican en relación a las subunidades alfa y las proteínas efectoras a las que se unen. Estas formas son: Gs, Gi, Golf, Gq, Go y Gt (Lodish y col., 2003).

I.2.2.1. Activación de los receptores acoplados a proteínas G

Algunas de las moléculas diana de las proteínas G son enzimas que regulan la producción de segundos mensajeros como el adenosín monofosfato cíclico (AMPc), el guanosín monofosfato cíclico (GMPc) y fosfolípidos de inositol. Estos segundos mensajeros, a su vez, pueden activar la producción y ser regulados por otros segundos mensajeros como el Ca^{2+} (Alberts y col., 2004).

El AMPc es sintetizado por la enzima adenilato ciclasa a partir del ATP; así mismo, es degradado con rapidez por enzimas fosfodiesterasas de AMP cíclico, que hidrolizan el AMPc a adenosina 5'-monofosfato (5'-AMP). La enzima adenilato ciclasa, y por lo tanto los niveles de AMPc, son regulados por proteínas Gs /Golf /Gi y por Ca^{2+} ; de tal modo que, dependiendo del tipo de proteína G que interactúe con la enzima, ésta puede activarse o inhibirse. Las formas que activan la enzima adenilato ciclasa son Gs /Golf, provocando un aumento en la concentración de AMPc. La forma Gi inhibe la acción de la enzima, regulando algunos canales iónicos debido a que varios de éstos son activados por AMPc (Alberts y col., 2004). Los efectos producidos por el AMPc están regulados principalmente por la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA). La PKA fosforila en residuos de serina y treonina; su forma inactiva es un complejo proteico que consta de cuatro subunidades, un par de estas subunidades presentan función catalítica, y el otro par tiene función reguladora. Las subunidades reguladoras inhiben la acción catalítica de las otras subunidades, además, presentan sitios de unión a AMPc, de tal modo que, cuando existe una interacción entre el AMPc y las unidades reguladoras, éstas cambian de conformación y se disocian de las unidades catalíticas. Así, la enzima PKA regula la actividad de varias proteínas diana por medio de las subunidades catalíticas, ya que éstas catalizan la transferencia de un grupo fosfato del ATP a la proteína diana que puede estar presente en el citosol o dentro del núcleo (Lodish y col., 2003; Alberts y col., 2004; Karp, 2007). La acción mediada por el AMPc es diferente en cada tejido. De tal manera que la estimulación de células hepáticas y del músculo esquelético provoca la degradación del

glucógeno y la inhibición de su síntesis; en el músculo cardíaco aumenta la contractibilidad; en el tejido adiposo regula y cataboliza el triacilglicerol; en los huesos aumenta la resorción de calcio; en el páncreas regula la secreción de amilasa; entre otras actividades que se presentan en los diferentes tejidos del organismo (Alberts y col., 2004).

El fosfolípido de inositol llamado fosfatidilinositol 4,5-bifosfato [PI(4,5)P₂], es un fosfolípido que se encuentra, en bajas cantidades, anclado en la capa interna de la membrana. Esta sustancia, al romperse, forma dos compuestos, el IP₃ (inositol 1,4,5-trifosfato) y el DAG (1,2- diacilglicerol). Esta acción la realiza la enzima fosfolipasa C-Beta, que se activa por efecto de las proteínas G_q /G_o. Una vez sintetizado, el IP₃ se difunde a través del citosol hasta llegar al retículo endoplásmico donde se une a canales liberadores de Ca²⁺ y aumenta las concentraciones de éste en el citosol. El DAG no se libera de la membrana; puede ser degradado para formar ácido araquidónico, que actúa como mensajero o en la síntesis de eicosanoides como las prostaglandinas, las cuales participan en la respuesta inflamatoria. Por otro lado, el DAG activa la enzima proteína cinasa C (PKC), que fosforila en residuos de serina-treonina y es dependiente de calcio. Cuando por acción del IP₃ se incrementan las concentraciones de Ca²⁺ en el citosol, el Ca²⁺ se une a la PKC y la enzima se acerca a la membrana plasmática donde interactúa con el DAG y la fosfatidilserina para ser activada. Cuando la enzima PKC se activa, fosforila diversas proteínas diana tanto del citosol como del interior del núcleo (Lodish y col., 2003; Alberts y col., 2004).

Por otro lado, el guanósín monofosfato cíclico (GMPc) es sintetizado por la enzima guanilato ciclasa y es rápidamente degradado por la enzima GMPc fosfodiesterasa, que se activa por acción de la proteína G_t. El GMPc se une a canales de Na⁺ regulados por GMPc, lo que permite el paso del Na⁺ al interior de la célula. Cuando un estímulo activa la proteína G_t, ésta interactúa con la GMPc fosfodiesterasa, provocando la disminución de GMPc y el cierre de canales de Na⁺ regulados por GMPc. Este mecanismo se lleva a cabo principalmente en el proceso de visión

(Alberts y col., 2004; Lodish y col., 2003). El GMPc también puede actuar indirectamente por medio de la proteína cinasa G (PKG); esta enzima regula vías que están involucradas en la relajación muscular (Lodish y col., 2003).

I. 2.2.2. Tipos de ligandos de receptores acoplados a proteínas G

Varias clases de ligandos pueden unirse y estimular los receptores asociados a proteínas G. Estos ligandos pueden provenir del exterior del organismo o del interior. Algunos ejemplos de ligandos que provienen del exterior son la luz, el calor, los compuestos responsables de los olores y los sabores. Los ligandos que se encuentran en el interior del organismo son hormonas, como el glucagon, la vasopresina, la hormona estimulante de la tiroides (TSH), entre otras. También algunos péptidos y proteínas son ligandos endógenos, como la inmunoglobulina E y el péptido f-Met. Otro grupo de ligandos internos son los neurotransmisores, como la adrenalina (que también actúa como hormona), la acetilcolina y la serotonina, entre otros (Lodish y col., 2003; Alberts y col., 2004; Karp, 2007).

I.3. Serotonina

La serotonina es un neurotransmisor involucrado en la regulación de funciones tanto biológicas como psicológicas. Algunas de las funciones biológicas que regula son: ingesta, ciclo del sueño, ritmo circadiano, inhibición del dolor, locomoción, reproducción, liberación de algunas hormonas, termorregulación, contracciones cardiovasculares, funciones respiratorias y peristaltismo intestinal. Algunas funciones psicológicas son: cognición, memoria y estado de ánimo (Guyton, 2001; Filip y Bader, 2009). La serotonina también está involucrada en trastornos como depresión, ansiedad, esquizofrenia, autismo, obesidad, adicciones, hipertensión y migraña (Filip y Bader, 2009).

La serotonina se sintetiza a partir del L-triptófano (Figura 4). La enzima L-triptófano-5- hidroxilasa (TPH) oxida al triptófano en la posición 5 del anillo pirrólico, dando como producto al 5-hidroxitriptófano; este compuesto es descarboxilado por acción de la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa, produciendo la 5-

hidroxitriptamina (5-HT) o serotonina (Iceta, 2008; Filip y Bader, 2009). Debido a que la serotonina actúa y se sintetiza a nivel periférico y a nivel de sistema nervioso central, existen dos tipos diferentes de la enzima L-triptófano-5-hidroxilasa (TPH), la TPH1 y la TPH2. La enzima TPH1 se encuentra en el intestino y está involucrada en la síntesis del 95% de la serotonina que se necesita en el cuerpo. La serotonina que se genera en el intestino es transportada por las plaquetas a los órganos sobre los que actúa, a excepción del cerebro. La serotonina que actúa a nivel de sistema nervioso central (SNC) se sintetiza en el cerebro por la enzima TPH2, ya que la serotonina producida en la periferia no puede pasar la barrera hematoencefálica (Filip y Bader, 2009).

La serotonina que actúa a nivel de SNC se sintetiza principalmente en los núcleos del rafe medio del tronco encefálico. Los axones de los núcleos del rafe se proyectan hacia diferentes áreas del encéfalo y de la médula espinal, principalmente a las astas dorsales de la médula y al hipotálamo (Guyton, 2001); pero también se extienden hacia la corteza, la amígdala, el tálamo, el hipocampo, la sustancia nigra, el núcleo supraquiasmático, el búlbo raquídeo, la pia, entre otras zonas (Roberts y col., 2001).

Una vez sintetizada y liberada, la serotonina activa distintas vías y mecanismos dentro de la célula, esto lo hace por medio de sus receptores. Existen siete familias de receptores de serotonina, 5-HT₁, 5HT₂, 5HT₃, 5HT₄, 5HT₅, 5HT₆ Y 5HT₇. Cada familia del receptor presenta isoformas, y pertenecen a receptores acoplados a proteínas G, con excepción de los receptores de la familia 5HT₃, que son canales iónicos (Barnes y Sharp, 1999; Hoyer y col., 2002; Hannon y Hoyer, 2008; Filip y Bader, 2009).

I.3.1 Receptores de serotonina

La familia de receptores 5-HT₁ presenta las isoformas 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1F}. Se acoplan a proteínas G_i /Go, y por tanto disminuyen la producción del AMPc debido a que inhiben la actividad de la adenilato ciclasa (Gerhard y van

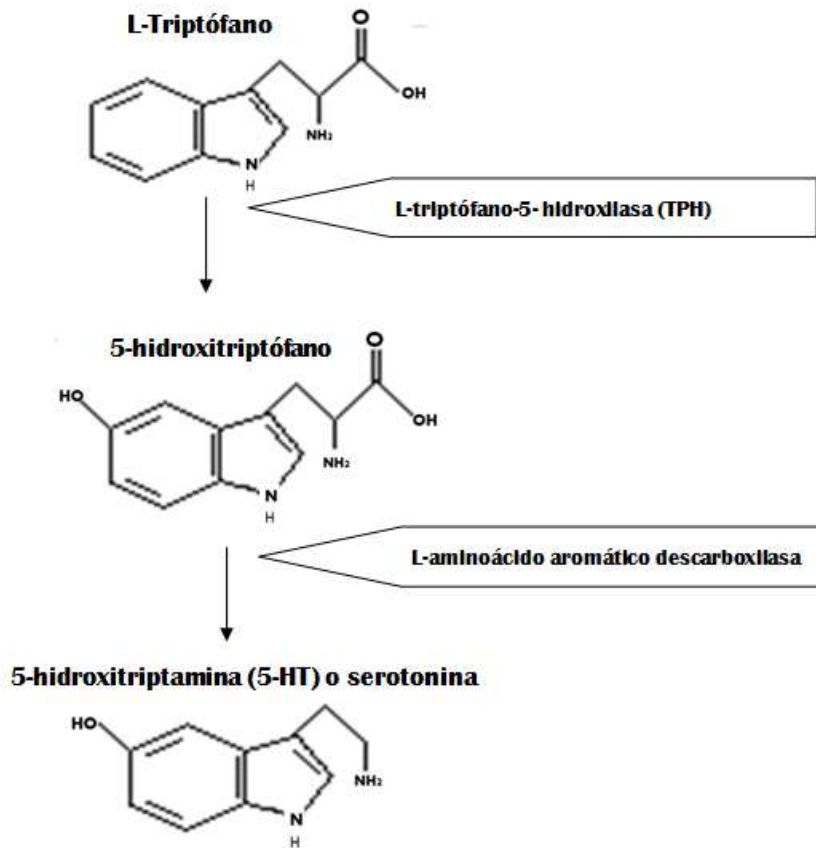


Figura 4. Síntesis de serotonina (de autoría propia).

Heerikhuizen, 1997; Barnes y Sharp, 1999; Hoyer y col., 2002; Hannon y Hoyer, 2008; Iceta, 2008; Filip y Bader, 2009). Se localizan en el hipocampo, en la corteza, en los núcleos del rafe, en los ganglios basales, en el putamen, en el caudado, y en el claustró. Algunas de las funciones en las que están implicados esta familia de receptores son: la locomoción, en la reproducción, en la percepción del dolor, en la termorregulación, en la ingesta, en los proceso cognitivos y emocionales (Filip y Bader, 2009).

La familia 5-HT₂ está constituida por las isoformas 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}; se acoplan a proteínas G_q, por lo que producen un aumento en el PI3 y en la liberación de Ca²⁺ (Gerhard y van Heerikhuizen, 1997; Barnes y Sharp, 1999; Hoyer

y col., 2002; Hannon y Hoyer, 2008; Iceta, 2008; Filip y Bader, 2009). Se distribuyen por la corteza, el claustró, el hipocampo, el hipotálamo, los ganglios basales, el cerebelo, el septum, la amígdala, la sustancia nigra, el plexo coroideo y el estriado. Las funciones en las que están implicadas estas isoformas son: el sueño, la ingesta, la percepción del dolor, la locomoción, la reproducción y procesos emocionales (Filip y Bader, 2009).

La familia 5-HT3, cuyas isoformas son 5-HT3A, 5-HT3B, 5-HT3C, 5-HT3D, 5-HT3E, actúa como canales iónicos. El cambio de potencial que se produce al activarse estos canales permite la apertura de otros canales iónicos, y con ellos la entrada de Na^+ y Ca^{2+} a la célula, y la salida de K^+ (Barnes y Sharp, 1999; Hoyer y col., 2002; Hannon y Hoyer, 2008; Filip y Bader, 2009). Se encuentran distribuidos por el hipocampo, en el núcleo del tracto solitario, en el área postrema y en complejo dorsovagal. Las funciones mediadas por estos receptores incluyen la locomoción, la cognición, el dolor y la ansiedad (Filip y Bader, 2009).

La familia 5-HT4 está compuesta por las isoformas 5-HT4A, 5-HT4B, 5-HT4C; 5-HT4D. Estas isoformas están acopladas a proteínas Gs, por lo que estimulan la enzima adenilato ciclasa y aumentan los niveles de AMPc (Gerhard y van Heerikhuizen, 1997; Barnes y Sharp, 1999; Hoyer y col., 2002; Hannon y Hoyer, 2008; Iceta, 2008; Filip y Bader, 2009). Se localizan en los ganglios basales, en la corteza, en el septum, en el hipocampo (Filip y Bader, 2009), en el intestino y en el corazón (Hoyer y col., 2002). Algunas de las funciones relacionadas con estos receptores son: la consolidación de la memoria (Filip y Bader, 2009), la contracción del músculo liso y el vómito (Iceta, 2008).

Los receptores 5-HT6 están acoplados a proteínas Gs, activan la enzima adenilato ciclasa y aumentan los niveles de AMPc (Gerhard y van Heerikhuizen, 1997; Barnes y Sharp, 1999; Hoyer y col., 2002; Hannon y Hoyer, 2008; Iceta, 2008; Filip y Bader, 2009). Se distribuyen por el estriado, la amígdala, el hipocampo y la corteza. Están implicados en funciones como la locomoción, la ingesta, el aprendizaje y la memoria (Filip y Bader, 2009).

La familia de receptores 5-HT7 incluye las isoformas 5-HT7A, 5-HT7B, 5-HT7C, 5-HT7D (Hoyer y col., 2002; Filip y Bader, 2009). Se acoplan a proteínas Gs, aumentando la concentración de AMPc por la activación de la enzima adenilato ciclasa (Gerhard y van Heerikhuizen, 1997; Barnes y Sharp, 1999; Hoyer y col., 2002; Hannon y Hoyer, 2008; Iceta, 2008; Filip y Bader, 2009). Se encuentran en el tálamo, el hipocampo, la corteza, la amígdala y los núcleos supraquiasmáticos. Estos receptores medían funciones como la regulación del sueño, el humor, la termorregulación, el ritmo circadiano, la percepción del dolor y la cognición (Filip y Bader, 2009).

La familia 5-HT5 la integran las isoformas 5-HT5A y 5-HT5B. Están acopladas a proteínas Gi y Go, de tal modo que inhiben la actividad de la enzima adenilato ciclasa, con lo que disminuye la concentración de AMPc (Gerhard y van Heerikhuizen, 1997; Barnes y Sharp, 1999; Hoyer y col., 2002; Hannon y Hoyer, 2008; Iceta, 2008; Filip y Bader, 2009). Se localizan en el hipocampo, el hipotálamo, el bulbo olfatorio, el tálamo, el estriado, en los núcleos del rafe y en el núcleo supraquiasmático (Pasqualetti y col., 1998; Duncan y col., 2000; Filip y Bader, 2009). En humanos, la isoforma 5-HT5A es la única que presenta funcionalidad (Barnes y Sharp, 1999; Hoyer y col., 2002; Filip y Bader, 2009).

El receptor 5-HT5A se localiza en el cromosoma 7 humano y en el cromosoma 4 de la rata (Barnes y Sharp, 1999; Hoyer y col., 2002; Filip y Bader, 2009; NCBI, 2009). En la región N- terminal del receptor presenta sitios de glicosilación, mientras que en las asas de la región citoplasmática presenta un sitio de fosforilación para la PKC (Barnes y Sharp, 1999). El receptor tiene un intrón en la tercer asa citoplasmática, lo que lo hace diferente de los receptores de la familia 5-HT1 (Barnes y Sharp, 1999; Filip y Bader, 2009).

A pesar de que no se han definido bien las funciones en las que participa este receptor, se sugiere que, por su localización, regula el ritmo circadiano (Duncan y col., 2000), está involucrado en procesos cognitivos (Pasqualetti y col., 1998; Oliver y col., 2000), en funciones neuroendócrinas y en la percepción sensorial (Oliver y

col., 2000). También se sugiere que modula la actividad de exploración, ya que se ha observado que en ratones carentes del receptor 5-HT_{5A} existe un incremento en esta actividad, evento que es atribuido a la curiosidad del animal y no a un control en el proceso de locomoción, puesto que en los ratones control y carentes del receptor, la actividad locomotora es similar (Grailhe y col., 1999; Oliver y col., 2000).

Debido a que se ha observado la expresión del receptor 5-HT_{5A} en los núcleos del rafe, se ha propuesto que funciona como un autoreceptor, es decir, puede estar implicado en la regulación de la liberación de serotonina durante la sinapsis (Roberts y col., 2001).

El receptor 5-HT_{5A} se expresa en varias estructuras del SNC, sin embargo, las regiones que presentan mayores niveles de expresión son la corteza, la amígdala, el cerebelo y el hipocampo (Pasqualetti y col., 1998).

I.4. Hipocampo

El hipocampo es una estructura cerebral que forma parte del sistema límbico. Anatómicamente, en el humano, está plegado hacia dentro formando la superficie ventral de la mayoría del interior del ventrículo lateral. En la rata, esta estructura ocupa una gran porción del prosencéfalo (Figura 5). Se relaciona por uno de sus extremos con los núcleos amigdalinos, se fusiona por uno de sus bordes con la circunvolución parahipocámpica, y se divide en las regiones CA1, CA2, CA3 y el giro dentado (DG) (Guyton, 2001).

El hipocampo recibe señales aferentes sensitivas, por eso la estimulación de las áreas del hipocampo producen pasividad, placer, rabia o impulso sexual (Guyton, 2001), también está asociado con el estado de alerta, la toma de decisiones vitales y la consolidación de la memoria a largo plazo (Guyton, 2001; Tresguerres, 2005). La estimulación del hipocampo aumenta o disminuye la concentración de hormonas estiroideas circulantes (Tresguerres, 2005); y una sobre estimulación puede causar

crisis epilépticas; y alucinaciones de tipo olfativo, visuales, auditivas y táctiles (Guyton, 2001; Tresguerres, 2005).

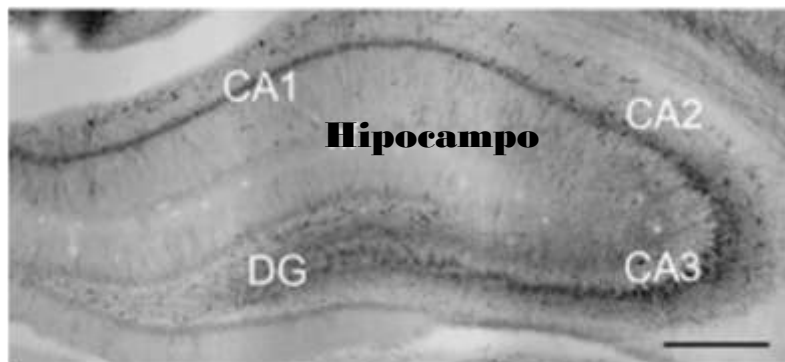


Figura 5. Regiones del hipocampo (modificado de Gutekunst, 2010).

I.5. Hipocampo y receptor de serotonina 5-HT5A

Se ha observado que el receptor 5-HT5A de serotonina se expresa en las capas celulares del hipocampo. En estudios con ratas se observó que los niveles de expresión del receptor 5-HT5A en el hipocampo se modificaban de acuerdo a la edad del individuo; de tal manera que en las células de las capas CA1, CA2 y CA3 del hipocampo la señal aumenta en posnatales de 5 días (PN5), disminuye en PN11 y vuelve a aumentar en la edad adulta (García y col., 2005), lo que sugiere un papel del receptor en el desarrollo del cerebro del individuo.

La expresión proteica del receptor de serotonina 5-HT5A está modificada por distintos mecanismos celulares, uno de ellos es la regulación de la expresión genética. De modo que el estudio del ARNm de este receptor podría aportar mayor información acerca de su regulación y funciones en hipocampo.

I.6. Estudio de la expresión génica

En los organismos eucariotas, la expresión genética se encuentra altamente regulada por diferentes mecanismos dentro de la célula. El encendido y apagado

de ciertos genes conlleva a la diferenciación celular, determinando así la función de cada célula. La célula diferenciada expresa en distintas proporciones el conjunto de genes y proteínas que le confieren su funcionalidad; además, los niveles de expresión de determinados genes pueden variar en respuesta a diversos factores; así que, los niveles de expresión genética dependen del ambiente y las necesidades de la célula (Lodish y col., 2003).

El ARN mensajero (ARNm) refleja la expresión de un gen, esta molécula se traduce posteriormente en proteína; por lo tanto, el estudio de las variaciones en la expresión de genes aporta información para el entendimiento de los procesos que ocurren en los organismos, ya que toda reacción dentro del mismo está mediada por proteínas. Para ello existen técnicas que son capaces de cuantificar la expresión genética; una de ellas es la PCR en tiempo real, que permite conocer los niveles relativos de expresión de un gen y la verificación de la obtención del producto de interés.

1.6.1. PCR tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) tiempo real, es una técnica que permite medir la expresión génica al cuantificar el ARNm presente en una muestra. Para ello, es necesario el paso de ARNm a ADN complementario (ADNc) por medio de la retrotranscripción. A través de la PCR se obtienen, de manera exponencial, varias moléculas de ADNc a partir de una sola (Vinueza, 2009).

La molécula de ADNc es el molde en donde se hibridan los oligonucleótidos (fragmentos cortos de ADN), de modo que la unión oligonucleótido-ADNc sirve de sitio de reconocimiento para la enzima ADN polimerasa, y ésta incorpora los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's) usando como cofactor el $MgCl_2$; así, al ir creciendo la doble hebra de ADNc, se incorpora el SYBR green, un fluorocromo que, al intercalarse en las moléculas de doble cadena, emite fluorescencia. De esta manera, la técnica de PCR tiempo real permite medir, mediante la emisión de

fluorescencia, la cantidad de ADNc presente en una muestra en cada ciclo de amplificación (Fonseca, 2010).

La técnica de PCR tiempo real presenta tres fases: una fase inicial de desnaturalización, una fase de amplificación, y una fase final llamada curva de disociación (Figura 6).

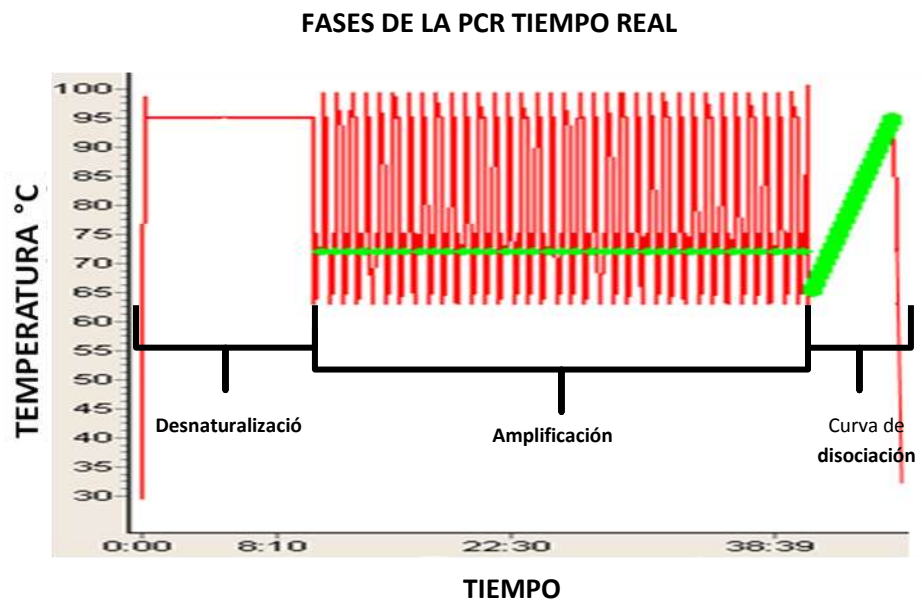


Figura 6. Fases de la PCR tiempo real. La línea roja indica los cambios de temperatura y la verde la emisión de fluorescencia (de autoría propia).

En la primer fase de la PCR tiempo real (desnaturalización), la reacción se somete a altas temperaturas para la deshibridación de moléculas de ADNc y la activación de la ADN polimerasa. La segunda fase, amplificación, está constituida por tres etapas: desnaturalización, hibridación y elongación. En la etapa de desnaturalización, se eleva la temperatura para separar la doble cadena de las moléculas de ADNc; en la etapa de hibridación, se baja la temperatura para que se hibriden los oligonucleótidos al molde de ADNc, esta temperatura depende del tamaño y secuencia de los oligonucleótidos; en la etapa de elongación, la

temperatura sube a 72°C, la ADN polimerasa reconoce la unión oligonucleótido-ADNc y comienza a incorporar los dNTP's, creando así nuevas moléculas de ADNc en las cuales se va intercalando el SYBR Green, de tal manera que comienza a detectarse la fluorescencia. La tercera fase, curva de disociación, presenta tres etapas: desnaturalización, hibridación y disociación. En la primer etapa (desnaturalización), sube la temperatura para lograr la completa desnaturalización de las moléculas, que son el producto de amplificación de la PCR, perdiendo así la señal de fluorescencia; en la segunda etapa, hibridación, las moléculas de ADNc se reconstituyen haciendo que la señal de fluorescencia crezca hasta alcanzar la máxima emisión de la señal; en la última etapa, disociación, la temperatura se eleva poco a poco (0.1°C/seg) hasta alcanzar 95°C, temperatura a la cual todas las moléculas de ADNc se vuelven a desnaturalizar. Durante esta última etapa, se va detectando continuamente la pérdida de fluorescencia, de modo que el equipo grafica la derivada de la fluorescencia contra la temperatura, obteniendo así la temperatura de disociación del fragmento amplificado y un área bajo la curva que representa el fragmento disociado a cierta temperatura. La temperatura de fusión del producto depende de la longitud y la secuencia del fragmento (Ruiz, 2010; Mares, 2011).

La cinética de reacción de la PCR tiempo real se divide en cuatro etapas (Figura 7): basal, exponencial temprana, exponencial y plateau (finalización). En la etapa exponencial temprana se encuentra el punto de cruce (CP, por sus siglas en ingles), y es el punto de inflexión en el que comienza a amplificarse exponencialmente el producto de PCR, de modo que este valor está relacionado con el número de moléculas de DNAc presentes en la muestra a analizar y son la base para calcular los niveles de expresión de RNAm de origen (Anaya y col., 2005; Ruiz, 2010; Mares, 2011).

El objetivo de este trabajo es cuantificar la expresión del gen del receptor 5-HT5A en hipocampo de ratas tratadas con dosis agudas o continuas de serotonina, para analizar la modulación de la expresión del receptor por serotonina. Debido a que no

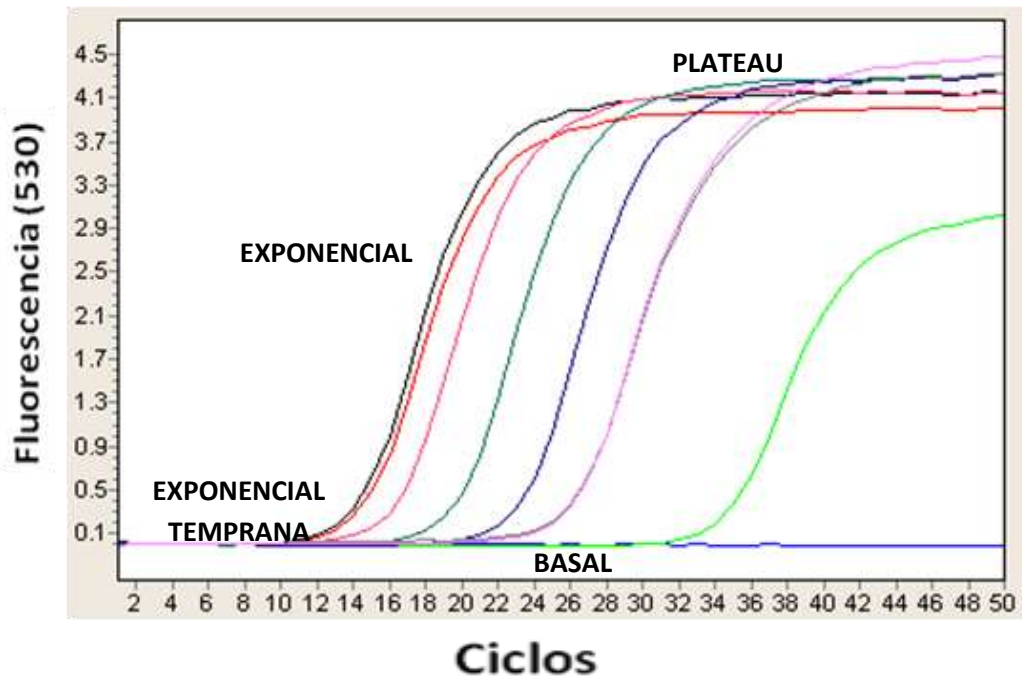


Figura 7. Etapas de la cinética de reacción de la PCR tiempo real (de autoría propia).

se conoce lo suficiente acerca de las funciones mediadas por el receptor de serotonina 5-HT_{5A} en hipocampo, es necesario continuar con su estudio y obtener mayor información para caracterizar a este receptor. Así pues, se espera que con la información que se obtenga en el presente proyecto y en estudios posteriores, se avance en el conocimiento de las funciones que regula este receptor en el hipocampo.

II. HIPÓTESIS

La administración de serotonina provoca cambios en la expresión del gen de la isoforma 5-HT5A del receptor de serotonina en el hipocampo de rata.

III. OBJETIVOS

III.1. General

Cuantificar la expresión del gen de la isoforma 5-HT5A del receptor de serotonina en el hipocampo de rata por inducción de serotonina.

III.2. Específicos

- * Estandarizar condiciones de reacción de PCR tiempo real para la amplificación del gen del *receptor 5-HT5A* y del gen *actina*.
- * Realizar cuantificación absoluta del gen del *receptor 5-HT5A* y del *actina*.
- * Obtener una cuantificación relativa de los niveles de expresión del gen del *receptor 5-HT5A* refiriendo al gen de *actina* en el hipocampo de ratas.
- * Analizar los niveles de expresión del gen del *receptor 5-HT5A* en hipocampo de ratas con los tratamientos tanto agudo como continuo en relación con los niveles de expresión basal.

IV. METODOLOGÍA

IV.1. Materiales

IV.1.1. Materiales y equipos

Mortero con pistilo

Hielera

Vortex

Microcentrífuga

Espectrofotómetro

Ultracongelador

Incubadora

Termomezclador

Termociclador

Capilares

Micropipetas

Puntas para micropipeta

Tubos eppendorf

Cronómetro

Refrigerador

IV.1.2. Material biológico

Hipocampo de rata Sprague Dawley

IV.1.3. Reactivos y Kits

Serotonina (Sigma)

Solución fisiológica (Baxter)

Nitrógeno líquido (INFRA)

TRIZOL® Reagent (Invitrogen)

Cloroformo grado biología molecular (Merck)

Alcohol absoluto grado biología molecular (Merck)
Kit para extracción y purificación de RNA (Quiagen)
Agua libre de nucleasas (Sigma)
Deoxyribonucleasa I (Invitrogen)
Oligonucleótidos sentido y antisentido (Invitrogen)
Oligonucleótidos aleatorios (Invitrogen)
Kit de retrotranscriptasa reversa (Invitrogen)
Mezcla maestra Plus con SYBR green I (Roche)

IV.2. Métodos

Se usaron 12 ratas macho adultas Sprague Dawley de 40 días de nacidas. Las ratas se mantuvieron a una temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, se expusieron a periodos de luz-obscuridad de 12-12 h, con humedad controlada, ausencia de ruido y con libre acceso de agua y comida. Una semana antes del tratamiento, las ratas fueron sometidas a un periodo de adaptación, en el cual se les inyectó solución fisiológica por vía intraperitoneal (IP) con el fin de reducir el estrés por manipulación y evitar los cambios en los niveles de serotonina liberada por el animal. Para la administración del tratamiento, las ratas se dividieron en cuatro grupos con 3 individuos por grupo. Los tratamientos que se realizaron fueron: control, agudo y dos tratamientos continuos. El grupo control fue inyectado por vía IP con tres dosis de solución fisiológica a 0 h, 48 h y 96 h. El grupo con tratamiento agudo fue inyectado vía IP una sola vez con una dosis de serotonina de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Uno de los grupos con tratamiento continuo recibió tres dosis de serotonina de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (dosis completa) y el otro recibió tres dosis de serotonina de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (dosis media); en los tratamientos de dosis continua se administró la serotonina por vía IP a los tiempos 0 h, 48 h y 96 h. En todos los casos, una hora después de la última administración del tratamiento respectivo, las ratas se fueron sacrificadas. Se extrajeron los cerebros de todas las ratas, y de cada cerebro se disectó el hipocampo, que fue congelado en nitrógeno líquido. El manejo de los animales se

realizó de acuerdo a la Guía Internacional para el Manejo de Animales de Laboratorio (Institute of Laboratory Animal Resources, 1996).

IV.2.1. Extracción y purificación de ARN total utilizando TRIzol ®

Pulverizar el tejido congelado en mortero con nitrógeno líquido, pesar la muestra y agregar 1mL por cada 50-100 mg de TRIzol ® frío; agitar en vortex e incubar 5 min a temperatura ambiente. Agregar cloroformo, mezclar por inversión, incubar de 2-3 min a temperatura ambiente. Centrifugar a 10000 rpm por 15 min a 4°C. Recuperar fase acuosa; agregar etanol 1-1, mezclar con pipeta. Pasar muestra por columna de sefarosa incluida en el kit para purificación de ARN; centrifugar a 4°C por 1 min a 10000 rpm. Agregar 700 µL de reactivo RW1 (tiocianato de guanidina y etanol); centrifugar a 4°C por 1 min a 10000 rpm. Agregar 500 µL de reactivo RPE (etanol y agua libre de nucleasas); centrifugar a 4°C por 1 min a 10000 rpm. Agregar otros 500 µL de RPE; centrifugar a 4°C por 1 min a 10000 rpm. Para eliminar de la columna los residuos del etanol, centrifugar a 4°C por 2 min a 10000 rpm. Agregar 30 µL de agua para eluir el RNA de la columna y recolectar en tubo nuevo, centrifugar a 4°C por 1 min a 10000 rpm.

IV.2.2. Determinación de la concentración y pureza de ARN

La concentración de ARN se mide en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260nm, debido a que a esta longitud de onda el ARN presenta mayor absorbancia. La pureza estará determinada por las siguientes relaciones de absorbancia: A260/280 y A260/230. Estas relaciones miden la pureza del ARN frente a los contaminantes proteicos y orgánicos, ya que estos compuestos presentan mayor absorbancia a 280 nm y 230 nm, respectivamente. Para considerar que el RNA de una muestra está puro, ambas relaciones deben presentar valores entre 1.8 y 2.

IV.2.3. Tratamiento con DNasa

Se utiliza la DNasa Deoxyribonucleasa I para eliminar el ADN que pudiera estar presente en la muestra. Para este tratamiento se agrega a un tubo eppendorf 1µg de RNA purificado, 1 µL de buffer (Tris-HCl, MgCl₂, KCl), 1 µL de DNasa, y agua libre de RNasas hasta un volumen de 10 µL. Se incubó 10 min a 37°C. Posteriormente, para desactivar la DNasa, añadir 1 µL de EDTA a la muestra e incubó 10 min a 65°C.

IV.2.4. Síntesis de ADNc

Para la síntesis de ADNc se usa 1µg de ARN purificado y libre de ADN. La reacción se prepara agregando 4 µL de buffer (Tris-HCl, KCl, MgCl₂), 1 µL de DTT (Dithiothreitol), 0.25 µL de inhibidor de RNasa, 1 µL de mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's), 0.75 µL de oligonucleótidos aleatorios, 1 µL de enzima transcriptasa reversa (SuperScript III, Invitogen), y 7.25 µL de agua libre de nucleasa; se mezcla por pipeteo, se da un spin en centrífuga; se incubó 5 min a 25°C (temperatura ambiente), después 1 h a 55°C y por último 15 min a 70°C.

IV.2.5. PCR tiempo real

IV.2.5.1. Comprobación *in silico* de la especificidad de los oligonucleótidos

Las condiciones de amplificación y los oligonucleótidos utilizados para el estudio de los genes de interés, fueron establecidos en investigaciones anteriores realizadas por el laboratorio donde se llevó a cabo este trabajo. Antes de realizar la cuantificación de la expresión de los genes del *receptor de serotonina 5-HT5A* y *actina* por medio de PCR tiempo real, se verificó *in silico* la especificidad de los oligonucleótidos con el programa Primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information, 2009), y se obtuvieron las secuencias de los fragmentos a amplificar del gen del *receptor de serotonina 5-HT5A* y del gen de *actina* con el programa FastPCR Professional (Ruslan kalendar ©, 2009; PrimerDigital Ltd ©, 2009). Con

estos datos, se evaluaron *in vitro* las condiciones de amplificación, que deben ser las mismas para el gen del *receptor de serotonina 5-HT5A* y el gen de *actina*.

IV.2.5.2. Componentes de la reacción de PCR

En la amplificación de los productos se usaron los oligonucleótidos (S) CTG TGC TGG TTA TGC CTC T y (AS) GAG ACA CGC TTG CGG GC para el gen del *receptor 5-HT5A* (gen de estudio); y los oligonucleótidos (S) AGG TCA TCA CTA TTG GCA AGG A y (AS) CAC TTC ATG ATG GAA TTG AAT GTA GTT para el gen *actina* (gen constitutivo). La reacción se realiza preparando una mezcla maestra con 1 µL de buffer SYBR green I (Taq ADN polimerasa, buffer de reacción, dNTPs y dNTPU, SYBR green I, MgCl₂), 1 µL de cada oligonucleótido, 1 µL de ADNc, 4.8 µL de agua libre de nucleasa y 1.2 µL de MgCl₂ adicional para optimizar la reacción.

IV.2.5.3. Programa de amplificación

La primera fase de la PCR, desnaturalización, se realizó en un ciclo de 10min a 95°C. La segunda fase, amplificación, que se llevó a cabo en 50 ciclos, consta de tres etapas (desnaturalización, hibridación, elongación). Para la primera etapa (desnaturalización) la reacción se llevó a una temperatura de 95°C por 15 segundos; en la segunda etapa (hibridación) se bajó la temperatura a 65°C durante 10seg; para la tercera etapa (elongación) se subió la temperatura a 72°C por 15seg. La tercera fase, curva de disociación, se realizó en un ciclo y se integra por tres etapas (desnaturalización, hibridación, disociación). La etapa de desnaturalización se llevó a cabo durante 1seg a 95°C; en la segunda etapa, hibridación, se bajó la temperatura a 65°C y se mantuvo por 15seg; para la tercera etapa, disociación, se subió la temperatura lentamente (0.1°C/seg) desde 65°C hasta 95°C.

IV.2.5.4. Diseño experimental

Se realizaron 3 experimentos independientes por gen. En cada experimento se analizaron los 4 tratamientos, cada uno con duplicados de las 3 muestras procedentes de animales distintos.

IV.2.6. Cuantificación del ARNm

Una vez estandarizadas las condiciones para la amplificación del receptor de serotonina 5-HT5A y comprobar que la actina amplifica a esas mismas condiciones, se realizaron cuantificaciones absolutas y relativas del *receptor 5-HT5A* y de *actina*.

IV.2.6.1 Cuantificación absoluta

Mediante este método se determina el número de copias de los templados en relación a la señal de fluorescencia emitida. Para realizar la cuantificación absoluta, es necesario obtener una curva estándar. Las curvas estándar del gen del *receptor de serotonina 5-HT5A* y el gen de *actina* se obtuvieron realizando diluciones seriadas de ADNc de corteza de rata, cuyas concentraciones, expresadas en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, fueron 1×10^{-5} ; 1×10^{-6} ; 1×10^{-7} y 1×10^{-8} , y se amplificaron duplicados en las condiciones estandarizadas para su gen correspondiente. Con los datos obtenidos de la amplificación, se graficó en el eje de las abscisas (X) el logaritmo de la concentración y en el eje de las ordenadas (Y) el CP de la reacción; obteniendo así la ecuación de la recta que se utilizó para interpolar los datos de los CP de las muestras problema, y así determinar la concentración de las mismas y la pendiente para calcular la eficiencia de la reacción.

Los valores absolutos de las muestras se obtuvieron con la fórmula $X = (\text{CP} - b)/m$. Donde "X" es la concentración de la muestra, "CP" es el punto de cruce, "b" es la ordenada del origen y "m" la pendiente. Esta fórmula se obtuvo del despeje de la ecuación de la recta.

La eficiencia de la reacción (E) indica el número de moléculas que se replican en cada ciclo por cada molécula presente. Para una eficiencia del 100%, el valor E

debe ser 2, debido a que, teóricamente, el producto de PCR se duplica. Los valores aceptables para E deben ser igual a 1.8 ó superior. La fórmula para conocer la eficiencia es $E=10^{-1/m}$, donde “m” es la pendiente.

IV.2.6.2 Cuantificación relativa

Una vez obtenidos los datos de la cuantificación absoluta, se realiza una cuantificación relativa para conocer el número de veces que se expresa el gen en estudio referido al gen endógeno.

Los genes endógenos son genes que se expresan constitutivamente en todas las células del organismo, debido a que son requeridos para el correcto funcionamiento de las mismas. Estos genes sirven de referencia interna entre las muestras, ayudando así a normalizar los datos.

La cuantificación relativa es el resultado del cociente de los niveles absolutos de expresión de ARNm del gen del *receptor de serotonina 5-HT5A* entre los niveles absolutos de expresión de ARNm del gen de *actina*.

IV.2.6.3 Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados, se llevaron a cabo análisis de varianza de una vía (ANOVA) con una $P < 0.05$.

V. RESULTADOS

V.1. Estandarización de condiciones de amplificación

Una vez evaluada *in silico* la especificidad de los oligonucleótidos y de haber obtenido los fragmentos a amplificar para el gen del *receptor de serotonina 5-HT5A* y el gen de *actina*, se procedió a la evaluación *in vitro* de la amplificación de este par de genes.

Otros factores a evaluar fueron la temperatura de alineación de los oligonucleótidos y la concentración de Cl_2Mg . Con estos datos, se estandarizaron las condiciones óptimas de amplificación para el gen del *receptor 5-HT5A*.

La Figura 8 representa la cinética de reacción y la curva de fusión para el fragmento del gen del *receptor de serotonina 5-HT5A*.

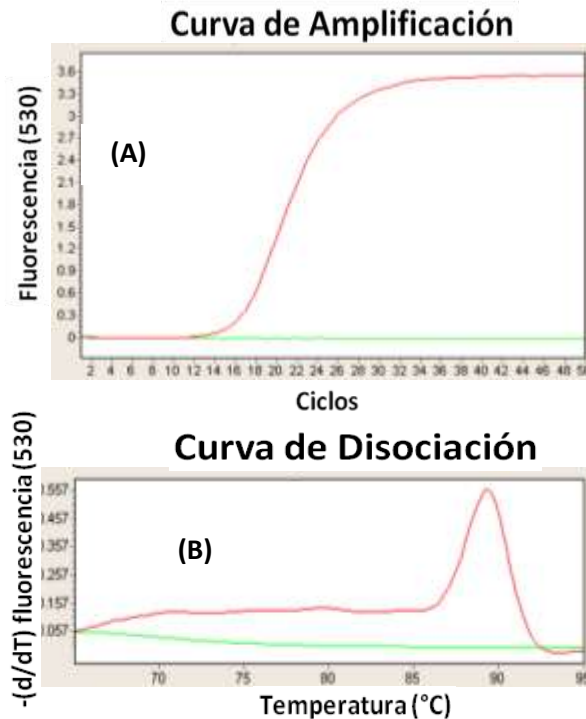


Figura 8. Amplificación del fragmento del gen del *receptor de serotonina 5-HT5A*.
Curva de amplificación (A). Curva de disociación de producto único (B).

Estandarizadas las condiciones de amplificación para el gen del *receptor 5-HT5A*, se procedió a realizar una reacción de amplificación tanto del gen a cuantificar como del gen endógeno (*actina*), para verificar que ambos genes amplifican bajo las mismas condiciones. En la Figura 9, se muestra las cinéticas de reacción y las curvas de fusión para el gen del *receptor de serotonina 5-HT5A* y el gen de *actina*.

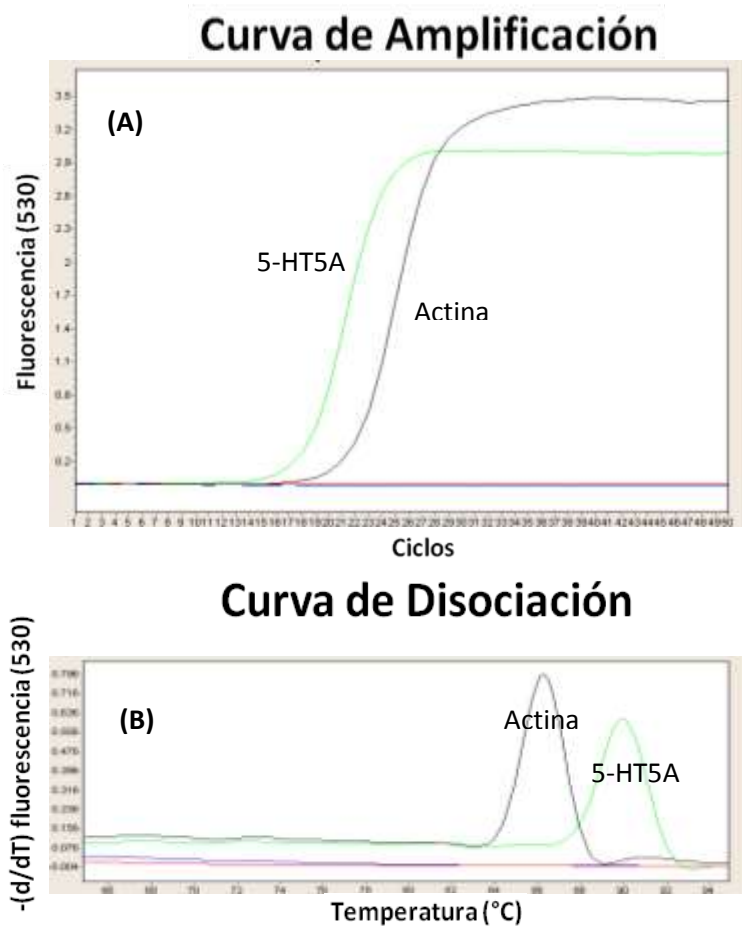


Figura 9. Amplificación de los fragmentos de los genes del *receptor de serotonina 5-HT5A* y *actina* bajo las mismas condiciones. Curva de amplificación (A). Curva de disociación (B).

V.2. Obtención de las curvas estándar

Se realizaron curvas estándar para el gen del *receptor de serotonina 5-HT5A* y el gen de *actina*. Las diluciones de ADNc utilizadas para ambos genes fueron 1×10^{-5} ;

1×10^{-6} ; 1×10^{-7} y 1×10^{-8} expresadas en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se realizaron duplicados de las diluciones de la curva de cada gen. Con base a los CP obtenidos de la cinética de reacción de estas diluciones, se obtuvieron los valores de la ecuación lineal y la eficiencia de la reacción.

La Figura 10 muestra la cinética de reacción de las diluciones seriadas, además de la curva estándar con la eficiencia de la reacción y la ecuación lineal para el gen del *receptor de serotonina 5-HT5A*.

De la misma manera, en la Figura 11, se puede observar la cinética de reacción de las diluciones seriadas, la curva estándar con la eficiencia de la reacción y la ecuación lineal correspondiente para el gen de *actina*.

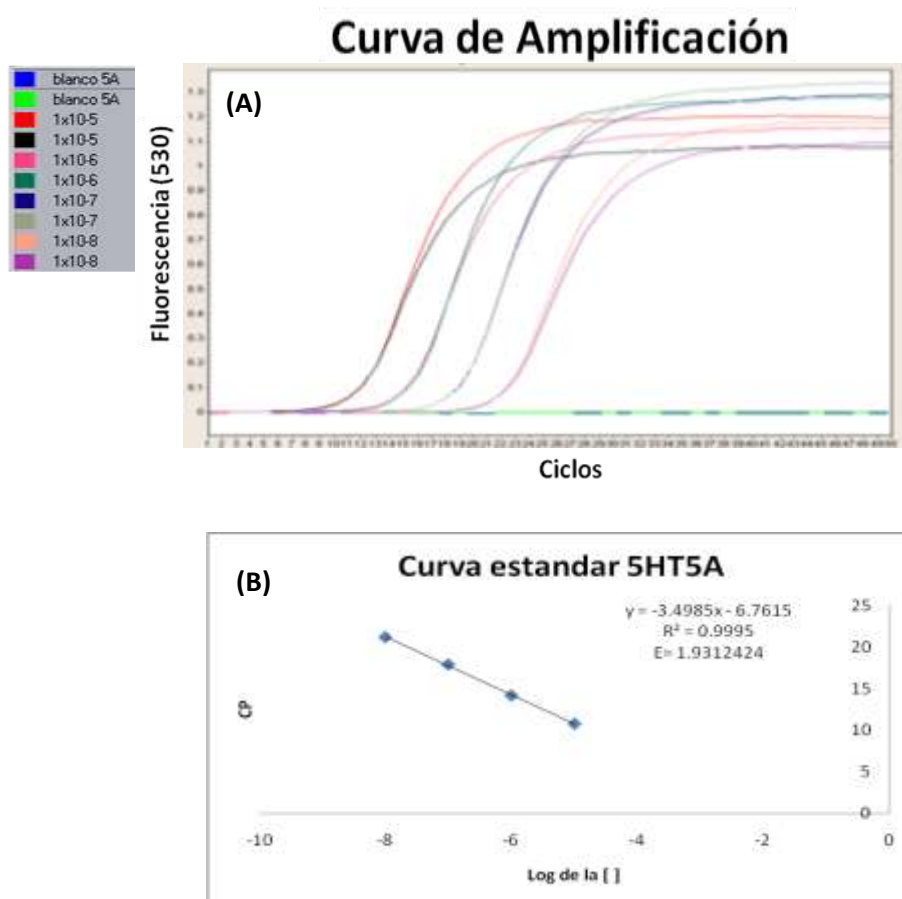


Figura 10. Curva de amplificación de las diluciones del gen *del receptor de serotonina 5-HT5A* (A) y su regresión lineal (B).

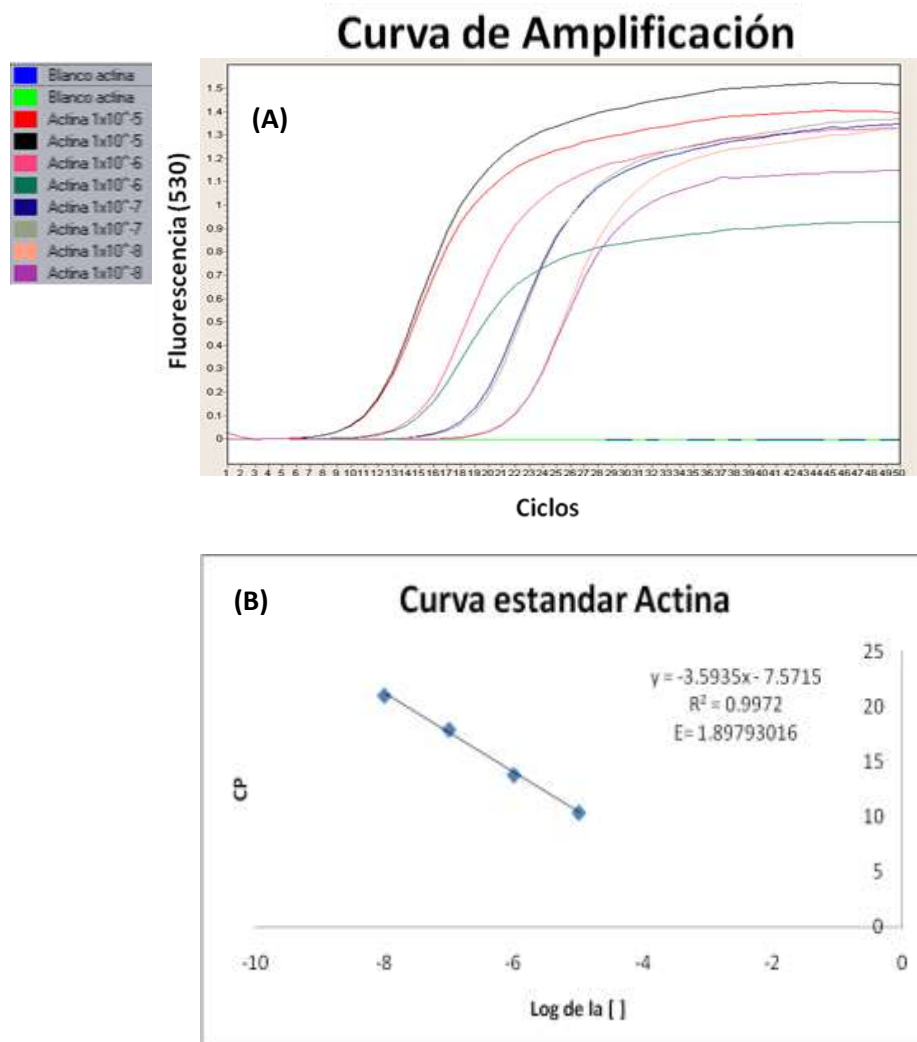


Figura 11. Curva de amplificación de las diluciones del gen de *actina* (A) y su regresión lineal (B).

V.3. Cuantificaciones absolutas

Para conocer la concentración del gen del *receptor 5-HT5A* y del gen de *actina* en las muestras a cuantificar, éstas se amplificaron, por un lado, con los oligonucleótidos para el gen de *actina* y por otro con los oligonucleótidos para el gen del *receptor 5-HT5A*. Por medio de estas reacciones de amplificación, se obtuvieron los valores de los CP de cada muestra para cada uno de los genes (5-

HT5A y *actina*). Los valores de los CP se interpolaron a la curva estandar correspondiente (*5-HT5A* y *actina*) y se obtuvieron las concentraciones de los dos genes en cada una de las muestras, expresadas en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

La Figura 12 representa la cuantificación absoluta para el gen de *serotonina 5-HT5A*, cuyo análisis de varianza dio como resultado una disminución estadísticamente significativa para el tratamiento agudo (A) con respecto a los tratamientos: control (CL), continuo con dosis media (CM) y continuo con dosis completa (CC). Por otro lado, existe un aumento significativo del tratamiento CC con respecto al CM.

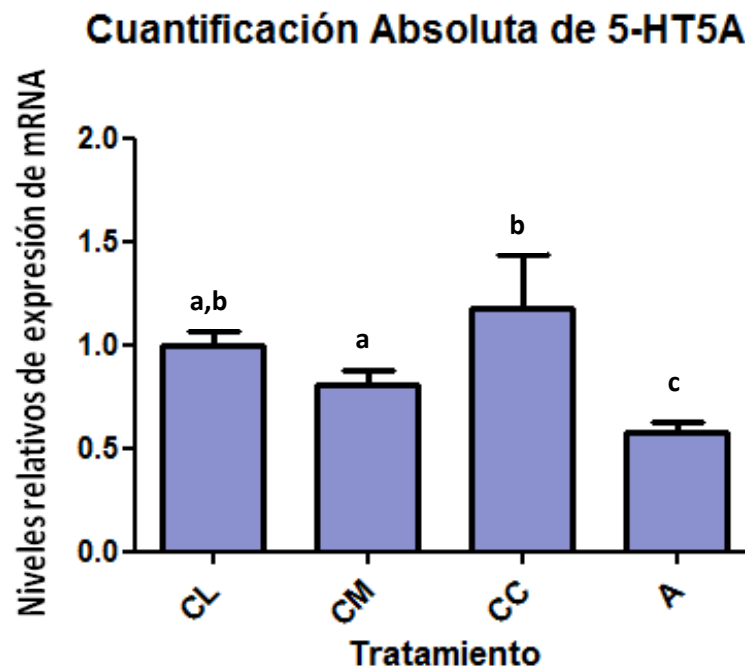


Figura 12. Cuantificación absoluta de la expresión del gen del *receptor de serotonina 5-HT5A*. Control sin tratamiento (CL), tratamiento continuo con dosis media (CM), tratamiento continuo con dosis completa (CC), tratamiento agudo con dosis completa (A). Las letras minúsculas indican diferencia significativa $P < 0.05$.

La cuantificación absoluta para el gen de actina está representada en la Figura 13. En el análisis de varianza, se observa una diferencia significativa entre el tratamiento continuo con dosis media y los demás tratamientos (control, continuo completo y agudo).

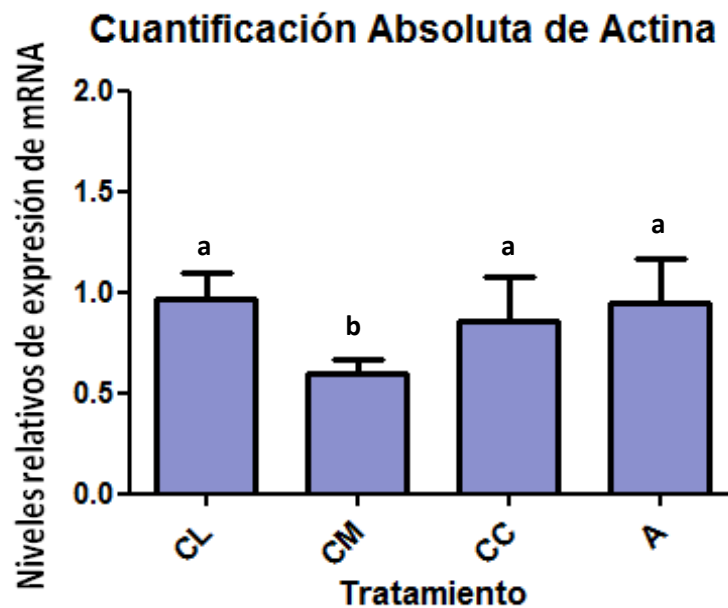


Figura 13. Cuantificación absoluta de la expresión del gen de *actina*. Control sin tratamiento (CL), tratamiento continuo con dosis media (CM), tratamiento continuo con dosis completa (CC), tratamiento agudo con dosis completa (A). Las letras minúsculas indican diferencia significativa $P < 0.05$

V.4. Cuantificación relativa.

Se normalizaron los valores del gen *5-HT5A* respecto a un gen endógeno (*actina*), por medio del cociente de los valores absolutos del gen del *receptor de serotonina 5-HT5A* entre los valores absolutos del gen de *actina*.

La Figura 14 muestra la gráfica resultante de la cuantificación relativa. El análisis de varianza mostró una disminución significativa en la expresión del gen del *receptor*

de serotonina 5-HT5A con el tratamiento agudo (A), y un aumento en la expresión con los tratamientos CM y CC, en relación al tratamiento control.

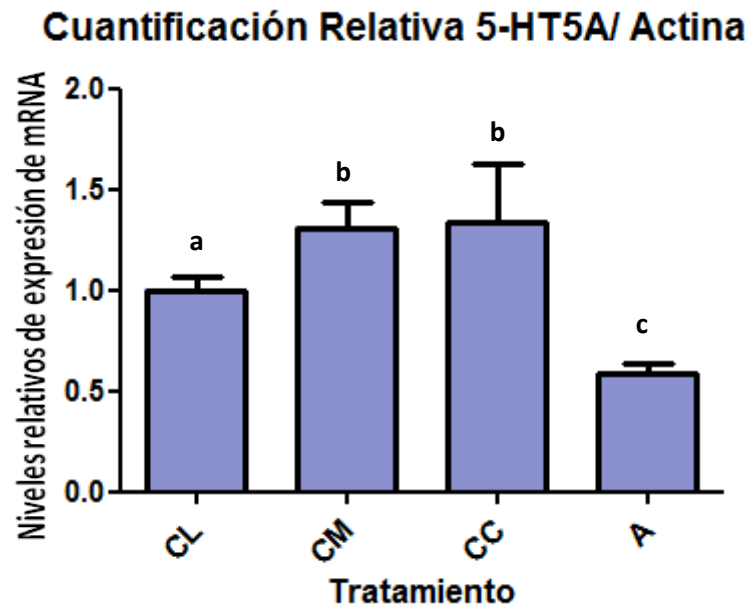


Figura 14. Cuantificación relativa. Niveles relativos de expresión de ARNm del gen del *receptor de serotonina 5-HT5A* referidos a los niveles relativos de expresión de ARNm del gen de *actina*. Control sin tratamiento (CL), tratamiento continuo con dosis media (CM), tratamiento continuo con dosis completa (CC), tratamiento agudo con dosis completa (A). Las letras minúsculas indican diferencia significativa $P < 0.05$.

VI. DISCUSIÓN

Con la finalidad de observar si existían variaciones en los niveles de la expresión genética del *receptor de serotonina 5-HT5A* al aplicar diferentes tratamientos de serotonina, se evaluaron los niveles relativos de expresión del gen del *receptor 5-HT5A* en relación a los niveles de expresión del gen constitutivo *actina* en hipocampo de rata.

Los resultados de la cuantificación relativa denotan un cambio estadísticamente significativo en los niveles de expresión del *receptor 5-HT5A* en hipocampos de rata tratadas con serotonina, observándose un aumento en los dos tratamientos continuos (25 µg/Kg y 50 µg/kg) y una disminución en el tratamiento agudo (50 µg/kg). Este cambio en la expresión del *receptor 5-HT5A* sugiere una regulación mediada indirectamente por la serotonina circulante, ya que la serotonina es incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) (Filip y Bader, 2009).

El paso a través de la BHE es muy selectivo. Para que una sustancia pueda ingresar a cerebro debe contar con un sistema de transporte o ser liposoluble (Betz y col., 1980; Patestas, 2008; Banks, 2009). Un ejemplo de este libre tránsito es la hormona esteroidea corticosterona, esta hormona es capaz de atravesar la BHE por ser liposoluble, ya que es un derivado del colesterol. Existen evidencias de una interacción funcional entre la serotonina y la corticosterona en distintas regiones del cerebro. En el hipocampo se encuentran localizados receptores esteroideos y se ha observado que la expresión génica de algunos receptores de serotonina, ubicados en esta zona, está regulada por la corticosterona (Yau, y col., 1997; McEwen, 2001; Real Academia Nacional de Farmacia, 2011).

Pruebas de inmunohistoquímica revelaron la existencia de altos niveles de los receptores de corticosterona en células de los núcleos del rafe, lugar de síntesis de la serotonina (Härfstrand y col., 1986). Por otro lado, Yau y col. en 1997, trataron a un grupo de ratas adrenalectomizadas y a otro grupo de ratas intactas con MDMA (3,4-metilendioximetanfetamina), que es un psicoestimulante que provoca la liberación de serotonina y corticosterona. Los resultados demostraron un ligero

aumento de la expresión génica del *receptor 5-HT1A* en el giro dentado del hipocampo de las ratas adrenalectomizadas; sin embargo, en ratas intactas no se observaron cambios de la expresión del receptor en esta misma zona. La expresión génica del *receptor 5-HT2C* disminuyó en la región CA1 ventral de las ratas intactas y no sufrió cambios en su expresión en las ratas adrenalectomizadas. Por lo tanto, se sugirió que la modificación en la expresión génica de los *receptores de serotonina 5-HT2C* y *5-HT1A* está mediada por efecto de la corticosterona en el hipocampo de rata; evento por el cual Yau y col. plantearon la existencia de la interacción entre la vía de la corticosterona y la serotonina.

Se propone que el aumento de la expresión del gen del *receptor de serotonina 5-HT5A* en hipocampo de rata podría deberse a que la serotonina administrada vía IP posiblemente induce la liberación de corticosterona, aumentando los niveles en sangre de esta hormona; de modo que al viajar a través del sistema circulatorio y atravesar la BHE, llegaría a hipocampo para unirse con sus receptores mineralocorticoides (MR) y glucocorticoides (GR).

Los GR actúan como receptores nucleares; al estar en contacto con la hormona dimerizan, viajan al núcleo y funcionan como factores transcripcionales uniéndose directamente al ADN o como coactivadores, regulando así la transcripción del gen blanco. Mediante el análisis de la secuencia promotora del gen del *receptor de serotonina 5-HT5A* (SA Biosciences, 2010), se han determinado sitios consenso para el factor de transcripción GR, pudiendo ser directamente este receptor un factor transcripcional regulador de la expresión del gen del *receptor de serotonina 5-HT5A*. Por otro lado, este factor de transcripción interacciona con la proteína de fijación a CREB (CBP) que tiene actividad acetiltransferasa de histonas (HAT). La acetilación de histonas provocaría la laxitud de la cromatina, permitiendo la accesibilidad de la maquinaria basal transcripcional y la unión de factores de transcripción al ADN, activándose así la expresión del *receptor de serotonina 5-HT5A*.

También se ha observado que los glucocorticoides son capaces de reprimir la expresión del *receptor de serotonina 5-HT1A* mediante la interacción del factor de transcripción NF-kB con el GR dimerizado (Wissink y col., 2000). Por medio de esta interacción, el GR dimerizado puede bloquear la unión de NF-kB con proteínas acetilasas, interferir con su sitio de unión al ADN y reclutar proteínas desacetilasa de histonas (HDAC), cuyo efecto es la compactación de la cromatina, lo cual impide la interacción de los factores de transcripción con el ADN (Ito y col., 2000; Revollo y Cidlowski, 2009). La localización de dominios de unión a NF-kB en la secuencia promotora del gen *del receptor de serotonina 5-HT5A* (SA Biosciences, 2010) sugiere este mecanismo como responsable de la disminución de la expresión génica del *receptor 5-HT5A* en hipocampo de las ratas que recibieron el tratamiento agudo.

El contraste del efecto sugerido por la acción de la corticosterona, podría estar dado por la concentración de esta hormona en suero y su posterior paso a cerebro.

Se ha evidenciado que la serotonina tiene un efecto parácrino sobre las glándulas suprarrenales, debido a que en las células glomerulares de la corteza suprarrenal se ha detectado la presencia de sus receptores. En humanos, la serotonina interactúa con el receptor 5-HT4, lo cual provoca la liberación de cortisol; mientras que en ratas interactúa con el receptor 5-HT7 e induce la liberación de aldosterona (Lefebvre y col., 1992; Contesse y col., 1999; Lefebvre y col., 2001). Por tal motivo, se propone que la serotonina circulante podría estar interaccionando con su receptor en las glándulas suprarrenales y de este modo estimularía la liberación de corticosterona.

Por otra parte, la secreción de corticosterona está mediada por el eje hipotálamo pituitario adrenal (HPA). En situaciones de estrés, la hormona liberadora de corticotropina (CRH, por sus siglas en inglés) induce la liberación de la corticotropina a la sangre, la cual provoca la liberación de glucocorticoides. La posible secreción de corticosterona en respuesta a la serotonina circulante, podría deberse a que la dosis externa del neurotransmisor estaría funcionando como

agente estresante, razón por la cual se activaría la respuesta al estrés, liberándose así la corticosterona (Figura 15).

Por lo tanto, los cambios observados en los niveles de expresión del *receptor de serotonina 5-HT5A* en hipocampo de ratas macho tratadas con serotonina, podría deberse al efecto indirecto de la corticosterona por acción de la serotonina circulante.

La corticosterona está implicada en la respuesta al estrés al aumentar el estado de alerta, lo cual activa los procesos cognitivos y la formulación de estrategias para valorar y afrontar la situación (Real Academia Nacional de Farmacia, 2011). Por tal motivo, se propone que la regulación de la expresión del *receptor de serotonina 5-HT5A* mediada por la corticosterona, estaría implicada en la respuesta adaptativa y de recuperación a situaciones de estrés; siendo este dato consistente con observaciones anteriores que demostraron que ratones carentes del receptor 5-HT5A presentan mayor actividad exploratoria al ser expuestos a nuevos ambientes en comparación con los ratones que expresan el receptor (Grailhe y col., 1999).

Para entender mejor de qué manera se encuentran relacionadas estas vías, y confirmar que la serotonina circulante regula la liberación de la corticosterona, es necesario continuar con las investigaciones midiendo los niveles circulantes de corticosterona al administrar la dosis aguda de serotonina. También es necesario analizar si existe un efecto directo de la serotonina sobre las células de la corteza suprarrenal, esto podría realizarse mediante una inmunohistoquímica y observar si existe una colocalización entre la serotonina administrada y sus receptores ubicados en esta zona.

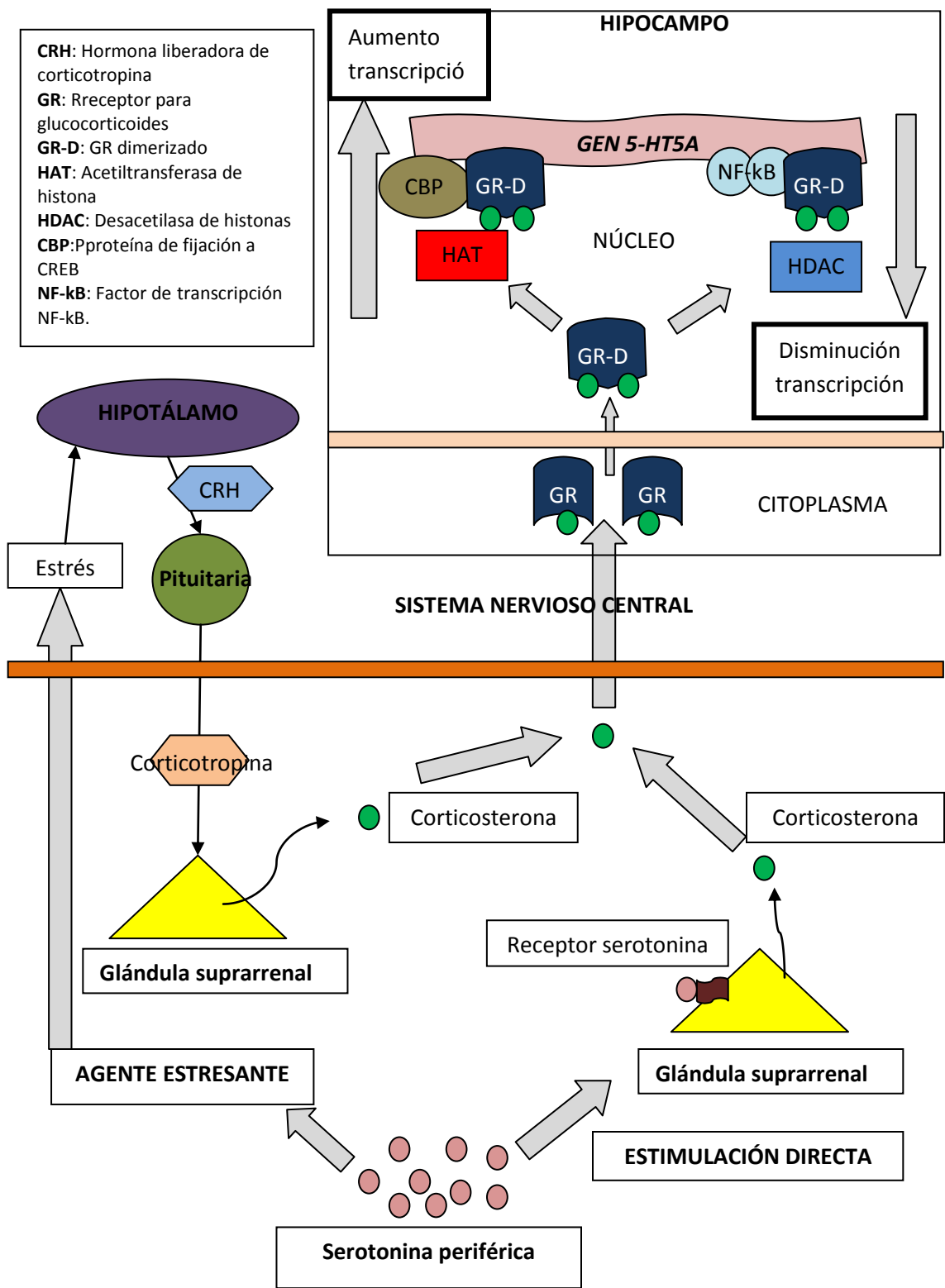


Figura 15. Esquema del posible efecto de la serotonina periférica sobre la regulación del gen del *receptor de serotonina 5-HT5A* (de autoría propia).

VII. CONCLUSIONES

- * Los niveles de expresión del gen del *receptor 5-HT5A* en hipocampo de ratas aumentan con los tratamientos continuos en relación con los niveles de expresión basal.
- * Los niveles de expresión del gen del *receptor 5-HT5A* en hipocampo de ratas disminuyen con el tratamiento agudo en relación con los niveles de expresión basal.
- * La serotonina circulante modifica la expresión del RNAm del *receptor 5-HT5A* en hipocampo de rata.

VIII. REFERENCIAS

- Alberts**, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. **2004**. *Biología Molecular de la Célula*. 4ª ed., Omega, España: 57; 160-161, 831-870.
- Anaya**, J. M., shoenfeld, Y., Correa P. A., García, C. M., Cervera, R. **2005**. *Autoinmunidad y enfermedad autoinmune*. 1ª ed., Corporación para investigaciones biológicas, Colombia: 522.
- Banks**, W. A. **2009**. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BioMed Central Neurology*. Vol. 9(Suppl 1):S3.
- Barnes**, N. M., Sharp, T. **1999**. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*. Vol. 38: 1083–1152.
- Betz**, A. L., Firth, J. A., Goldstein, G. W. **1980**. Polarity of the bloodbrain barrier: distribution of enzymes between the luminal and abluminal membranes of brain capillary endothelial cells. *Brain Research*. Vol. 192: 17– 28.
- Cassano**, P., Argibay, P. **2010**. Depresión y neuroplasticidad. Interacción de los sistemas nervioso, endocrino e inmune. *Medicina (Buenos Aires)*. Vol. 70: 185-193.
- Contesse**, V., Lenglet, S., Grumolato, L., Anouar, Y., Lihrmann, I., Lefebvre, H., Delarue, C., Vaudry, Hubert. **1999**. Pharmacological and Molecular Characterization Of 5 -Hydroxytryptamine7 Receptors In The Rat Adrenal Gland. *Molecular Pharmacology*. Vol. 56: 552–56.
- Duncan**, M. J., Jennes, L., Jefferson, J. B., Brownfield, M. **2000**. Localization of serotonin5A receptors in discrete regions of the circadian timing system in the Syrian hamster *Brain Research*. Vol. 869: 178–185.
- Filip**, M., Bader, M. **2009**. Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacological reports*. Vol. 61: 761-777.
- Fonseca**, M. D., Mateos, A. H., Contreras, B. N. **2010**. *Prácticas de laboratorio de biología molecular: su aplicación en genética básica*. 1ª ed., Universidad el rosario, Colombia: 27.

- García, G., Sarabia, G., Martínez, A., Miledi, R. 2005.** Developmental expression of 5-HT_{5A} receptor mRNA in the rat brain. *Neuroscience Letters*. Vol. 379: 101–105.
- Gerhard, C. C., van Heerikhuizen, H. 1997.** Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. *European Journal of Pharmacology*. Vol. 334: 1–23.
- Grailhe, R., Waeber, C., Dulawa, S. C., Hornung, J. P., Zhuang, X.,* Brunner, D., Geyer, M. A., Hen, R. 1999.** Increased Exploratory Activity and Altered Response to LSD in Mice Lacking the 5-HT_{5A} Receptor. *Neuron*. Vol. 22: 581–591.
- Gutekunst, C. A., Stewart, E. N., Gross, R. E. 2010.** Immunohistochemical distribution of PlexinA4 in the adult rat central nervous system. *Frontiers in Neuroanatomy*. Vol. 4: 1-17.
- Guyton, A. 2001.** Tratado de fisiología médica. 10^a ed., McGraw Hill, México: 629-631, 674, 811-812, 820-828, 832-838, 884.
- Hannon, J., Hoyer, D. 2008.** Molecular biology of 5-HT receptors. *Behavioural Brain Research*. Vol. 195: 198–213.
- Härfstrand, A., Fuxe, K., Cintra, A., Agnati, L.F., Zini, I., Wikström, A.C., Okret, S., Yu, Z.Y., Goldstein, M., Steinbusch, H., Verhofstad, A., Gustafsson, J.A. 1986.** Glucocorticoid receptor immunoreactivity in monoaminergic neurons of rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 83: 9779–9783.
- Hoyer, D., Hannon, J. P., Martin, G. R. 2002.** Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. Vol. 71: 533–554.
- Iceta, R. 2008.** Caracterización del Transportados de seronina Humano en Células Caco-2: Estudio de los Mecanismos de Regulación Fisiológica. Zaragoza, España. Universidad de Zaragoza. Tesis doctoral. 3-18.
- Institute of Laboratory Animal Resources. 1996.**
http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10929#toc
- Ito, K., Barnes, P. J., Adcock, I.M. 2000.** Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1b-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Molecular and cellular biology*. Vol. 20 (18): 6891–6903.

- Karp, G. 2007.** Biología Celular y Molecular, conceptos y experimentos. 4ª ed., McGraw Hill, México: 38-41, 671-689.
- Lefebvre, H., Compagnon, P., Contesse, V., Delarue, C., Thuillez, C., Vaudry, H., Marc Kuhn, J. 2001.** Production and Metabolism Of Serotonin (5-Ht) By The Human Adrenal Cortex: Paracrine Stimulation Of Aldosterone Secretion By 5-Ht. The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism. Vol. 86 (10): 5001–5007.
- Lefebvre, H., Contesse, V., Delarue, C., Feuilloley, M., Hery, F., Grise, P., Raynaud, G., Verhofstad, A. A., Wolf, L. M., Vaudry, H. 1992.** Serotonin-induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin₄ receptor subtype. Neuroscience. Vol. 47(4): 999-1007.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, L., Darnell, J. 2003.** Molecular Cell Biology. 5ª ed., W.H. Freeman and Company, United States of America: 533-567.
- Mares, G. A. S. 2011.** Análisis cuantitativo del ARNm del receptor de serotonina 2c (5-HT 2c) en intestino de rata. Querétaro, Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis licenciatura. 9-17.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E. 2001.** Bioquímica. 2ª ed., McGraw Hill-interamericana, España: 28-29.
- McEwen, B. S. 2001.** Invited Review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. Journal of Applied Physiology. Vol. 91: 2785–2801.
- National Center for Biotechnology Information. 2009.**
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Oliver, K. R., Kinsey, A. M., Wainwright, A., Sirinathsinghji, D.J.S. 2000.** Localization of 5-ht5A receptor-like immunoreactivity in the rat brain. Brain Research. Vol. 867: 131–142.
- Pasqualetti, M., Ori, M., Nardi, I., Castagna, M., Batista, C. G., Marazziti, D. 1998.** Distribution of the 5-HT5A serotonin receptor mRNA in the human brain. Molecular Brain Research. Vol. 56: 1–8.
- Patestas, M. A., Gartner, L. P. 2008.** Neuroanatomía Clínica. 1ª ed., Manual Moderno, México: 101.

Real Academia Nacional de Farmacia. 2011.

<http://www.analesranf.com/index.php/mono/issue/archive>

Revollo, J. R., Cidlowski, J. A. 2009. Mechanisms Generating Diversity in Glucocorticoid Receptor Signaling. *Glucocorticoids and Mood: Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 1179: 167–178

Roberts, C., Price, G. W., Middlemiss, D. N. 2001. Ligands for the investigation of 5-HT autoreceptor function. *Brain Research Bulletin*. Vol. 56: 463–469.

Ruiz, H. X. 2010. Cuantificación del ARNm del transportador 5 de aminoácidos neutros dependiente de sodio (SNAT 5) en corteza de rata durante la ontogenia. Querétaro, Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis licenciatura. 24-28.

SA Biosciences, a QUIAGEN company. 2010.

http://www.sabiosciences.com/chipqpcrsearch.php?gene=HTR5A&factor=Over+200+TF&species_id=2&ninfo=n&ngene=n&nfactor=y

Thibodeau, G. A., Patton, K. T. 2008. Estructura y función del cuerpo humano. 13ª ed., Elsevier España, España: 263-265.

Tresguerres, J. A. 2005. Fisiología Humana. 3ª ed., McGraw Hill, Madrid: 180-182.

Vinueza, B. C. 2009. PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. *Revista electrónica de Veterinaria*. ISSN: 1695-7504, Vol. 10, N° 2: 1-14.

Wissink, S., Meijer, O., Pearce, D., Van Der Burg, B., Van Der Saag, P. T. 2000. Regulation Of The Rat Serotonin-1a Receptor Gene By Corticosteroids. *The Journal Of Biological Chemistry*. Vol. 275 (2): 1321–1326.

Yau, J. L. W., Noble, J., Seckl, J. R. 1997. Site-specific regulation of corticosteroid and serotonin receptor subtype gene expression in the rat hippocampus following methylenedioxymethamphetamine: role of corticosterone and serotonin. *Neuroscience*. Vol. 78: 111–121.