

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“COEXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES A SEROTONINA 5-HT_{2C} Y 5-HT_{5A} DURANTE EL DESARROLLO DEL INTESTINO DE RATA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JESÚS CARLOS MENDIOLA PRÉCOMA

DIRIGIDA POR

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2013.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“COEXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES A SEROTONINA 5-HT_{2C} Y 5-HT_{5A} DURANTE EL DESARROLLO DEL INTESTINO DE RATA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JESÚS CARLOS MENDIOLA PRÉCOMA

DIRIGIDA POR

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SINODALES

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER _____

DIRECTOR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA _____

SINODAL

I.Q. en Al. KARLA M. PADILLA OLVERA _____

SINODAL

M. en C. ALMA DELIA BERTADILLO JILOTE _____

SINODAL

ÍNDICE GENERAL

| Contenido | Página |
|--|--------|
| ÍNDICE GENERAL | i |
| ÍNDICE DE CUADROS | iii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | iv |
| RESUMEN | |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Serotonina (5-Hidoxitriptamina) | 1 |
| 1.2 Intestino delgado | 2 |
| 2. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 Receptores a serotonina | 3 |
| 2.1.1 Receptores a serotonina en intestino | 4 |
| 2.1.1.1 Receptores 5-HT ₂ | 6 |
| 2.1.1.1.1 Receptores 5-HT _{2C} | 6 |
| 2.1.1.1.2 Receptores 5-HT _{5A} | 8 |
| 2.2 Desarrollo del intestino | 9 |
| 2.2.1 Sistema nervioso del intestino delgado | 10 |
| 2.2.2 Tipos celulares de la mucosa del intestino delgado | 12 |
| 2.3 Comunicación celular a través de neurotransmisores | 14 |
| 3. HIPÓTESIS | 17 |
| 4. OBJETIVOS | 18 |
| 4.1 General | 18 |
| 4.2 Específicos | 18 |
| 5. METODOLOGÍA | 19 |
| 5.1 Reactivos | 19 |
| 5.2 Materiales | 19 |
| 5.3 Equipos | 20 |
| 5.4 Animales | 20 |

| | | |
|-------|----------------------------|----|
| 5.5 | Preparación de reactivos | 20 |
| 5.6 | Preparación de los tejidos | 21 |
| 5.6.1 | Fijación de tejidos | 21 |
| 5.6.2 | Crioprotección de tejidos | 21 |
| 5.6.3 | Cortes del tejido | 21 |
| 5.7 | Inmunohistoquímica | 21 |
| 6. | RESULTADOS | 23 |
| 7. | DISCUSIÓN | 32 |
| 8. | CONCLUSIÓN | 37 |
| 9. | REFERENCIAS | 38 |

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Subtipos de receptores de serotonina | 5 |
| 2 | Algunas acciones de la 5-HT en el aparato digestivo | 7 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Estructura química de la serotonina | 1 |
| 2 | Síntesis de serotonina a partir de L-triptófano | 2 |
| 3 | Fisiología del intestino delgado | 3 |
| 4 | Cascada de señalización del receptor serotoninérgico 5-HT _{2C} . | 8 |
| 5 | Vías de conexión del sistema nervioso con el intestino delgado | 11 |
| 6 | Tipos celulares de intestino delgado | 13 |
| 7 | Comunicación neuronal | 14 |
| 8 | Sinapsis nerviosa mediante la recaptación de serotonina | 15 |
| 9 | Control negativo | 24 |
| 10 | Blancos de la técnica con anticuerpo secundario Alexa Fluor 568 (A) y Alexa Fluor 488 (B). | 24 |
| 11 | Localización del receptor 5-HT _{5A} en intestino proximal de rata P0 con 6 hrs. de fijación y anticuerpo secundario Alexa Fluor 568. | 25 |
| 12 | Localización del receptor 5-HT _{2C} en intestino distal de rata P0 con 6 hrs de fijación y anticuerpo secundario Alexa Fluor 568. | 26 |
| 13 | Localización del receptor 5-HT _{2C} en intestino proximal de rata adulta con 6 hrs. de fijación y anticuerpo secundario Alexa Fluor 568. | 27 |
| 14 | Localización del receptor 5-HT _{2C} en intestino proximal de rata adulta con 6 hrs. de fijación y anticuerpo secundario Alexa Fluor 568. | 27 |
| 15 | Localización del receptor 5-HT _{2C} en intestino distal de rata adulta con 6 hrs. de fijación y anticuerpo secundario Alexa Fluor 568. | 28 |
| 16 | Localización del receptor 5-HT _{5A} en intestino proximal de rata adulta con 6 hrs. de fijación y anticuerpo secundario Alexa Fluor 488. | 28 |
| 17 | Localización del receptor 5-HT _{5A} en intestino distal de rata adulta con 6 hrs. de fijación y anticuerpo secundario Alexa Fluor 488. | 29 |
| 18 | Localización del receptor 5-HT _{5A} en intestino distal de rata adulta con 6 hrs. de fijación y anticuerpo secundario Alexa Fluor 488. | 29 |
| 19 | Coexpresión de los receptores a serotonina 5-HT _{5A/2C} en intestino proximal de rata adulta con 6 hrs. de fijación y anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 568. | 30 |

20 Coexpresión de los receptores a serotonina 5-HT_{5A/2C} en intestino distal de rata adulta con 6 hrs. de fijación y anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 568.

31

RESUMEN

La serotonina es un estimulante potente del músculo liso del tubo digestivo, y en él intensifica su tono y facilita el peristaltismo. Las acciones en cuestión son causadas por la actividad directa de la serotonina en los receptores 5-HT₂ de músculo liso, además de una acción estimulante en células ganglionares que están en el sistema nervioso entérico. En las últimas décadas se han podido identificar hasta siete tipos de receptor 5-HT, los cuales se designan de 5-HT₁ a 5-HT₇. El receptor 5-HT_{5A} ha sido poco estudiado en el intestino. En este trabajo se estudió la coexpresión de los receptores 5-HT_{5A} y 5-HT_{2C} en el intestino de rata neonata y adulta en las porciones distal y proximal para conocer su distribución y ver la posibilidad de considerarlos blancos terapéuticos de medicamentos contra trastornos gastrointestinales o problemas en la digestión de los alimentos. Se utilizaron técnicas de inmunofluorescencia. Los resultados indicaron que la coexpresión de los receptores serotoninérgicos 5-HT_{5A} y 5-HT_{2C} se encuentra diferencialmente distribuida entre la lámina propia y las células epiteliales de las vellosidades en las porciones distal y proximal únicamente de rata adulta.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Serotonina (5-Hidroxitriptamina)

La serotonina es una monoamina neurotransmisora sintetizada por las neuronas serotoninérgicas del sistema nervioso central y las células enterocromafines del sistema digestivo (Chávez León, 2008).

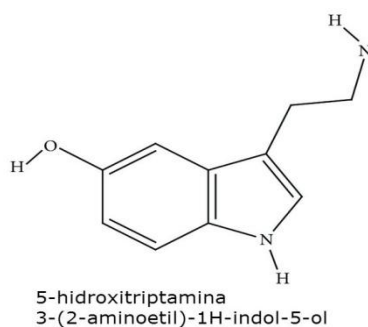


Figura 1. Estructura química de la serotonina (5-hidroxitriptamina). Modificado de Berumen, 2011.

La serotonina cumple la función de regular la motilidad gastrointestinal. La serotonina es almacenada y secretada en las células enterocromafines y las plaquetas. Aunque las reservas periféricas constituyen gran parte de la 5-HT del cuerpo, esta monoamina actúa también como neurotransmisor en el SNC.

La serotonina ha sido considerada como un neurotransmisor importante, así como hormona local en el intestino y componente del proceso de coagulación por parte de plaquetas. Las plaquetas son el principal lugar de almacenamiento de la serotonina en la circulación, debido a que tienen una amplia capacidad para conducirla activamente a los gránulos densos, las plaquetas activas liberan serotonina de los gránulos densos (Córdova-Pluma y col., 2011).

La serotonina está ampliamente distribuida en la naturaleza, y se localiza en tejidos vegetales y animales, venenos y sustancias urentes (depositadas en picaduras). Se

sintetiza en sistemas biológicos a partir del aminoácido L-triptófano por hidroxilación del anillo indólico, a la que sigue descarboxilación del aminoácido. Después de la síntesis de la serotonina, la amina libre es almacenada o inactivada a muy corto plazo, por lo común por oxidación por parte de la monoaminoxidasa (MAO). En la glándula pineal la serotonina es una precursora de la melatonina, hormona estimulante de melanocitos. En los mamíferos (incluidos los seres humanos), más de 90% de la serotonina en el organismo se encuentra en las células enterocromafines en el tubo digestivo (Brunton, 2012).

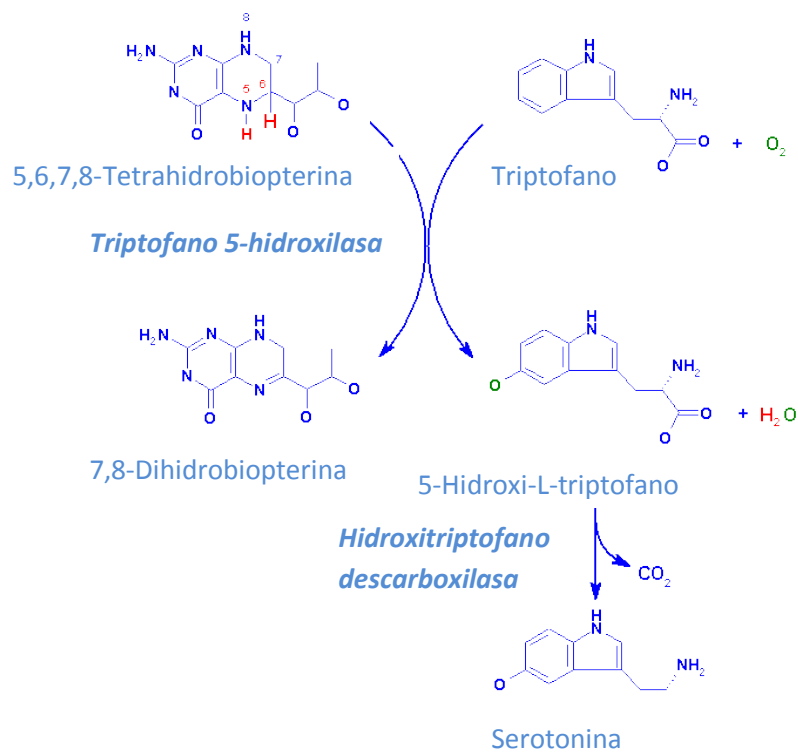


Figura 2. Síntesis de serotonina a partir de L-triptófano. Modificado de Iceta, 2008

1.2 Intestino delgado

La serotonina está presente en el intestino delgado, que es el segmento del tubo digestivo de mayor longitud; comienza en la vertiente duodenal del píloro, y termina a nivel de la válvula ileocecal, también denominada válvula de Bahuin. Su longitud

es de 4 a 7 m, dependiendo del tono de la pared muscular. Se divide en tres regiones: duodeno, yeyuno e íleon como se muestra en la figura 3.

La actividad motora del intestino delgado tiene dos finalidades: 1) facilitar la digestión y la absorción de los alimentos favoreciendo la propulsión del quimo, y 2) una función defensiva, impidiendo la proliferación bacteriana y reduciendo el tiempo de contacto de algunos componentes agresivos de la dieta (Fernández-Tresguerres, 2010).

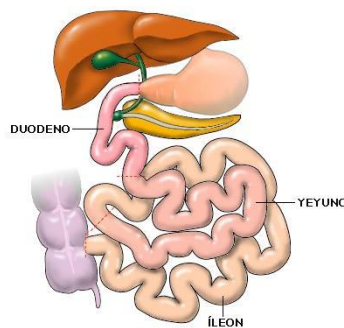


Figura 3. Secciones del intestino delgado

2. ANTECEDENTES

2.1 Receptores a serotonina

La serotonina posee innumerables acciones, y al igual que la histamina, muestra diferencias entre muchas especies, lo cual dificulta las generalizaciones. Las acciones de la serotonina son mediadas por un número extraordinariamente grande de receptores de membrana celular (cuadro 1). Se han identificado siete familias de subtipos del receptor 5-HT, seis que incluyen los receptores acoplados a proteína G del tipo 7 pases transmembranales y un canal iónico regulado por ligando. Este último receptor (5-HT₃) es un miembro de la familia de ácido nicotínico/GABA_A de las proteínas de los conductos de sodio y potasio.

La serotonina es un estimulante potente del músculo liso del tubo digestivo, y en ellas intensifica su tono y facilita el peristaltismo. Las acciones en cuestión son causadas por la actividad directa de la serotonina en los receptores 5-HT₂ de músculo liso, además de una acción estimulante en células ganglionares que están en el sistema nervioso entérico. La activación de los receptores 5-HT₄ en el sistema nervioso entérico hace que se intensifique la liberación de acetilcolina, y con ello media el efecto procinético o de intensificación de la motilidad, propio de agonistas selectivos de la serotonina.

2.1.1 Receptores a serotonina en intestino

Las células enterocromafines en la mucosa gástrica constituyen el lugar de síntesis y la mayor parte del almacenamiento de 5-HT en el organismo y constituyen la fuente de 5-HT circulante. La liberación basal de 5-HT intestinal, aumenta por la distensión mecánica, como la causada por los alimentos, así como por el estímulo vagal eferente.

En el tracto digestivo, cuando la serotonina es liberada por las células enterocromafines, da origen a una gran diversidad de respuestas motoras y sensoriales a través de neuronas del plexo submucoso y mientérico, y de absorción y secreción, a través del propio epitelio intestinal. Tanto los plexos como el epitelio intestinal responden a la 5-HT a través de una gran diversidad de receptores serotoninérgicos, lo cual permite modular la actividad digestiva. De este modo, la 5-HT inicia respuestas tan diversas como náuseas, vómitos, secreción intestinal y peristaltismo, desarrollando un papel importante como neurotransmisor (Gershon, 2006). Por otro lado, induce la alteración de la absorción intestinal de nutrientes (Salvador y col., 1997) y de la secreción de agua y electrolitos (Hardcastle y col., 1999), para lo cual desarrolla su actividad como sustancia endocrina/paracrina.

Cuadro 1. Subtipos de receptores de serotonina

| Subtipo de receptor | Distribución | Mecanismo posreceptor |
|----------------------|---|--|
| 5-HT _{1A} | Nucleos de Rafe, hipocampo | Gi, ↓ cAMP |
| 5-HT _{1B} | Sustancia negra, globo pálido, ganglios basales | Gi, ↓ cAMP |
| 5-HT _{1D} | Cerebro | Gi, ↓ cAMP |
| 5-HT _{1E} | Corteza cerebral | Gi, ↓ cAMP |
| 5-HT _{1F} | Corteza cerebral, hipocampo | Gi, ↓ cAMP |
| 5-HT _{1P} | Sistema nervioso entérico | Go, EPSP lento |
| 5-HT _{2A} | Plaquetas, músculo liso, corteza cerebral | Gq, ↑ IP3 |
| 5-HT _{2B} | Fondo del estómago | Gq, ↑ IP3 |
| 5-HT _{2C} | Coroides, hipocampo, sustancia negra | Gq, ↑ IP3 |
| 5-HT ₃ | Área postrema, nervios sensitivo y entérico | El receptor es un conducto iónico de sodio y potasio |
| 5-HT ₄ | Neuronas del SNC y mientéricas, músculo liso | Gs, ↓ cAMP |
| 5-HT _{5A,B} | Cerebro | ↓ cAMP |
| 5-HT _{6,7} | Cerebro | Gs, ↓ cAMP |

Existen por lo menos seis subtipos de receptores de 5-HT (cuadro 2), que estimulan o inhiben la motilidad del músculo liso gástrico o intestinal.

La 5-HT intestinal desencadena contracciones peristálticas cuando es liberada en respuesta a la acetilcolina, al estímulo de los nervios simpáticos, la elevación de la presión intraluminal y al pH reducido (Brunton, 2012).

2.1.1.1 Receptores 5-HT₂

Existen tres subtipos de receptores a serotonina 5-HT₂, los cuales se acoplan con las proteínas Gq/G₁₁ insensibles a la toxina pertussis y activan a la fosfolipasa C, generando de esta manera dos mensajeros, el diacilglicerol (cofactor en la activación de la PKC) y el inositoltrifosfato (que moviliza los depósitos intracelulares de Ca²⁺). Asimismo, los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} activan a la fosfolipasa A₂ (figura 4), fomentando la liberación de ácido araquidónico (Brunton, 2012).

Barnes y Sharp, en 1999, mencionaron que una característica de todos los genes en la familia de receptores 5-HT₂ es que tienen dos intrones (en el caso tanto de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2B}) o tres intrones (receptores 5-HT_{2C}) en la secuencia de codificación (Barnes, 1999).

2.1.1.1.1 Receptores 5-HT_{2C}

Los receptores 5-HT_{2C} abundan en el plexo coroideo, tejido epitelial que constituye el sitio principal donde se produce el líquido cefalorraquídeo. El receptor 5-HT_{2C} se ha implicado en el control de la producción de líquido cefalorraquídeo, el hábito alimenticio y el estado de ánimo (Kimura, 2009). El receptor 5-HT_{2C} es el único receptor acoplado a proteínas G regulado por medio de la edición de RNA. Este mecanismo genera muchas isoformas de receptores 5-HT_{2C} con modificaciones en los tres aminoácidos dentro de la segunda asa intracelular; las isoformas editadas o modificadas tienen diversas eficiencias en el acoplamiento a la proteína G modificada. Existen variantes empalmadas de receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}, pero no codifican proteínas estructurales (Brunton, 2012).

Cuadro 2. Algunas acciones de la 5-HT en el aparato digestivo

| LUGAR | RESPUESTA | RECEPTOR |
|---|---|--|
| Células enterocromafines | Liberación de 5-HT Inhibición de la liberación de 5-HT | 5-HT ₃ 5-HT ₄ |
| Células de los ganglios intestinales (presinápticas) | Liberación de ACh Inhibición de la liberación de ACh | 5-HT ₄ 5-HT _{1P} , 5-HT _{1A} |
| Células de los ganglios intestinales (postsinápticas) | Despolarización rápida Despolarización lenta | 5-HT ₃ 5-HT _{1P} |
| Músculo liso intestinal | Contracción | 5-HT _{2A} |
| Músculo liso del fondo gástrico | Contracción | 5-HT _{2B} |
| Músculo liso del esófago | Contracción | 5-HT ₄ |

Se han utilizado recientemente anticuerpos específicos de 5-HT_{2C} para mostrar el resultado de la presencia de la proteína del receptor en el plexo coroideo (mayor densidad) y en un nivel inferior en la corteza cerebral, hipocampo, el cuerpo estriado, y la sustancia negra de rata y una distribución similar en el hombre (Kennett, 1994).

Los estudios actuales investigan la expresión de receptores a la serotonina involucrados en la regulación central de la ingesta de alimentos, el apetito y el gasto de energía, con especial énfasis en el nivel de la edición del receptor 5-HT_{2C} (Schellekens, 2012).

La clonación parcial del receptor a 5-HT_{2C} en ratón fue seguido por la secuenciación del clon de longitud completa, inicialmente la rata, luego en el ratón y el humano (Barnes, 1999).

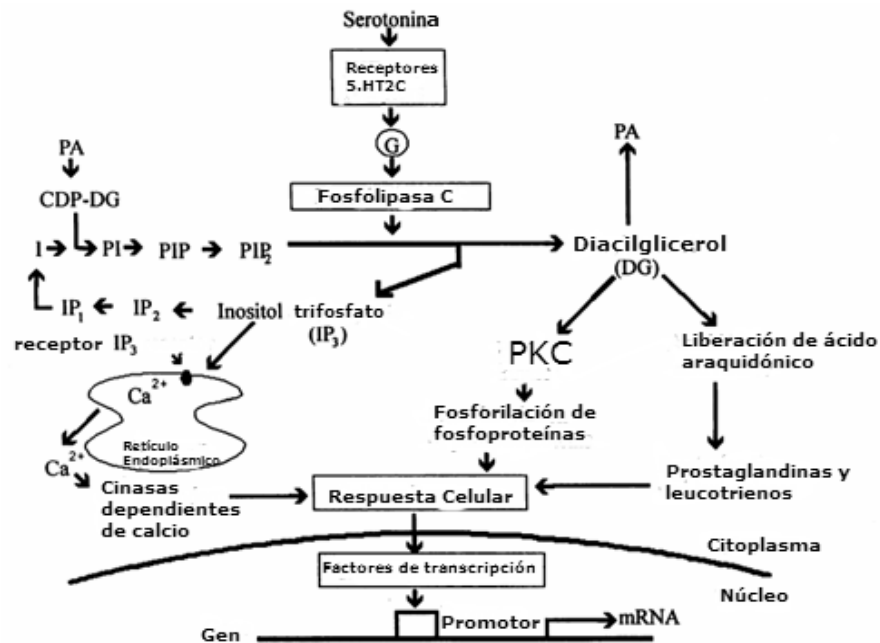


Figura 4. Cascada de señalización del receptor serotoninérgico 5-HT_{2C}. Modificado de Bonn, 2011.

2.1.1.1.2 Receptores 5-HT_{5A}

Estos receptores, están acoplados negativamente a la adenilatociclasa, vía proteína G inhibitoria (Gi) (Grailhe, 2001). Noda en 2003 reportó que la activación de 5-HT_{5A} provoca múltiples mecanismos de señalización y regulan la función neuronal en una forma más compleja.

El receptor 5-HT_{5A} está formado por 357 aminoácidos y en el humano tiene una localización cromosomal 7q336.1 mientras que en la rata se encuentra en el cromosoma 4q11 (Hannon y Hoyer, 2008). A la fecha ha sido clonado a partir de ratón, rata, cerdo y humano (Thomas, 2006).

2.2 Desarrollo del intestino

La madurez del intestino delgado es un reflejo de la duración del período de gestación. A pesar de las diferencias temporales en la ontogenia del intestino delgado entre las especies, los procesos involucrados en su desarrollo del intestino delgado son similares. Así, el intestino humano pasa a través de cada una de las etapas que se producen en roedores, de modo que los estudios con animales se pueden utilizar para entender mejor el desarrollo del intestino humano.

El desarrollo del intestino delgado se compone de tres etapas: (1) proliferación celular y la morfogénesis, (2) diferenciación celular, y (3) maduración funcional. Gastrulación es el proceso mediante el cual el intestino primitivo se forma. Este consiste en el endodermo, el precursor al revestimiento epitelial del tracto gastrointestinal (GI), rodeado por mesénquima. En los seres humanos, este proceso se inicia a las tres semanas de gestación. Las funciones fisiológicas atribuidas al intestino delgado, se desarrollan los últimos 7 días del período gestacional de la rata, compuesto de 21, donde un rápido y complejo remodelamiento de procesos llevará a la formación de las vellosidades. En el día 13, el epitelio consiste únicamente de una célula indiferenciada. En los próximos 4 días se somete a una estratificación de células hasta obtener 8 capas. Para el día 17, comienza la aparición de vellosidades y en el día 19 la citodiferenciación se vuelve aparente. Para el día 21 el epitelio establece un área restringida de proliferación a partir del tercio terminal de cada vellosidad (Sanderson y Walker, 1999).

A continuación, hay una transición en epitelio cilíndrico, con el desarrollo de enterocitos polarizados, y la formación de la membrana basolateral del enterocito. La formación de las vellosidades incipientes y microvellosidades ocurre simultáneamente, con la proliferación celular detectable a lo largo de las vellosidades. En los seres humanos, la formación de la vellosidad se inicia de la 9 a 10 semanas de gestación y procede en una dirección craneal-caudal. Luego sigue el desarrollo de las criptas intestinales en los seres humanos, pero en los roedores,

las criptas no se desarrollan hasta después del nacimiento. El feto humano y la rata neonatal tienen vellosidades transitorias como las estructuras en el colon proximal con propiedades similares a enterocitos.

Las células de la mucosa intestinal (los antagonistas, las células enteroendócrinas, células de Paneth y las de copa) están compartimentadas dentro de la unidad de la cripta de la vellosidad. Los cuatro tipos de células diferenciadas de la mucosa intestinal se derivan de uno o más células madre pluripotentes ubicadas en cada cripta intestinal.

La proliferación celular se produce en las criptas, las células diferenciadas llenan las vellosidades, y el equilibrio dinámico entre la proliferación y la diferenciación es equilibrada por apoptosis de las células senescentes (Drozowski, 2010).

2.2.1 Sistema nervioso del intestino delgado

La función motora del intestino delgado depende directamente de la actividad contráctil del músculo liso de la pared intestinal que es integrada y regulada por el sistema nervioso central (SNC), los nervios autónomos y el sistema nervioso entérico (SNE). Por otra parte, las células intersticiales de Cajal (CIC), y distintas hormonas modulan la frecuencia y el patrón de las contracciones del intestino delgado.

El SNC está conectado con el SNE por los sistemas nerviosos simpático y parasimpático (Fig. 5). La inervación simpática toracolumbar excita los esfínteres e inhibe el músculo no esfinteriano, mientras que la estimulación eferente parasimpática craneal y sacra excita el músculo no esfinteriano.

El sistema nervioso entérico o “segundo cerebro” es un sistema nervioso independiente formado por unas 100 millones de neuronas. Está situado en dos plexos, uno entre las capas de músculo circular y longitudinal, denominado plexo mientérico o plexo de Auerbach, y el otro entre la muscularis mucosae y el músculo

circular, denominado plexo submucoso o de Meissner. El SNE desempeña importantes cometidos en los estados fisiológicos normales, incluyendo la motilidad, secreción, microcirculación y la función inmunológica. Se han identificado diferentes tipos de neuronas y más de 20 neurotransmisores en el SNE implicados en esas funciones, entre los que se encuentran la acetilcolina y la serotonina.

El SNE puede actuar en forma directa en los sistemas efectores del intestino, incluyendo el músculo liso, o pueden hacerlo de manera indirecta mediante su acción sobre las células intermedias, que comprenden las células endócrinas, las células intersticiales de Cajal y las células del sistema inmunitario, como los mastocitos (Fernández-Tresguerres, 2010).

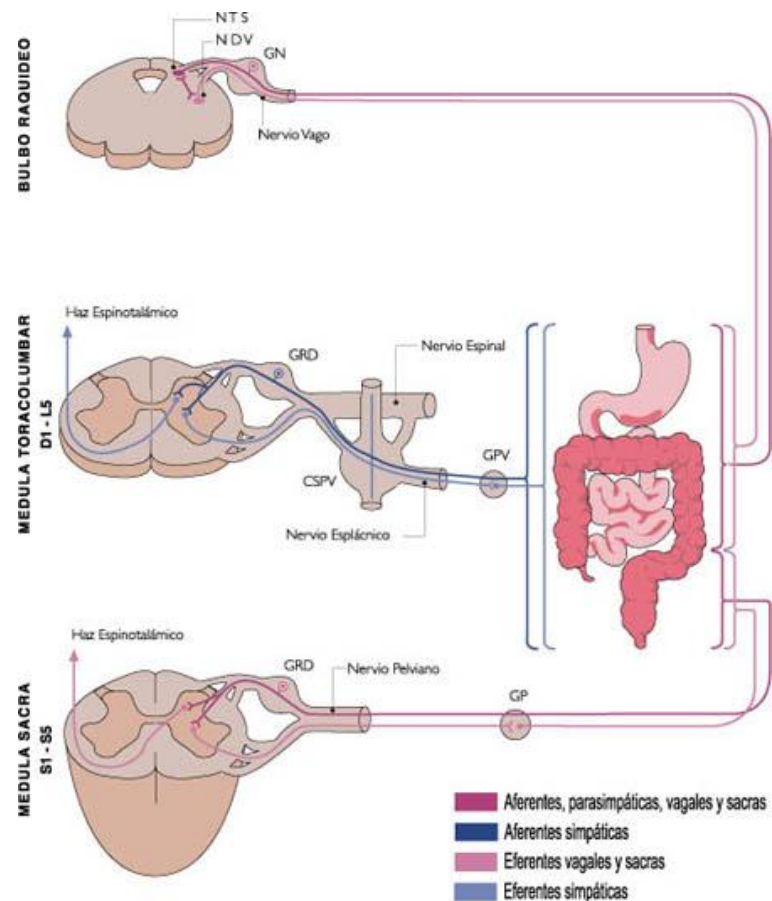


Figura 5. Vías de conexión del sistema nervioso con el intestino delgado

2.2.2 Tipos celulares de la mucosa del intestino delgado

A. Células epiteliales, tienen una función fundamental de absorción y reciben el nombre de enterocitos. Tienen varias estructuras que se relacionan de manera directa con su función:

- Las microvellosidades constituyen el ribete en cepillo, el cual está recubierto por el glucocáliz, una estructura fibrosa en la que hay numerosas enzimas y otras proteínas no enzimáticas que actúan como receptores o como transportadores de diversas sustancias (aminoácidos, iones, sacáridos, etc.).
- La membrana latero-basal o baso-lateral. Se denomina así a toda la superficie del enterocito que no está en contacto directo con la luz intestinal. En el polo opuesto a la luz está unida a la membrana basal, y en las zonas laterales presenta los llamados “complejos de unión”, que son superficies de contacto entre los enterocitos. Son muy abundantes en el intestino proximal.

B. Células de Paneth, que son también células epiteliales, pero tienen menos microvellosidades que las anteriores. Segregan lisozima y son, además, células fagocitarias, regulan la población bacteriana intestinal (Junqueira y Carneiro, 2005).

C. Células calciformes, que se conocen también como células en copa, existen en el intestino delgado y en el grueso. Segregan moco y su actividad responde a factores químicos y a la irritación mecánica. Están repartidas a lo largo de todo el tubo digestivo.

D. Células endocrinas, se llama también sistema endocrino intestinal o sistema endocrino difuso. Hay tipos diferentes de células que sintetizan todo tipo de

hormonas: gastrina, secretina, glucagon, somatostatina, histamina, serotonina, sustancia P, etc. Estas células se comunican a veces con la luz, y otras se localizan en la profundidad de la pared intestinal. En general, las células endocrinas y nerviosas actúan como sensores, mientras que las hormonas y los neurotransmisores secretados por ellas lo hacen como mensajeros. Se puede decir que las células endocrinas, el plexo entérico y el sistema nervioso autónomo, coordinan la función del sistema digestivo, y actúan mediante mecanismos de naturaleza paracrina, endocrina o neurocrina (Guyton y Hall, 2001).

E. Células pertenecientes al sistema inmunitario, como linfocitos, macrófagos, células plasmáticas, monocitos, eosinófilos, macrófagos especializados que se denominan células M, etc. Están dispersas por todo el tubo digestivo.

F. Otras células, las células multivesiculares contienen cuerpos residuales amorfos que no pueden digerirse, y quedan englobados en vesículas rodeadas de membranas (Fernández-Tresguerres, 2012).

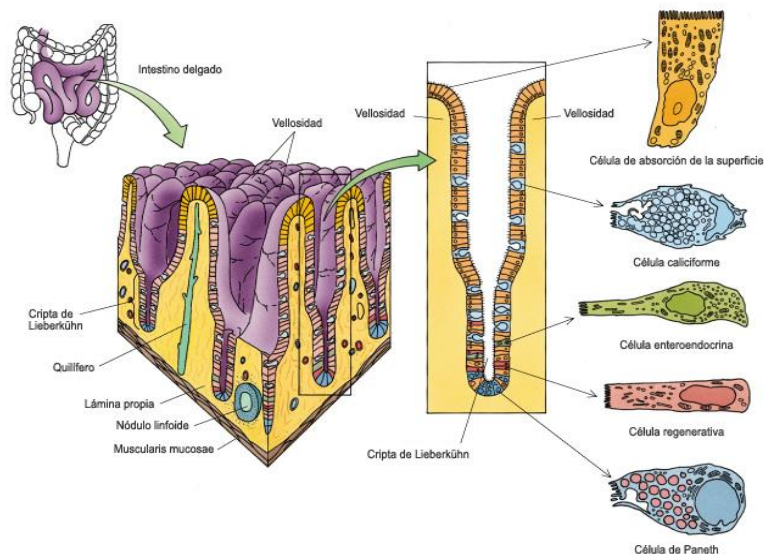


Figura 6. Tipos celulares de intestino delgado

2.3 Comunicación celular a través de neurotransmisores

Las neuronas están vinculadas con sus células blanco mediante uniones especializadas llamadas sinapsis (Karp, 2011). Los dos tipos más extendidos de sinapsis en el encéfalo son la química y la eléctrica. La inmensa mayoría son sinapsis químicas. Una neurona, el elemento presináptico, libera un transmisor que se une a la neurona postsináptica a la que excita o inhibe. En las sinapsis químicas, la transmisión de la señal es unidireccional, siempre desde la terminación axonal a la dendrita o al soma postsinápticos (Hall, 2007).

Un potencial de acción en la fibra presináptica se propaga hacia la terminal sináptica y activa conductos de calcio sensibles al voltaje en su membrana. El calcio fluye hacia la terminal y el aumento de concentración del ión en su interior promueve la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana presináptica. El transmisor contenido en las vesículas se libera hacia la hendidura sináptica y se difunde hacia los receptores en la membrana postsináptica. La unión del transmisor a su receptor causa un breve cambio en la conductancia de la membrana (permeabilidad a los iones) de la célula postsináptica (figura 7) (Katzung, 2010).

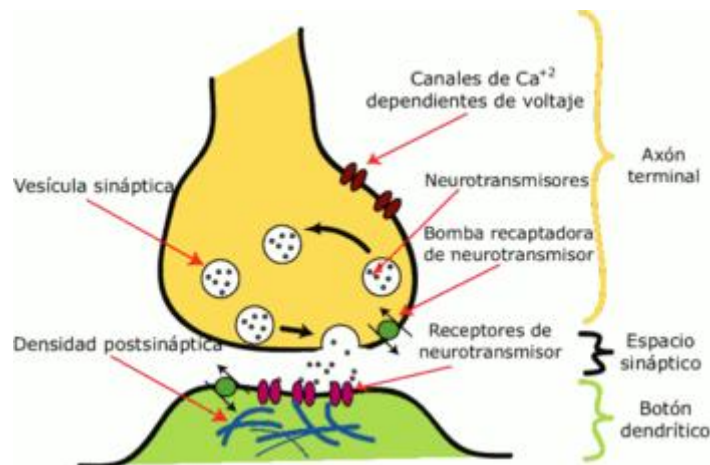


Figura 7. Comunicación neuronal

Los receptores son proteínas complejas, con: 1) un dominio de acción que se extiende hacia la hendidura sináptica, y 2) un ionóforo que se extiende por la membrana hacia el interior de la estructura postsináptica. El ionóforo puede ser un canal iónico específico para un ión determinado o constituir un segundo mensajero activador (Hall, 2007).

Como puede observarse en la figura 8, para que una sustancia sea reconocida como neurotransmisor debe cumplir con ciertos criterios como son: a) estar presente y ser almacenada en el terminal presináptico junto con la maquinaria de enzimas necesarias para su síntesis; b) ser liberada al espacio extracelular en respuesta a despolarización presináptica, de manera Ca^{2+} dependiente (exocitosis); c) debe haber receptores específicos para cada neurotransmisor en la membrana postsináptica; d) contar con un sistema que elimina de manera rápida el transmisor una vez liberado al espacio sináptico (Fernández-Tresguerres, 2010).

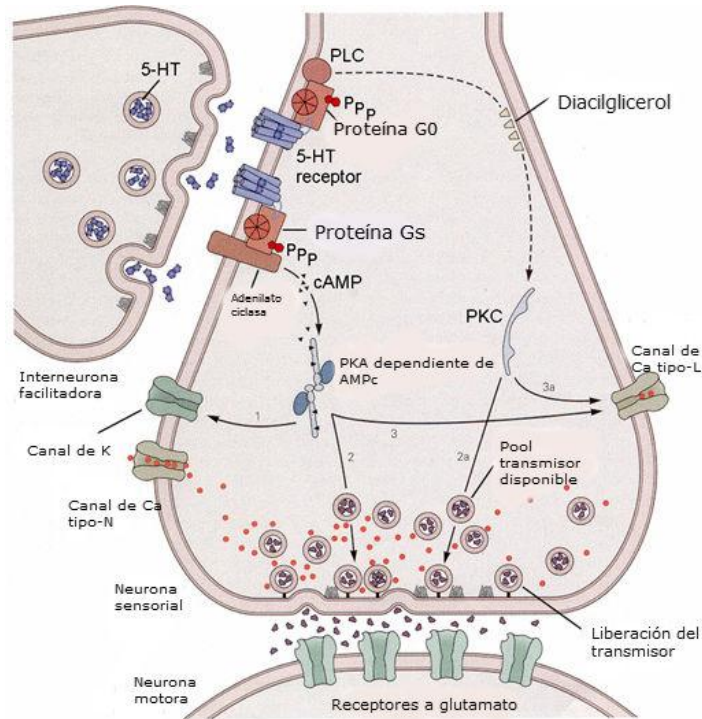


Figura 8. Sinapsis nerviosa mediante la recaptación de serotonina

Como la liberación del neurotransmisor es dependiente de la cantidad de calcio que entra y estos canales son dependientes de voltaje, el canal de calcio permanecerá abierto durante un mayor tiempo tras la modificación sufrida, siendo la consecuencia final un ajuste en la biofísica de la terminal que permite que haya más calcio y, con ello, mayor liberación del neurotransmisor, viéndose incrementada la fuerza sináptica (sensibilización) (Pascual, 2012).

Se han localizado muchos transmisores y enzimas participantes en su síntesis y catabolismo en las terminaciones nerviosas mediante procedimientos de inmunohistoquímica, una técnica en la cual se marcan anticuerpos dirigidos contra una sustancia en específico y se aplican en el cerebro y otros tejidos (Ganong, 2006).

3. HIPÓTESIS

Los receptores a serotonina 5-HT_{2C} y 5-HT_{5A} están en diferentes tipos celulares durante el desarrollo del intestino de rata.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Estudiar la coexpresión de los receptores 5-HT_{2C} y 5-HT_{5A} durante el desarrollo del intestino de rata mediante inmunofluorescencia.

4.2 Específicos

- Identificar los receptores 5-HT_{2C} en intestino proximal y distal de ratas de edad adulta y neonatal, por el método de inmunofluorescencia.
- Identificar los receptores 5-HT_{5A} en intestino proximal y distal de ratas de edad adulta y neonatal, por el método de inmunofluorescencia.
- Estudiar la coexpresión de los receptores 5-HT_{2C} y 5-HT_{5A} en distintos tipos celulares de intestino delgado de rata.

5. METODOLOGÍA

5.1 Reactivos

- Solución buffer de sales de fosfatos (PBS) 10 X
- Solución de para-formaldehido (PFA) al 4 %
- Sacarosa al 30 % en PBS 1 X
- Solución buffer de fosfato con Tritón X-100 (PBT)
- Medio congelador de tejidos Jung
- Albúmina sérica bovina al 3% en PBT
- Poli-L-lisina
- Anticuerpo primario contra 5-HT_{2C} en conejo
- Anticuerpo primario contra 5-HT_{5A} en cabra
- Anticuerpo secundario anticonejo hecho en burro Alexa Flúor 568
- Anticuerpo secundario anticabra hecho en pollo Alexa Flúor 488
- Glicerol

5.2 Materiales

- Material de disección
- Cámara húmeda
- Cajas petri de plástico
- Tubos eppendorf de 2 mL
- Tubos falcon de 15 mL
- Vasos de precipitado (Pyrex)
- Probeta de 250MI (Pyrex)
- Micropipetas (Eppendorf)
- Frascos de vidrio para diluciones (Pyrex)
- Portaobjetos y cubreobjetos

5.3 Equipos

- Estereoscopio (ZEISS, SstemiDV4)
- Crióstato marca (Leica M 1850)
- Microscopio con cámara (Leica, DME)
- Vórtex Genie-2
- Balanza analítica
- Refrigerador (4 °C) y Congelador (-20 °C y -70 °C)

5.4 Animales

Se usaron tres ratas adultas y cuatro ratas neonatas Sprague Dawley. Las ratas se conservaron a una temperatura de 22 ± 2 °C, con ciclos de luz-obscuridad de 12 h y con acceso a agua y alimento *ad libitum*, las cuales fueron sacrificadas de acuerdo a principios de bioética.

5.5 Preparación de reactivos

Para la preparación de PBS 10X se disolvieron 40 g de cloruro de sodio, 1 g de cloruro de potasio, 1 g de fosfato diácido de potasio y 5.7 g de fosfato monoácido de potasio heptahidratado en 1 L de agua destilada. Para la preparación de PBS 1X se hizo la respectiva dilución a partir de la solución de PBS 10X. La solución de PBT se preparó con 995 ml de PBS 1X y 5 ml de Tween 20, en constante agitación hasta que se disolvió por completo.

Para la preparación del anticuerpo primario se hizo una dilución 1:100 en PBT de los anticuerpos primarios específicos contra 5-HT_{2C} hecho en conejo y contra 5-HT_{5A} hecho en cabra. Los anticuerpos secundarios se prepararon de acuerdo a los resultados preliminares.

Las ratas P0 se decapitaron y disectaron los intestinos, las ratas adultas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico 40 mg/Kg vía intraperitoneal, y posteriormente se llevó a cabo la disección de las mismas para extraer del intestino delgado la porción proximal, que se reconoce por estar después del estómago, y la

porción distal que se identifica por estar antes del colon, posteriormente se colocaron en PBS.

5.6 Preparación de los tejidos

5.6.1 Fijación de tejidos

Los tejidos se limpiaron de cualquier residuo de alimento que pudieran tener y se abrieron longitudinalmente con la ayuda de un estereoscopio. Se colocaron en PFA al 4 % durante 6 horas a 4 °C.

5.6.2 Crioprotección de tejidos

Pasadas las 6 horas de fijación, los tejidos se enjuagaron con PBS 1X, y se llevaron a la solución de sacarosa al 30% en PBS para su crioprotección. Posteriormente se montaron los tejidos en cajas de papel aluminio con medio congelador de tejidos Jung y fueron congeladas a -70°C.

5.6.3 Cortes del tejido

Con la ayuda del criostato se realizaron cortes longitudinales de 12 µm, los cuales se colocaron en laminillas perfectamente identificadas para posteriormente conservarlos en congelación a -20°C.

5.7 Inmunohistoquímica

Se seleccionaron las laminillas previamente preparadas con ayuda del estereoscopio (una de proximal adulto, una de distal adulta, una de proximal neonatal, una de distal neonatal, dos de proximal adulto para blanco y para el control). Se colocaron en una cámara húmeda con tapadera y se le realizaron 3 lavados con PBS 1X de 10 minutos cada lavado a todas las laminillas. Por cada lavado se escurrían las laminillas para agregar el siguiente lavado, y con cuidado de no soltar tejido.

Pasados los tres lavados, a cada laminilla se le agregaron 300 μ l del tratamiento bloqueador de albúmina y se dejaron incubar 45 minutos. Se retiró el bloqueo y se hicieron 3 lavados con PBS para posteriormente agregar los anticuerpos y dejar incubar toda la noche.

Al día siguiente se retiraron los anticuerpos primarios, se hicieron tres lavados con PBS y se agregaron los anticuerpos secundarios dejando incubar por 2 horas a TA. Pasado el tiempo se retiraron los anticuerpos secundarios y se hicieron tres lavados con PBS, para finalmente fijarlos con una gota de glicerol para su observación al microscopio de fluorescencia.

6. RESULTADOS

La coexpresión de los receptores serotoninérgicos 5-HT_{2C} y 5-HT_{5A} durante el desarrollo del intestino de rata se llevó a cabo mediante técnicas de inmunohistoquímica en cortes de intestino delgado neonatal y adulto los cuales fueron divididos en los segmentos proximal y distal como se indica en la metodología.

Para el tiempo de fijación en p-formaldehído al 4 %, el estudio se basó en trabajos realizados en nuestro grupo anteriormente (Padilla en 2011), en el cual se encontró que con 6 hrs de fijación, las secciones del intestino (proximal y distal) de las edades P0 y adulto, presentaban mayor marca inmunorreactiva. En los cortes de intestino delgado transversales (proximal y distal), se observaron las vellosidades de la mucosa, tanto para adulto como para neonatal.

Como controles para conocer las interferencias de la técnica y la especificidad del anticuerpo secundario, se incluyeron inmunotinciones llamadas control negativo y blanco. El control negativo fue tratado de la misma forma que las laminillas con las muestras problema, con la excepción de que no se le agregó ningún anticuerpo; los resultados que se obtuvieron (figura 9), indica que no hubo marca inmunorreactiva en ninguna parte del corte. Para los cortes utilizados como blancos (figuras 10A y 10B) se realizó el mismo procedimiento que los grupos control, con la diferencia de que a estos se les adicionó el anticuerpo secundario, los resultados obtenidos en esta laminilla sugieren que no hubo marca inmunorreactiva, sólo se llega a ver muy poco el fondo del tejido.

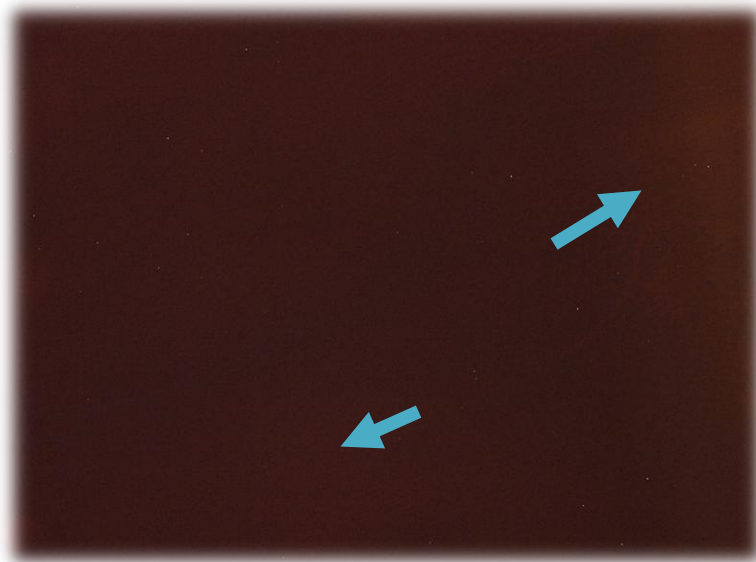


Figura 9. Control negativo. En esta laminilla se pretendía saber si no se presentaban compuestos autofluorescentes en el tejido; se le hizo el mismo tratamiento, sin agregarle ninguno de los anticuerpos, como puede observarse, no se logra distinguir ninguna marca, pero se logra apreciar un poco el contorno de las vellosidades.

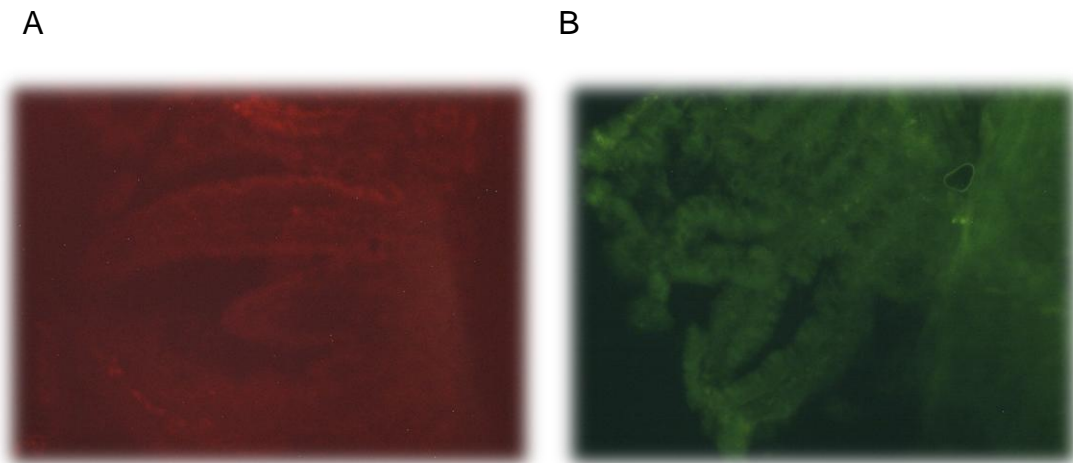


Figura 10. Blancos de la técnica con anticuerpo secundario Alexa Fluor 568 (A) y Alexa Fluor 488 (B). Fotografías tomadas con un aumento de 20X. En esta laminilla se pretendía saber si no había compuestos en el mismo tejido que emitieran fluorescencia con el anticuerpo secundario; para esto se le hizo el mismo método que a las laminillas anteriores, lo único que cambió, fue que no se agregó el anticuerpo primario. Puede observarse que no hay marcas específicas en el tejido.

En la inmunorreacción realizada en cortes de intestino delgado proximal y distal de rata P0, se puede distinguir que la marca inmunorreactiva es muy débil para los dos receptores (figuras 11 y 12), pero se logra distinguir la ubicación de los dos receptores en las dos fotos tomadas, tanto de intestino proximal como de intestino distal, los cuales fueron 5-HT_{5A} en la lámina propia de la vellosidad del intestino proximal y 5-HT_{2C} en las células epiteliales de la vellosidad del intestino distal.

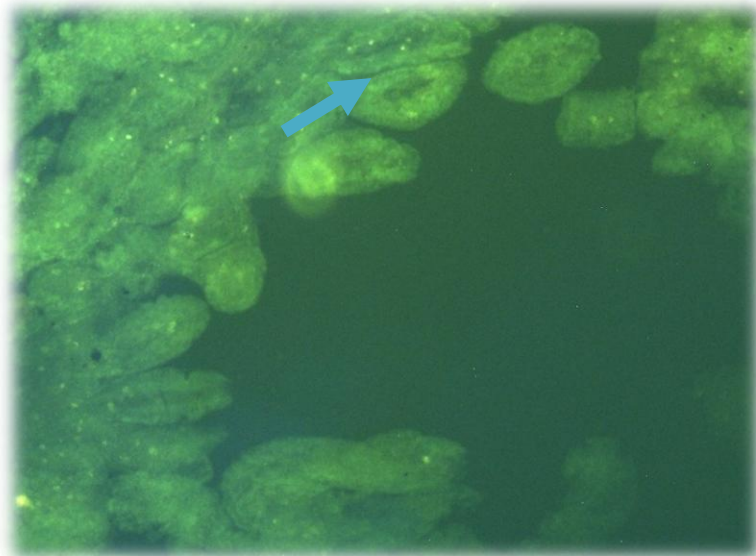


Figura 11. Localización del receptor 5-HT_{5A} en intestino proximal de rata P0 con 6 hrs. De fijación y anticuerpo secundario Alexa Fluor 568. Fotografía tomada con un aumento de 20X. Se puede observar que la marca inmunorreactiva es muy débil, pero sí se logra apreciar que éstas se encuentran en la lámina propia de la vellosidad.

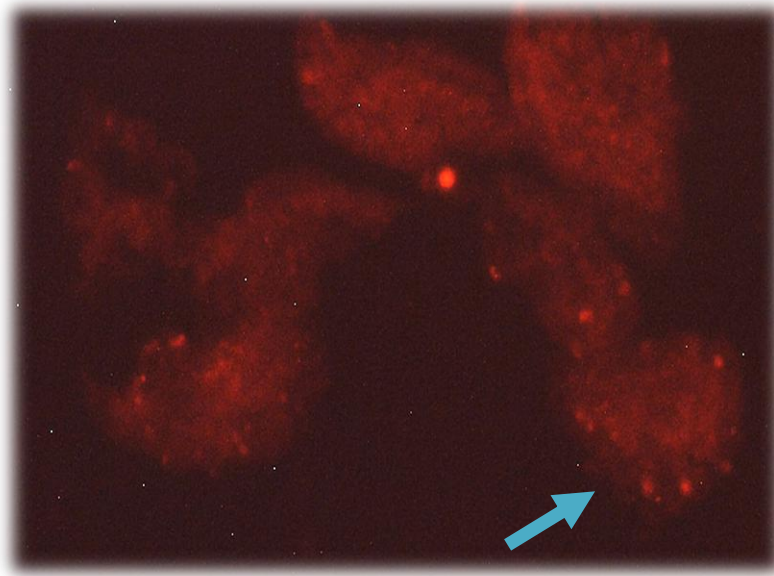


Figura 12. Localización del receptor 5-HT_{2C} en intestino distal de rata P0 con 6 hrs de fijación y anticuerpo secundario Alexa Fluor 568. Fotografía tomada con un aumento de 40X. Se puede observar que la marca inmunorreactiva es más débil que la anterior, pero sí se alcanza a distinguir que esta marca se encuentra en las células epiteliales de la vellosidad.

En cambio en la inmunohistoquímica realizada en cortes de intestino delgado proximal y distal de rata adulta, se puede observar que hay una marca intensa, tanto para el receptor 5-HT_{2C}, en los bordes de las células endoteliales (figuras 13, 14 y 15), como para el receptor 5-HT_{5A}, en la lámina propia, que es tejido conectivo ubicado al centro de la vellosidad (figuras 16, 17 y 18).

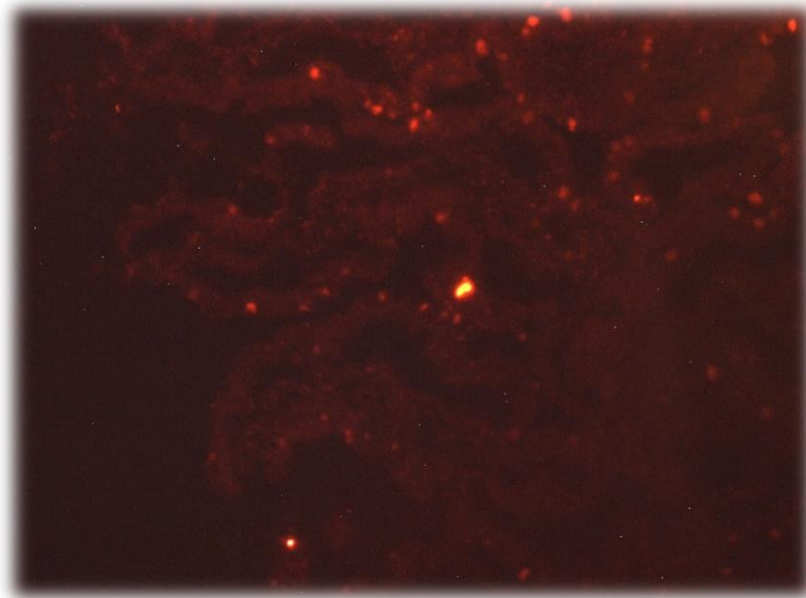


Figura 13. Localización del receptor 5-HT_{2C} en intestino proximal de rata adulta con 6 hrs. De fijación y anticuerpo secundario Alexa Fluor 568. Fotografía tomada con un aumento de 20X. Como puede observarse la mayor parte de este receptor se encuentra en las células epiteliales de la vellosidad.

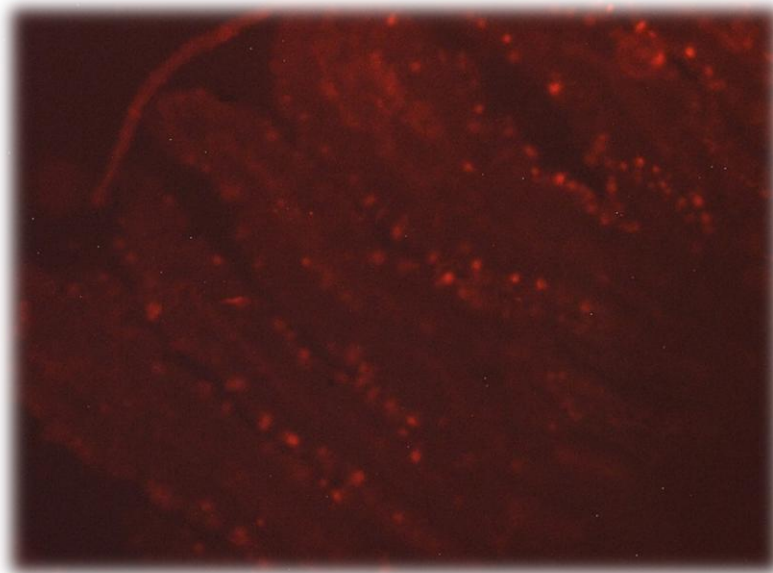


Figura 14. Localización del receptor 5-HT_{2C} en intestino proximal de rata adulta con 6 hrs. De fijación y anticuerpo secundario Alexa Fluor 568. Fotografía tomada con un aumento de 20X. Puede observarse que la localización de este receptor en este tejido se encuentra en las células epiteliales de las vellosidades del mismo.

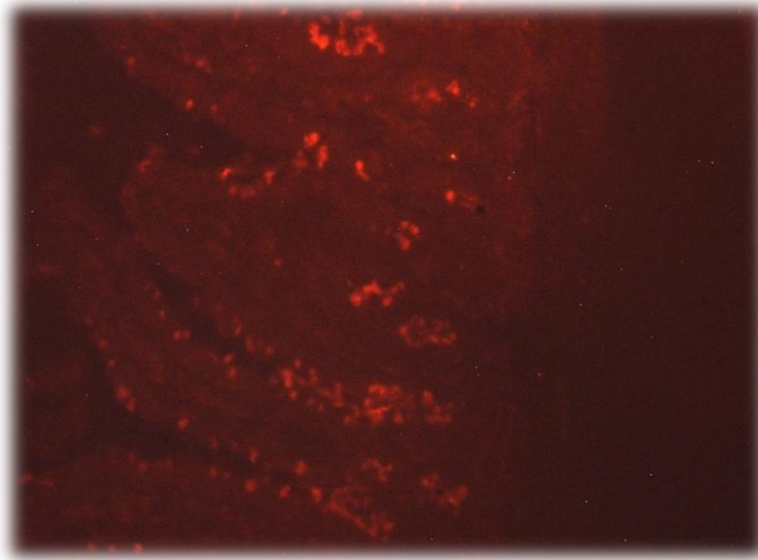


Figura 15. Localización del receptor 5-HT_{2C} en intestino distal de rata adulta con 6 hrs. De fijación y anticuerpo secundario Alexa Fluor 568. Fotografía tomada con un aumento de 20X. Puede observarse que la distribución de este receptor se encuentra en mayor cantidad en las células epiteliales de las vellosidades del intestino.

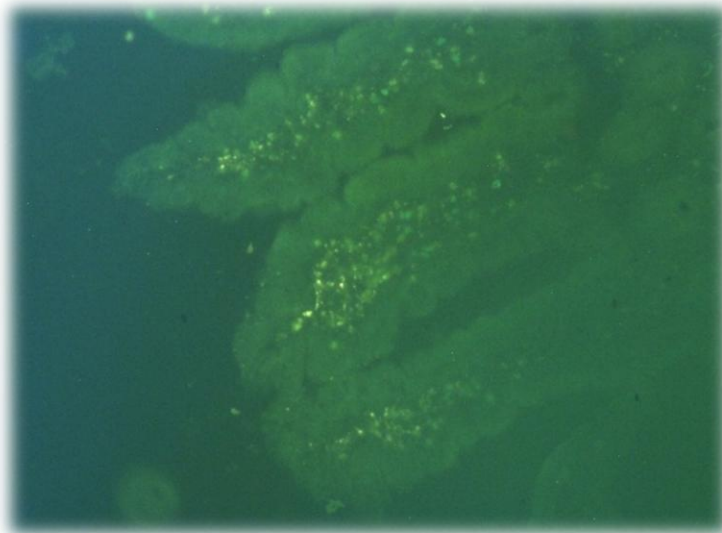


Figura 16. Localización del receptor 5-HT_{5A} en intestino proximal de rata adulta con 6 hrs. De fijación y anticuerpo secundario Alexa Fluor 488. Fotografía tomada con un aumento de 20X. Puede observarse que la localización de este receptor en este tejido es en la lámina propia de las vellosidades.

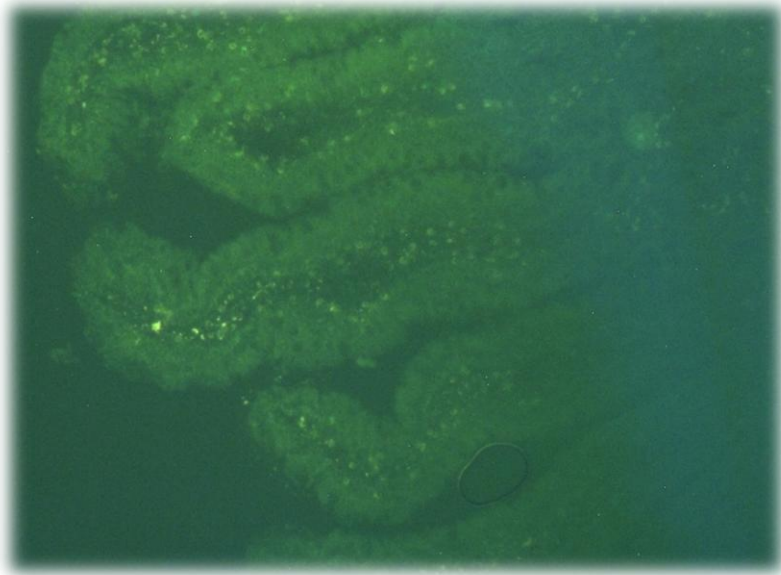


Figura 17. Localización del receptor 5-HT_{5A} en intestino distal de rata adulta con 6 hrs. De fijación y anticuerpo secundario Alexa Fluor 488. Fotografía tomada con un aumento de 20X. Puede observarse que la localización de este receptor en este tejido es en la lámina propia de las vellosidades.

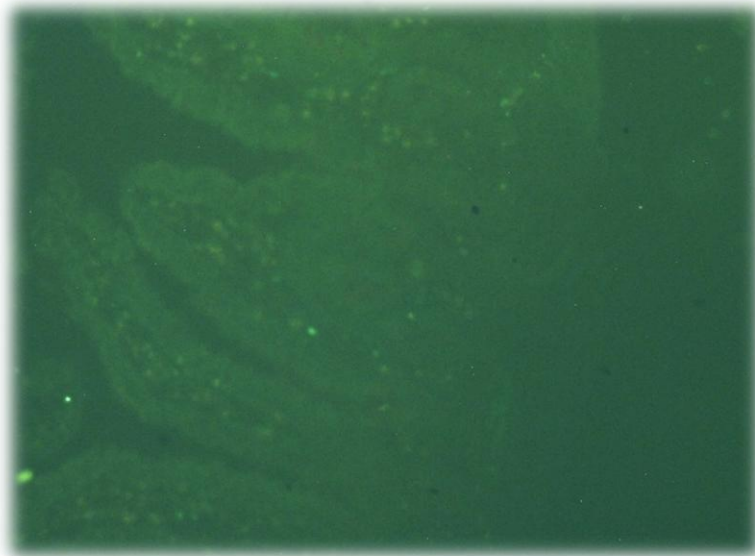


Figura 18. Localización del receptor 5-HT_{5A} en intestino distal de rata adulta con 6 hrs. De fijación y anticuerpo secundario Alexa Fluor 488. Fotografía tomada con un aumento de 20X. Puede observarse que es el mismo tejido de la fig. 8 y que a diferencia del tejido anterior, la localización de estos receptores no es en las células epiteliales de las vellosidades, sino en la lámina propia de la vellosidad.

Las figuras 19 y 20 nos muestran la coexpresión de los dos receptores, y puede verse, como se había mencionado anteriormente que la localización de los receptores 5-HT_{2C} (rojo) es en las células epiteliales de las vellosidades y los receptores 5-HT_{5A} (verde), se encuentran en mayor cantidad en la lámina propia de la vellosidad, pero como puede observarse en estas fotografías, hay zonas de color amarillo las cuales corresponden a la coexpresión de los dos receptores, y que están ubicadas en las orillas de la lámina propia de las vellosidades.



Figura 19. Coexpresión de los receptores a serotonina 5-HT_{5A/2C} en intestino proximal de rata adulta con 6 hrs. De fijación y anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 568. Fotografía tomada con un aumento de 20X. Se puede observar que los receptores 5-HT_{5A} (verde), se encuentran en mayor cantidad en la lámina propia de las vellosidades y los receptores 5-HT_{2C} (rojo), se encuentran en mayor cantidad en las células epiteliales de las vellosidades, y la coexpresión de ambos receptores (amarillo intenso) se encuentra en la orilla de la lámina propia de la vellosidad.

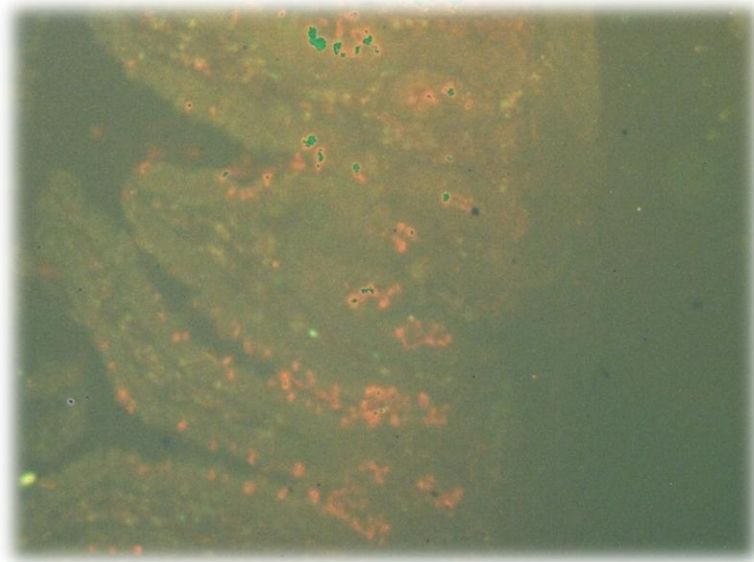


Figura 20. Coexpresión de los receptores a serotonina 5-HT_{5A/2C} en intestino distal de rata adulta con 6 hrs. De fijación y anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 568. Fotografía tomada con un aumento de 20X. Se puede observar que los receptores 5-HT_{5A} (verde), se encuentran en mayor cantidad en la lámina propia de las vellosidades y los receptores 5-HT_{2C} (rojo), se encuentran en las células epiteliales de las mismas, , y la coexpresión de ambos receptores (amarillo intenso) se encuentra en la orilla de la lámina propia de la vellosidad.

7. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se encontró la localización de los receptores a serotonina 5-HT_{2C} y 5-HT_{5A} mediante la marca inmunorreactiva, en intestino delgado de rata durante su desarrollo en sus porciones proximal y distal.

Se utilizaron las condiciones ideales a las cuales presentaba un alto marcaje inmunorreactivo, las cuales fueron 6 hrs de fijación con p-formaldehído al 4% (Padilla-Olvera, 2011), la concentración del anticuerpo primario (5-HT_{2C} y 5-HT_{5A}) de 1:100.

Ya establecidas las condiciones ideales de la inmunohistoquímica, se procedió a observar las laminillas ya tratadas en el microscopio de fluorescencia para ubicar la distribución que presentaba cada receptor en las células epiteliales. Se observó que tanto en adulto proximal como distal, la marca inmunorreactiva para 5-HT_{2C} se encontraba en las células absortivas de la vellosidad de las células epiteliales, que son los bordes de la célula, y para 5-HT_{5A} se encontraba en mayor cantidad en la lámina propia, que es la parte central de las vellosidades.

Se adicionó una laminilla para control negativo (figura 9), esto para saber si no había compuestos autofluorescentes en el tejido y que estuvieran interfiriendo con la inmunorreacción de los receptores de interés, por lo que puede observarse en la figura que no se encuentra ninguna marca fluorescente presente en el tejido.

Como se muestra en las figuras 10A y 10B, que corresponden a los blancos de este estudio, puede observarse que no hay marca inmunorreactiva, con esto se favorece el estudio, y se puede afirmar que al no agregar el anticuerpo primario, no se presentó marca inmunorreactiva lo que sugiere que el anticuerpo no presenta marca inespecífica.

La expresión de los receptores 5-HT_{2C} y 5-HT_{5A} durante el desarrollo del intestino de rata se va modificando, dado que la marca inmunorreactiva se

expresó en mayor cantidad durante la edad adulta, esto puede explicarse considerando que pueda estar asociado a que después del día P21 ocurre una diferenciación de las neuronas serotoninérgicas, agregación en núcleos y aparición de un primitivo árbol dendrítico, además de la formación primaria y selectiva de vías y campos terminales (Flores y Escobar, 2012), esto es consistente con los resultados obtenidos por Zhao y col. en 2008 realizado en cobayos en donde se cuantificó en porcentaje la cantidad de 5-HT y 5-HIAA (metabolito de la 5-HT, 5-hidroxiindol ácido acético) en intestino, y concluyeron que los niveles de serotonina extracelular incrementaron después de las tres semanas de nacimiento, posiblemente debido al incremento en el número de células enterocromafines, en base a los anteriores estudios se puede deducir que se encontró mayor marca en adulto que en neonatal, ya que se localiza un mayor número de células enterocromafines en adulto y aproximadamente el 90% del contenido total de serotonina en el cuerpo es sintetizada y almacenada en las células intestinales enterocromafines (De Ponti, 2004).

De acuerdo a los resultados obtenidos del presente estudio en intestino delgado de los receptores 5-HT_{2C} y 5-HT_{5A}, y comparado con el estudio realizado por Choi y Maroteaux en 1996 sobre el receptor 5-HT_{2B} realizados en la capa muscular longitudinal y circular del intestino, llegaron a la conclusión de que tal receptor se encuentra en dicha capa muscular, lo que es importante para próximas investigaciones sobre los receptores 5-HT_{2C} y 5-HT_{5A} en dicha zona del intestino.

Los receptores 5-HT₂ acoplados a la proteína G inducen una cascada de efectos bioquímicos que producen cambios celulares diversos (Chávez-León, 2008), como el receptor 5-HT_{2C}, que es un receptor acoplado a proteína G_q, activa a fosfolipasa C (PLC), la cual hace que aumenten los niveles de Inositoltrifosfato (IP3), y éstos a su vez aumenten el Ca²⁺ en el citosol, lo que conlleva a la respuesta celular, principalmente en los factores de transcripción, como la edición de RNA que genera muchas isoformas de receptores 5-HT_{2C} con modificaciones en los tres aminoácidos dentro de la segunda asa

intracelular; estas isoformas tienen diversas eficiencias en el acoplamiento a la proteína G modificada (Brunton, 2012), como podrían ser, por un lado, náuseas, vómitos, secreción intestinal y peristaltismo, actuando como neurotransmisor (Gershon, 2006); y por otro lado, absorción intestinal de nutrientes (Salvador y col., 1997) y secreción de agua y electrolitos (Hardcastle, 1999), si desarrolla actividad endocrina/paracrina.

El sistema central de señalización serotoninérgico desempeña un papel importante en el apetito y en la regulación de la ingesta de alimentos. La serotonina ejerce sus efectos anoréxicos principalmente a través del receptor 5-HT_{2C} y este es por lo tanto de una atención creciente como principal objetivo farmacoterapéutico para el tratamiento de la obesidad. El receptor 5-HT_{2C} tiene la capacidad distintiva de ser modificado por ARN postranscripcional de edición en 5 posiciones del nucleótidos, que tiene una disminución total de la función del receptor. Recientemente, se ha demostrado que el comportamiento de alimentación y la masa grasa se alteran cuando el ARN del receptor 5-HT_{2C} es totalmente editado, ya que las bases nitrogenadas, principalmente adenina, son modificadas enzimáticamente por la adenosina desaminasa, lo que sugiere un papel potencial para el 5-HT_{2C} editado de la obesidad (Schellekens, 2012), y según la OMS en 2012, una de las causas principales de la obesidad son los cambios en los hábitos de alimentación, y ésta puede estar implicada por señales moleculares periféricas que modifican la ingesta de alimentos como lo son, la grelina que incrementa la ingesta, y los péptidos de colecistoquinina (CCK) ubicados en células I que corresponden a las células del intestino proximal con terminaciones nerviosas positivas, y el péptido similar al glucagón I (GLP-1) ubicado en células L de intestino distal, ambos disminuyen la ingesta (Cummings, 2007), en las cuales, juegan un papel muy importante los receptores a serotonina 5-HT_{2C} (Asarian, 2009), debido a que participan en la fase de término de la alimentación actuando de manera sinérgica con las señales periféricas postprandiales, como es la elevación de colecistoquinina en el hipotálamo (González-Hita, 2006).

El receptor a serotonina 5-HT_{5A} es un receptor acoplado a proteína G inhibidora (Gi), lo que quiere decir, que inhibe a la adenilatociclasa, lo contrario en el receptor 5-HT_{2C}, por lo que disminuye la concentración de AMPc, que es un pequeño mediador intracelular de todas las células de todos los animales que se han estudiado (Alberts y col. 2008). Los receptores además de regular o modular funciones, son a su vez objeto de mecanismos de regulación o autorregulación de su actividad. Progresos recientes, sobre todo en receptores de membrana han demostrado que la unión de un agonista con un receptor que origina una respuesta celular, puede, si la activación es frecuente y continua, producir cambios en el tipo de unión química ligando-receptor, en el número de receptores disponibles y en la afinidad del agonista con el receptor. Como consecuencia, dichos cambios producen un estado de desensibilización conocido como regulación en descenso que modula la respuesta celular ante la sobreestimulación y sobreocupación de receptores. Es decir son mecanismos de defensa celular que se desencadenan ante la gran sobreestimulación y sobreocupación de los receptores, y poseen actualmente importantes implicaciones terapéuticas; en otros casos ocurre lo contrario, ante la utilización continua o frecuente de fármacos antagonistas, o ante la carencia o ausencia de ligandos agonistas, ocurre un fenómeno de supersensibilidad, llamado también regulación en ascenso. En este caso puede ocurrir un aumento del número de receptores disponibles, un incremento de la síntesis de receptores o aumento de la afinidad por los agonistas. También constituye un mecanismo de defensa celular autorregulatoria, para mantener funciones esenciales (Malgor, 2000).

Hasta la fecha, hay muy pocos estudios tanto para el receptor 5-HT_{2C} como para el receptor 5-HT_{5A} en intestino delgado. El presente trabajo es de los primeros que analiza la presencia de los receptores 5-HT_{2C} y 5-HT_{5A} en el intestino delgado, sin embargo se han hecho múltiples estudios de estos dos receptores en sistema nervioso central, la mayoría de las investigaciones relacionadas con el estudio del receptor 5-HT_{5A} coinciden al ubicar su función biológica en el SNC; por ejemplo, a la diferencia de genotipo y polimorfismos

genéticos del receptor 5-HT_{5A} se les ha implicado una relación con el desarrollo de esquizofrenia y desorden afectivo en individuos de origen caucásico (Birkett y col., 2000), y otro ejemplo, pero para el receptor 5-HT_{2C}, se ha mostrado que el comportamiento de alimentación y la masa grasa se alteran cuando el estudio de ratones modificados genéticamente para expresar una isoforma del receptor 5-HT_{2C} totalmente editado en el cerebro, lo que sugiere un papel potencial para la edición de receptor 5-HT_{2C} en la obesidad (Schellekens, 2012).

Hacen falta más estudios de estos dos receptores para ubicar la coexpresión en las distintas porciones del intestino a diferentes edades.

8. CONCLUSIÓN

- El receptor 5-HT_{2C} se encontró expresado en las células epiteliales de las vellosidades de ambas secciones del intestino (proximal y distal) en la edad adulta, a diferencia de la edad neonatal en la cual la marca inmunorreactiva se encontró en menor cantidad.
- El receptor 5-HT_{5A} se encontró expresado en la lámina propia de las vellosidades de ambas secciones del intestino (proximal y distal) en la edad adulta, a diferencia de la edad neonatal en la cual la marca inmunorreactiva se encontró en menor cantidad.
- La coexpresión de los receptores 5-HT_{2C} y 5-HT_{5A} se encontró en la zona ubicada entre la lámina propia y las células epiteliales de las vellosidades de ambas secciones del intestino (proximal y distal), únicamente de la edad adulta.

9. REFERENCIAS

- Asarian L.** Loss of cholecystokinin and glucagon-like peptide-1-induced satiation in mice lacking serotonin 2C receptors. *Am J Physiol* **2009**; 296: R51-R56.
- Alberts B,** Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biología Molecular de la Célula*. 5a edición. España: Editorial Omega, **2008**: 879-916.
- Barnes NM,** Sharp T. Review 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* **1999**; 38: 1083 – 1152.
- Berumen LC,** Rodríguez A, Miledi R, García-Alcocer G. Review Article: Serotonin receptors in hippocampus. *The Scientific World Journal* **2011**; 1-15.
- Birkett JT,** Arranz MJ, Munro J, Osbourn S, Kerwin RW, Collier DA. Association analysis of the 5-HT5A gene in depression, psychosis and antipsychotic response. *NeuroReport* **2000**; 11:2017-2020.
- Bonn M,** Schmitt A, Asan E. Double and triple in situ hybridization for coexpression studies: combined fluorescent and chromogenic detection of neuropeptide Y (NPY) and serotonin receptor subtype mRNAs expressed at different abundance levels. *Histochem Cell Biol* **2012**; 137:11-24.
- Brunton LL,** Chabner BA, Knollman BC. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 12ª edición. México: Editorial McGraw Hill, **2012**: 181-185.
- Chávez-León E,** Ontiveros-Urbe MP, Serrano-Gómez C. Los antidepresivos inhibidores selectivos de recaptura de serotonina (ISRS, ISR-5HT). *Salud Mental* **2008**; 31:307-319.
- Choi DS,** Maroteaux L. Immunohistochemical localization of the serotonin 5-HT2B receptor in mouse gut, cardiovascular system, and brain. *FEBS* **1996**; 391:45-51.
- Córdova-Pluma VH,** Vargas-Viveros P, Vega C, Quintero M, Hurtado-Monroy R. Artículo de revisión: Agregometría plaquetaria: el estudio de la agregación de las plaquetas y la disfunción plaquetaria. *Med Int Mex* **2011**; 27(1):58-74.
- Cummings DE,** Overduin J. Gastrointestinal regulation of food intake. *The Journal of Clinical Investigation* **2007**; 117:13-23.

Drozdowski L A, Clandinin T y Thomson ABR. Ontogeny, growth and development of the small intestine: Understanding pediatric gastroenterology. World Journal of Gastroenterology **2010**; 16: 787 – 799.

De Ponti F. Pharmacology of serotonin: What a clinical should know. Gut **2004**; 53:1520-1535.

Fernández-Tresguerres JA, Ariznavarreta-Cruz C, Cachofeiro V, Cardinali DP, Escrich-Escriche E, Gil-Lozaga PE, Lahera-Julia V. 4a edición. México: Editorial McGraw Hill, **2010**: 87-88.

Flores G, Escobar A. Ontogenia de los sistemas de neurotransmisión. Rev Neurol **2012**; 54(1):41-48.

Ganong W. Fisiología Médica. 20ª edición. México: Editorial Manual Moderno, **2006**: 79-91.

Gershon MD. Review Article: Serotonin Receptors and Transporters- roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. Aliment Pharmacol Ther **2006**; 7:3-14.

González-Hita ME, Ambrosio-Macías KG, Sánchez-Enríquez S. Regulación neuroendócrina del hambre, la saciedad y mantenimiento del balance energético. Redalyc **2006**; 8:191-200.

Grailhe R, Grabtree GW, Hen R. Human 5-HT₅ receptors: the 5-HT_{5A} receptor is functional but the 5-HT_{5B} receptor was lost during mammalian evolution. European Journal of Pharmacology **2001**; 418: 157 – 167.

Guyton A, Hall J. Tratado de Fisiología Médica. 10a. edición. México: McGraw Hill Interamericana, **2001**: 868-871.

Hall JE, Adair TH, Dzielak DJ, Lohmeier TE, Manning RD, Mihailoff G, Young DB. Compendio de Fisiología Médica. 11a edición. España: Editorial Elsevier, **2007**: 351-359.

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

Hardcastle J, Hardcastle PT, Klaren PHM, Taylor CJ, White SJ. The action of 5-Hydroxytryptamine on normal and cystic fibrosis mouse colon: Effects on secretion and intracellular calcium. J Pharm Pharmacol **1999**; 51:449-456.

Iceta-Echave R. Caracterización del Transportador de Serotonina Humano en Células CACO-2: Estudio de los Mecanismos de Regulación Fisiológica. España: Universidad de Zaragoza, **2008**: 32.

Junqueira L, Carneiro J. Histología Básica. 4a. edición. España: Masson, **2005**: 286-299.

Karp G. Biología Celular y Molecular. 6ª edición. México: Editorial McGraw Hill, **2011**: 163-166.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Farmacología Básica y Clínica. 11a edición. México: Editorial McGraw Hill, **2010**:358-369.

Kennett GA, Wood MD, Glen A, Grewal S, Forbes I, Gadre A, Blackburn TP. *In vivo* properties of SB 200646A, a 5-HT_{2C/2B} receptor antagonist. *Br J Pharmacol* **1994**; 111:797-802.

Kimura A, Stevenson PL, Carter RN, MacColl G, French KL, Simons JP, Al-Shawi R, Kelly V, Chapman KE, Holmes MC. Overexpression of 5-HT_{2C} receptors in forebrain leads to elevated anxiety and hypoactivity. *EJN* **2009**; 30:299-306.

Malgor LA, Valsecia M. Farmacología Médica. 2ª edición. Argentina: Editorial Médica Panamericana, **2000**; 1:214-216.

Noda M. Recombinant human serotonin 5A receptors stably expressed in C6 glioma cells couple to multiple signal transduction pathways. *Journal of Neurochemistry* **2003**; 84: 222 – 232.

OMS. Obesidad y sobrepeso. Nota descriptiva N° 311. **2012**.

Padilla-Olvera KM. Distribución de los receptores purinérgicos P2X6 durante el desarrollo del intestino de rata. *UAQ* **2011**: 1-60.

Pascual C. Bases científicas de la memoria y el aprendizaje [monografía en internet]. México: CarmanLab, 2012 [consultado 2013 enero 23]:[3]. Disponible en: <http://www.carmenlab.com/general/bases-cientifica-de-la-memoria-y-el-aprendizaje/>

Salvador MT, Rodríguez-Yoldi MC, Alcalde AI, Rodríguez-Yoldi MJ. 5-HT receptor subtypes involved in the serotonin-induced inhibition of L-leucine adsorption in rabbit jejunum. *LifeSci* **1997**; 61:309-318.

Sanderson I, Walker A. Development of the gastrointestinal tract. Canadá: BC Decker **1999**: 64.

Schellekens H, Clarke G, Jeffery IB, Dinan TG, Cryan JF. Dynamic 5-HT_{2C} receptor editing in a mouse model of obesity. *Plos One* **2012**; 7:1-12.

Thomas DR. 5-HT_{5A} Receptors as a Therapeutic Target. *Pharmacology and therapeutics* **2006**; 707-714.

Zhao H, Sovadinova I, Swope V, Swain G, Kadrofske M, Bian X. Postnatal development of the serotonin signaling system in the mucosa of the guinea pig ileum. *Neurogastroenterol Motil* **2011**; 23:161-e40.