

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

"DISTRIBUCIÓN DEL mRNA PARA RECEPTOR A 5-HT₇
DURANTE EL DESARROLLO DEL ENCÉFALO DE RATA CON
HIBRIDACIÓN *IN SITU*"

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

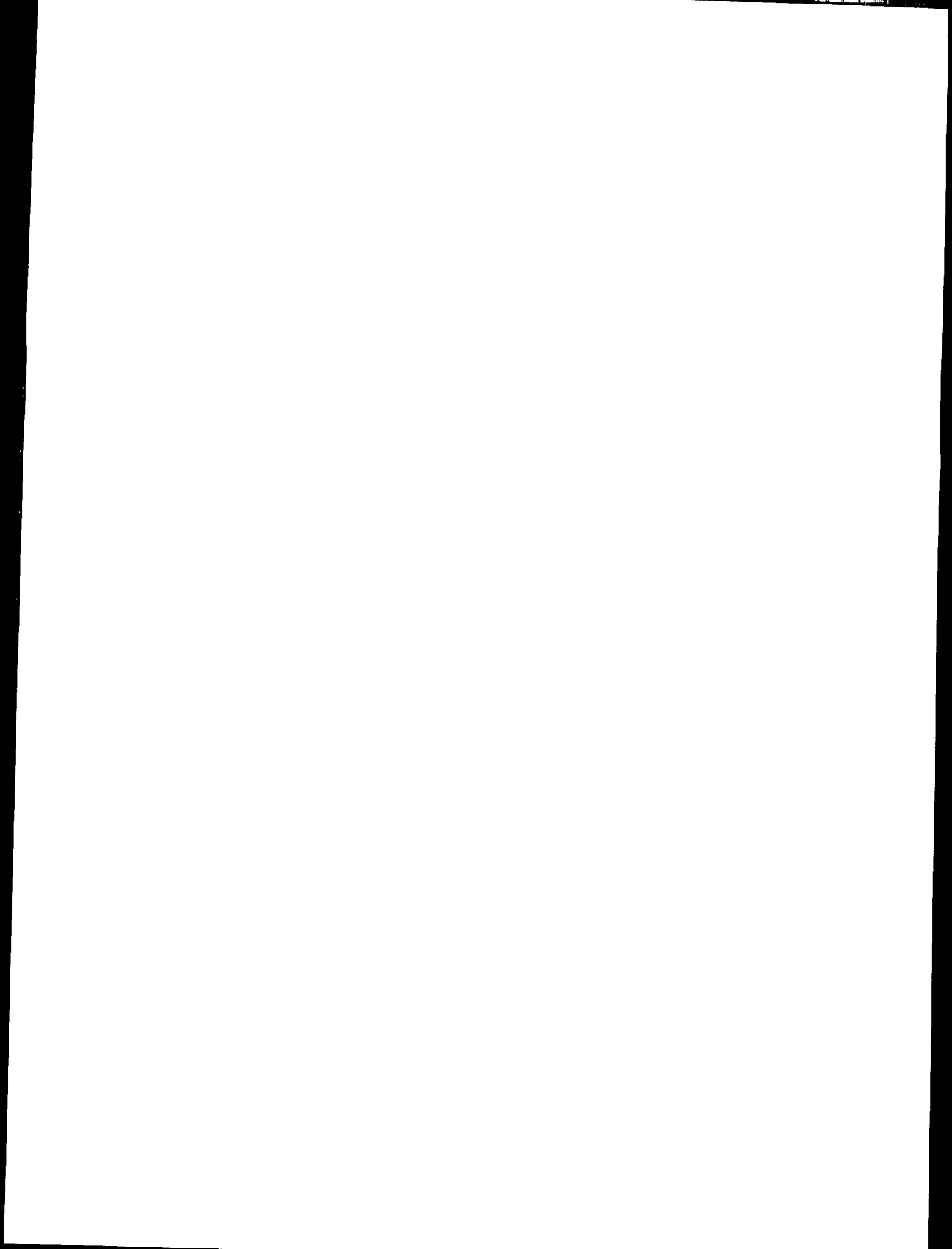
CARLOS ALEJANDRO MARTÍNEZ DEL VALLE

DIRIGIDA POR

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2005.

BIBLIOTECA CENTRAL, U.A.Q.





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DISTRIBUCIÓN DEL mRNA PARA RECEPTOR A 5-HT₇
DURANTE EL DESARROLLO DEL ENCÉFALO DE RATA CON
HIBRIDACIÓN *IN SITU*”**

TESIS (individual)

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

CARLOS ALEJANDRO MARTÍNEZ DEL VALLE

DIRIGIDA POR

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SINODALES

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER. _____

DIRECTOR

Dra. ROSALIA REYNOSO CAMACHO. _____

SINODAL

C. Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA. _____

SINODAL

Q. B. SERGIO PACHECO HERNÁNDEZ. _____

SINODAL

No. Adq. #70692

No. Título

Clas. IS

619.93

M385d

AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo, que quisiera dedicar a algunas de las personas a las que mas quiero en esta vida, es la culminación de más de 15 años de trabajo y esfuerzo, dedicación, constancia, apoyo y un poco de descanso.

Recuerdo el primer día de clases de mi vida estudiantil; primero de primaria, "*Se me hizo agüita el corazón*" le dije, y aún recuerdo que con sus ojos cristalinos, me preguntó como me había ido. ¿Cómo olvidar los exámenes?, "*Acuérdate que la diferencia entre una buena calificación y una mala calificación son los detalles*" "*no platiques, ¿apuntaste la tarea?*", y así podría continuar escribiendo toda una enciclopedia de invaluable e inolvidables momentos, que a lo largo de los años ella ha dedicado para la formación de este hombre de provecho que en este día se convierte en un profesionalista.

"*Ya se que no te gusta, pero aprender a hacerlo te va ahorrar mucho dinero*", aunque no lo creas, me gusta, poco pero me gusta; tal vez desde un punto de vista mas analítico, pero me gusta, aunque no tenga la diligencia para emprender ese tipo de trabajo. Gracias por ayudarme a convertirme en hombre. Ah! Como olvidarlos, "*levántate c@\$&0n, para ir a la escuela*", "*si, pero no la prendas*" clave fundamental del humor y buena vibra en la familia para el funcionamiento de cualquier persona.

"*¿Cómo químico!?, te vas a morir de hambre mi vida*" y aún así no te hice caso y voy por el postrado, ya casi te alcanzo, probablemente te pase.

Si después de esto me dan una "*tablita para picar cebolla*" no te la voy a enseñar porque te la vas a quedar en tu cuarto eh!.

"*¿Guayabo, tu ya?*" gracias por aguantarme dos veranos, y los que faltan.

Aunque la deuda está medio saldada, cuando alguien promete algo hay que cumplirlo, espero que el día en yo no esté aquí, reces para que vaya por buen camino y pongas en mi tumba "*una lamparita, un carrito y una pildorita*", tal vez.

"*Flolclórico?*" yo creo que después de tantos años deberían incluirla en el diccionario ¿no crees?

..."Ay que monito choy!!!"...

"*¿¡Qué tranza valedor!?*" espero que seas el próximo.

Gracias. Los amo.

ÍNDICE GENERAL.

Contenido.	Página
ÍNDICE GENERAL.	i
ÍNDICE DE CUADROS.	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.	iii
RESUMEN.	
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. ANTECEDENTES.	2
II.1. Serotonina.	2
II.2. Receptores.	4
II.2.1. Receptores asociados a canales iónicos.	4
II.2.2. Receptores asociados a proteínas G.	4
II.2.3. Receptores con actividad enzimática intrínseca.	6
II.2.4. Receptores asociados a cinasas de tirosina.	7
II.3. Receptores a serotonina.	7
II.4. Expresión genética.	14
II.4.1. Replicación.	15
II.4.2. Transcripción.	15
II.4.3. Traducción.	15
II.5. Regulación de la expresión genética.	15
II.6. Desarrollo del sistema nervioso central.	19
III. HIPÓTESIS.	24
IV. OBJETIVOS.	25
V. METODOLOGÍA.	26
VI. RESULTADOS.	30
VII. DISCUSIÓN.	38
VIII. CONSLUSIONES.	43
IX. BIBLIOGRAFIA.	44

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro.		Página
1	Familias de subunidades de las proteínas G y sus funciones.	6
2	Clasificación de los diferentes subtipos de receptores a serotonina.	8
3	Comparación de las zonas híbridadas en el hipocampo.	33

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura.		Página
1	Síntesis y degradación de serotonina.	3
2	Estructura del receptor asociado a proteína G.	5
3	Flujo de información genética en una célula típica.	14
4	Etapas de control en la expresión genética.	16
5	Ensamblaje para la transcripción por la RNA pol II.	18
6	Gastrulación.	20
7	Neurulación I.	21
8	Neurulación II.	22
9	Cortes coronales de corteza frontal.	31
10	Cortes coronales de hipocampo.	35
11	Cortes coronales de cerebelo.	36
12	Cuadro comparativo de las distintas zonas del encéfalo de rata; corteza frontal, hipocampo y cerebelo, durante las distintas etapas de la ontogenia.	37

RESUMEN.

La serotonina es una amina endógena que ejerce su función principalmente como neurotransmisor en el sistema nervioso central a través de una gran variedad de receptores que se encuentran en todo el encéfalo y algunos tejidos del tracto gastrointestinal. La función de la serotonina se ha asociado a la regulación y cambio de fase de los ritmos circadianos, así como a diferentes procesos como el aprendizaje y la memoria, sueño, locomoción, etc. Los distintos receptores para serotonina descubiertos hasta la fecha han sido clasificados en 7 familias, siendo el 5-HT₇ el receptor más reciente. Los receptores a serotonina están en su mayoría asociados a proteínas G, exceptuando el 5-HT₃ que forma canales iónicos. El receptor a serotonina es una proteína proveniente de la traducción de un RNA mensajero y su presencia dependerá de la expresión genética, regulada por distintos factores. En este trabajo se estudió la expresión del transcrito para receptor 5-HT₇ en encéfalo de rata durante la ontogenia a partir de E18 hasta P11 mediante la técnica de hibridación *in situ*, la cual consiste en la unión entre las bases nucleotídicas del transcrito presente en el encéfalo de rata y las bases complementarias presentes en una sonda o secuencia de RNA complementario. Los resultados indican una disminución del transcrito a medida que aumenta la edad posiblemente asociado al control de la expresión genética durante la ontogenia.

I. INTRODUCCIÓN.

La serotonina, 5-HT, es un neurotransmisor que controla una amplia variedad de funciones fisiológicas, entre las que se encuentra la neurogénesis mediante la activación de múltiples receptores, como el receptor a 5-HT del tipo 7, que es el más recientemente descubierto. El desarrollo de un organismo esta determinado por la información genética contenida en el DNA que es utilizada para llevar a cabo la síntesis de proteínas mediante los procesos de transcripción y traducción, los cuales dependen de la regulación de la expresión genética. Los genes activos inducen la formación de proteínas como los receptores a serotonina, que participan en una gran variedad de funciones, la distribución de dichos receptores puede ayudar a comprender la participación de esta amina en la diferenciación celular durante la ontogenia. En el presente estudio se ha realizado una hibridación *in situ* para determinar la distribución regional del RNA mensajero o mRNA para receptor a 5-HT₇ durante el desarrollo postnatal en el encéfalo de rata.

II. ANTECEDENTES.

II.1 Serotonina

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es una amina biógena compuesta por un anillo indólico y una cadena lateral etilamino (Florez y col., 2000), es un neurotransmisor que ejerce sus efectos principalmente en el sistema nervioso central (SNC) y el sistema gastrointestinal interactuando con una gran variedad de receptores (Ruat y col., 1993), además se ha reportado *in vivo* e *in vitro* que restablece o cambia de fase los ritmos circadianos de la actividad neuronal en el sistema nervioso central (Barnes y Sharp, 1999).

La serotonina se localiza y es sintetizada en células enterocromafines del tracto gastrointestinal y en las neuronas serotoninérgicas del sistema nervioso central. La síntesis de la serotonina, como se muestra en la Figura 1, se produce a partir del aminoácido L-triptófano que proviene de la dieta y es captado por la célula; sufre un proceso de oxidación en el C5 del anillo indólico mediante la triptófano-hidroxilasa, que lo convierte en 5-hidroxitriptofano; éste es descarboxilado en la cadena lateral mediante la L-aminoácido-descarboxilasa y convertido en 5-hidroxitriptamina (Florez y col., 2000).

En el cerebro intacto, la función de muchos receptores a serotonina está asociada a respuestas fisiológicas específicas, que van desde la modulación de la actividad neuronal hasta los cambios en el comportamiento. En el adulto se les han atribuido múltiples funciones como el sueño, la contracción vascular, apetito, locomoción, percepción al dolor y conducta sexual, entre otros (Barnes y Sharp, 1999).

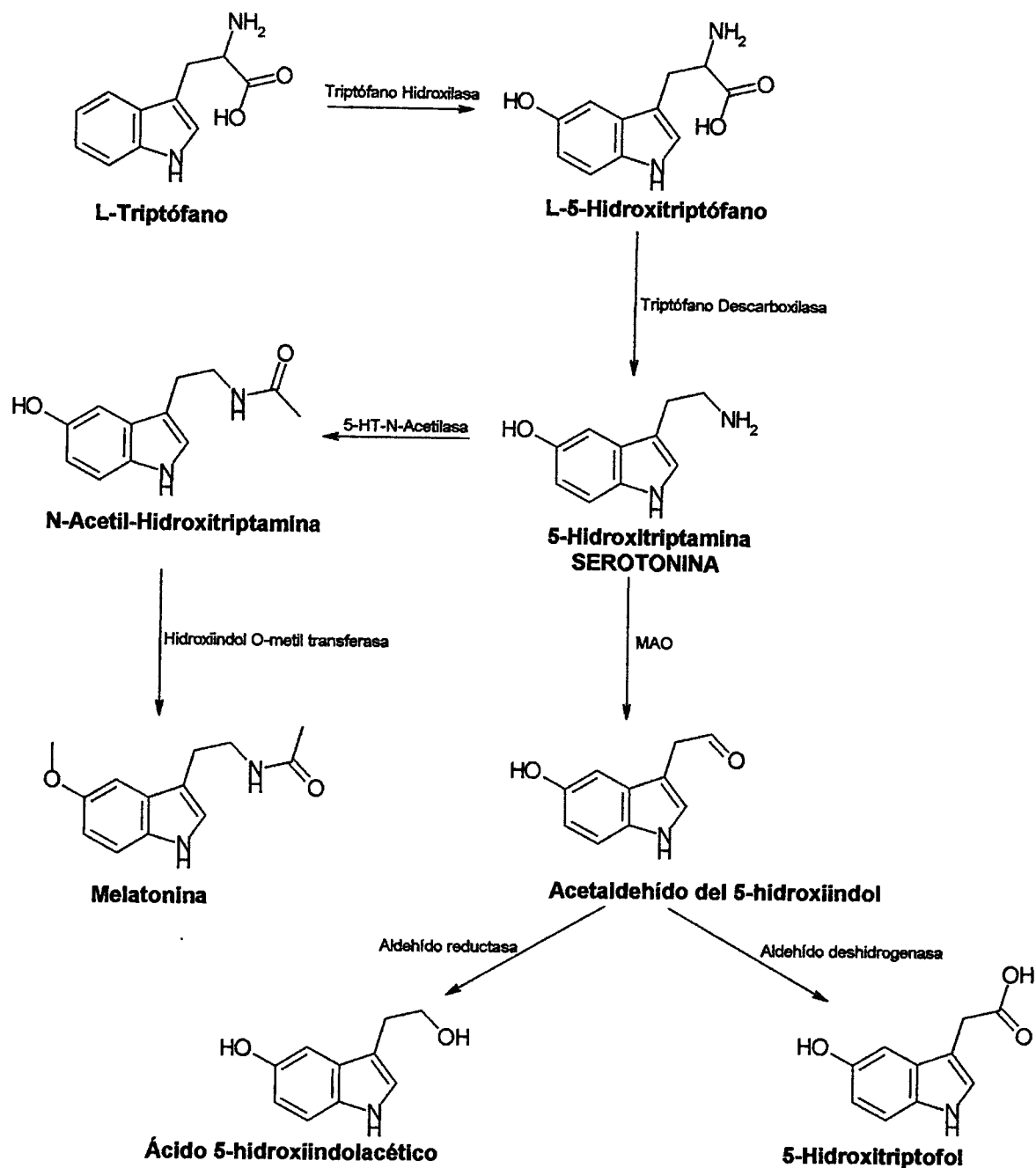


Figura 1. Síntesis y degradación de serotonina. A partir del aminoácido triptófano se obtiene la serotonina a través de reacciones de hidroxilación y descarboxilación y posteriormente por acción de la MAO y una deshidrogenasa se degrada la serotonina hasta ácido 5-hidroxi-indolacético (Florez y col., 1997).

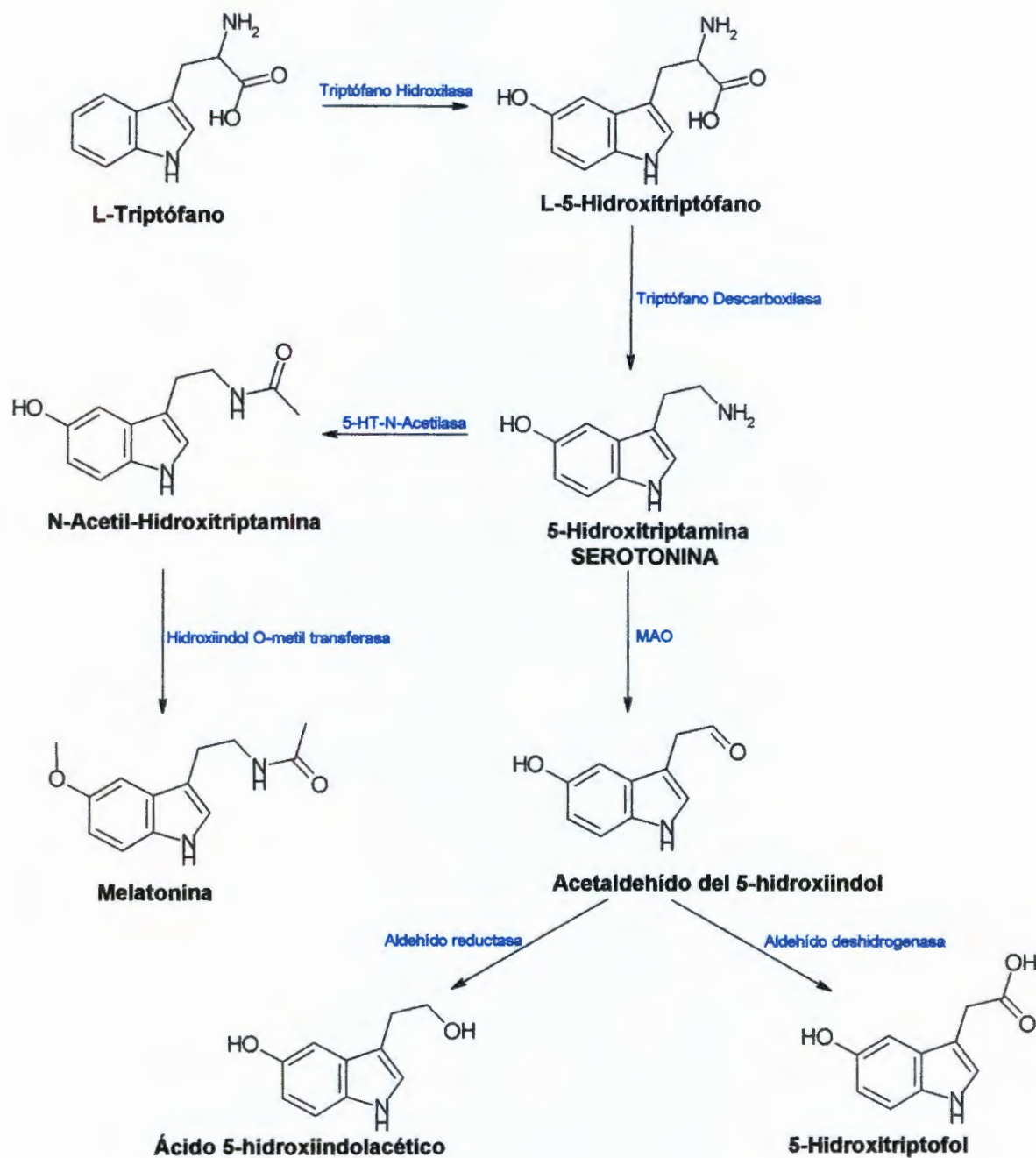


Figura 1. Síntesis y degradación de serotonina. A partir del aminoácido triptófano se obtiene la serotonina a través de reacciones de hidroxilación y descarboxilación y posteriormente por acción de la MAO y una deshidrogenasa se degrada la serotonina hasta ácido 5-hidroxi-indolacético (Florez y col., 1997).

Existe evidencia importante que sostiene la hipótesis de que en las vías de 5-HT, la recaptura de 5-HT y los receptores de 5-HT muestran una distribución regional en las áreas del cerebro implicadas en el proceso de la memoria y el aprendizaje, sin embargo, el papel de la serotonina en estos procesos está aún en estudio (Meneses, 1999).

II.2 Receptores

La serotonina ejerce su función al unirse a sus receptores específicos. El término receptor se ha aplicado en forma práctica para denotar cualquier macromolécula celular con la cual se liga un fármaco para iniciar sus efectos. La función de tales receptores fisiológicos consiste en la unión al ligando apropiado y la consecuente propagación de su señal reguladora en la célula blanco.

Los receptores que reciben las señales de los ligandos endógenos están localizados:

- a) Intracelularmente y reciben señales de pequeñas moléculas lipofílicas.
- b) En la superficie celular de la membrana y recibe señales de moléculas hidrofílicas y lipofílicas.

A su vez los receptores de membrana se dividen en:

II.2.1 Receptores asociados a canales iónicos: lo cuales son necesarios para el transporte de iones, glucosa, aminoácidos y nucleósidos (ajustando las necesidades de intercambio) (Goodman y col., 1996).

II.2.2 Receptores asociados a proteínas G: los receptores operan en acoplamiento con un miembro de la familia de proteínas llamadas proteínas G, cuya actividad se encuentra regulada en parte, por la asociación con GTP y GDP. La proteína G media la acción entre el receptor y el sistema efector. El patrón de estos receptores consiste en una secuencia de aminoácidos que contiene 7 segmentos

transmembranales con estructuras de α -hélice, el bucle entre los segmentos 5 y 6 y el segmento C-terminal son elementos importantes que intervienen en la relación con la proteína G (Figura 2).

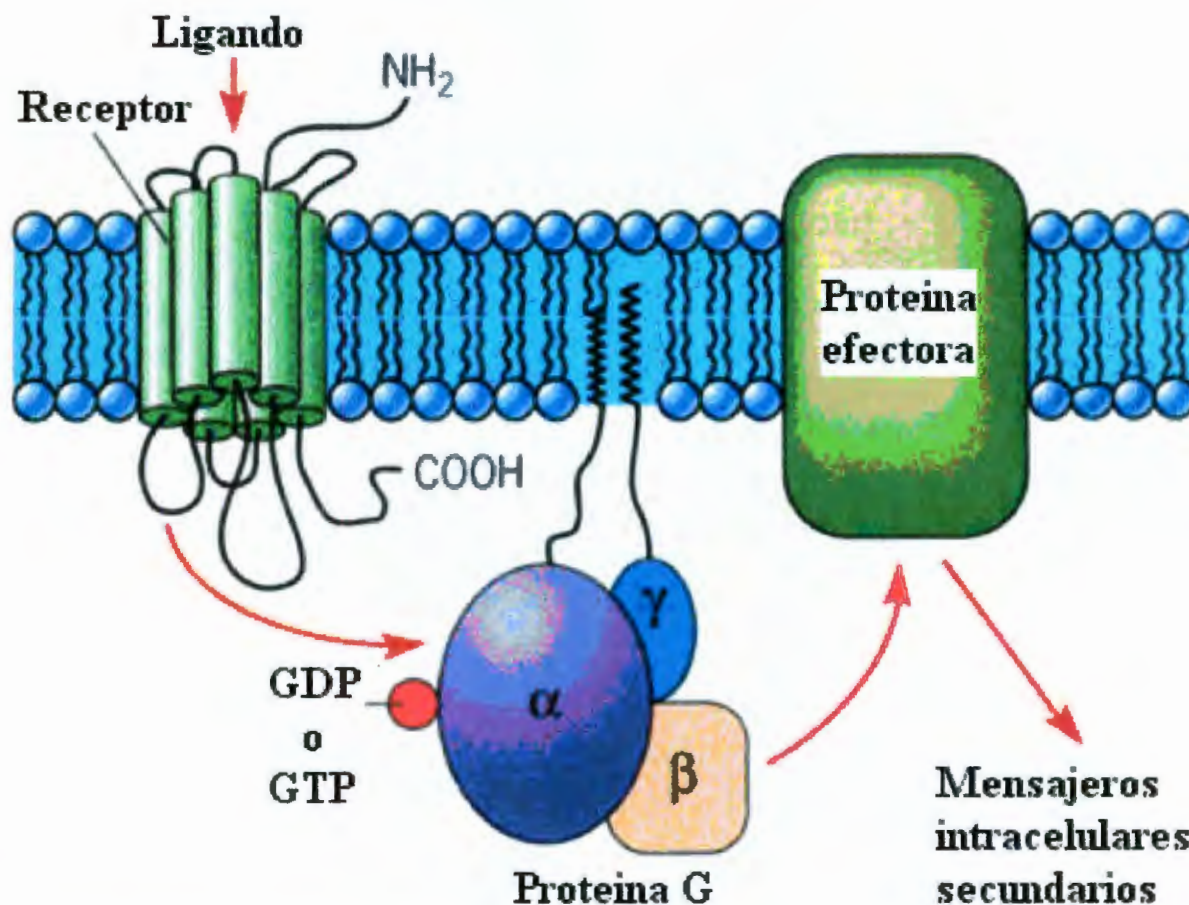


Figura 2. Estructura del receptor asociado a proteína G. Se indican los 7 segmentos transmembranales, bucle de unión a proteína G y segmentos N y C-terminal (Landwehr, 2001).

Todas las proteínas G poseen una estructura parecida que consiste en tres subunidades proteicas llamadas α , β y γ . La unidad α posee actividad GTPasa y se conocen al menos 20 formas distintas de esta subunidad, agrupadas en 4 subfamilias: α_s , $\alpha_{i/o}$, α_q y α_{12} con distinta función cada una (Cuadro 1).

Cuadro 1. Familias de subunidades de las proteínas G y sus funciones. Se describen los distintos tipos y subtipos de proteínas G y la acción de la subunidad alfa, así como la proteína que ejerce el efecto.

Familia/subtipo	Expresión	Proteínas Efectoras
Familia Gs		
α_s1	Generalizada	Activación de la Adenilato ciclasa
α_s2	Generalizada	
α_{olf}	Epitelio olfatorio	
Familia Gi		
α_{i1}	Generalizada	Inhibición de la Adenilato ciclasa Fosfolipasa A2 Activación de la Fosfolipasa C Activación de un Canal de K Inhibición de un Canal de Ca. Activación de la Fosfodiesterasa Activación de la Fosfodiesterasa No se conocen Inhibición de la Adenilato ciclasa
α_{i2}	Generalizada	
α_{i3}	Generalizada	
α_{o1}	Cerebro	
α_{o1}	Cerebro	
α_{t1}	Retina (bastones)	
α_{t2}	Retina (conos)	
α_{gust}	Papilas gustativas	
α_z	Cerebro y plaquetas	
Familia Gq		
α_q	Generalizada	Activación de la Fosfolipasa C- β
α_{11}	Generalizada	
α_{14}	Generalizada	
α_{15}	Células hematopoyéticas	
Familia G12		
α_{12}	Generalizada	No se conocen
α_{13}	Generalizada	

II.2.3 Receptores con actividad enzimática intrínseca: esto significa que en la porción extracelular del receptor existe un dominio al cual se fija el ligando, y que la presencia del agonista en este dominio provoca la modificación adecuada para que la porción intracelular de esa molécula, la que posee actividad enzimática, actúe sobre sus sustratos. A este tipo pertenecen los receptores de la guanililciclasa.

II.2.4 Receptores asociados a cinasas de tirosina: estos no poseen actividad de cinasa de tirosina en su molécula, sino que se encuentran directamente asociados a otras moléculas citosólicas independientes (Florez y col., 2000).

II.3 Receptores a Serotonina

Se cree que las vías serotoninérgicas así como los receptores están implicados en áreas cerebrales relacionadas con procesos cognoscitivos normales así como sus disfunciones o trastornos. Por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer (AD) están asociados los decrementos en los marcadores de 5-HT como son en el complejo de Rafe, en la relación captación/transporte y una disminución en los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} y 5-HT₄. (Meneses, 1999).

Usando ligandos específicos, vías de transducción asociadas a segundos mensajeros y actividad funcional, así como las nuevas técnicas de Biología Molecular como la clonación y la secuenciación, han permitido identificar 20 diferentes subtipos de receptores a serotonina. Estos fueron asignados en siete familias 5-HT₁₋₇, como se representa en el Cuadro 2.

La familia de receptores a serotonina son principalmente proteínas con 7 segmentos transmembranales, esto quiere decir que son receptores metabotrópicos o receptores asociados a proteínas G, exceptuando al receptor a 5-HT₃, que es una proteína ligada a canal iónico. Mucha nueva información acerca de la distribución y función de los diferentes subtipos de receptores a serotonina en el sistema nervioso central se ha obtenido gracias al desarrollo de nuevos compuestos con alta selectividad por receptores individuales específicos (Barnes y Sharp, 1999).

Cuadro 2. Clasificación de los diferentes subtipos de receptores a serotonina. Los mecanismos de acción de los subtipos de receptores a serotonina, en su mayoría están asociados a proteínas que unen GTP (proteínas G) y activan a segundos mensajeros exceptuando 5-HT₃ que forma canales iónicos.

Tipo de Receptor	Mecanismo de transducción	Subtipos
5-HT ₁	AC(-) G/Go	1A, 1B, 1E, 1F
5-HT ₂	PLC(+) Go	2A, 2B, 2C
5-HT ₃	Canal iónico NA/K/Ca	3A, 3B
5-HT ₄	AC(+) Go	4A, 4B, 4C, 4D
5-HT ₅	AC(-) ? Go	5A, 5B
5-HT ₆	AC(+) Go	
5-HT ₇	AC(+) Go	7A, 7B, 7C, 7D

Distintos niveles de afinidad de diferentes compuestos, agonistas y antagonistas, para receptores a serotonina específicamente para el receptor 5-HT₇, como los son la 5-Carboxamido Triptamina (5-CT), Serotonina (5-HT), 8-Hidroxi Dipropilaminotetralin (8-OH-DPAT) como agonistas y SB-269970, Methiothepin, Risperidone y Methysergide como antagonistas, entre otros demostraron que el uso de éstos puede ser un método eficaz para la caracterización y afinidad de este receptor en especial (Thomas y col., 2002).

Un estudio realizado por Mengod y col., 1990, reporta la relación entre la expresión de mRNA para receptor a 5-HT_{1C}, mediante hibridación *in situ* con una sonda marcada, y la presencia del receptor mediante la unión de un radioligando donde se reportó la presencia de mRNA para 5-HT_{1C} principalmente en zonas del sistema límbico y olfatorio, así como en la amígdala y el núcleo talámico, la región CA3 del hipocampo etc, resultados que son consistentes con los de Molineaux y col., 1989, en cuanto a la presencia de mRNA. Simultáneamente, reportaron la

presencia del receptor, encontrando pequeñas inconsistencias con respecto a la presencia del transcrito y el receptor, en zonas como núcleos subtalámicos y núcleos laterales de la habénula.

La clonación y caracterización de un nuevo receptor a serotonina, designado primeramente como REC20 contenía una secuencia de 3.6Kb y una estructura de 435 aminoácidos, el cual posteriormente fue nombrado como 5-HT₇, dicho receptor está acoplado a la estimulación de la adenilato ciclasa, que mediante el uso de la técnica de Northern Blot observaron que la distribución de este mRNA, se encontraba principalmente en zonas del encéfalo como el tálamo y el hipocampo no así en otros tejidos como gónadas, bazo, riñón, hígado etc. El mRNA de 5-HT₇ se expresa a través del sistema nervioso central, predominantemente en el tálamo e hipotálamo y posiblemente en el núcleo supraquiasmático (SCN), hecho observado mediante la técnica de hibridación *in situ* en encéfalos de ratas adultas, este descubrimiento sugeriría una acción fisiológica en la regulación de los ritmos circadianos para un tipo de receptor a serotonina (Lovenberg y col., 1993). De igual manera Ruat y col., 1993 proponen el nombramiento de otra familia para un receptor nuevo que clonaron a partir de una secuencia de 448 restos de aminoácidos. Con estudios farmacológicos con LSD y otros agonistas y antagonistas proponen un mecanismo de acción diferente al de las demás familias de receptores a serotonina, proponiendo un modelo que implica ser un receptor asociado a proteínas Gs activando la formación de AMP cíclico. Mediante técnicas como Northern Blot e Hibridación *in situ*, Ruat y col., 1993, de la misma manera que Lovenberg y col., 1993, encuentran una expresión del mRNA principalmente en encéfalo de rata adulta, específicamente en zonas relacionadas al sistema límbico.

El receptor a 5-HT₇ es el receptor más recientemente descubierto. El cDNA de este receptor ha sido identificado para diferentes especies como lo son: *Xenopus laevis*, ratón, rata, cobayo y humano. El receptor a 5-HT₇ parece ser el homólogo a mamífero para el 5-HT_{dro1}, receptor identificado en la mosca de la fruta, *Drosophila*

melanogaster. Se predice que el receptor a serotonina 5-HT₇ de mamífero es una cadena que cuenta con aproximadamente 445-448 restos de aminoácidos.

El gen para el receptor a 5-HT₇ se encuentra localizado en el cromosoma número 10 y contiene 2 intrones. La presencia de uno de estos intrones corresponde al bucle intracelular, y es por eso que cualquier alternativa que surge que se empalme en este sitio es ineficaz. Aunque existe la presencia de por lo menos 4 variantes empalmadas del receptor 5-HT₇ (5-HT_{7A}, 5-HT_{7B}, 5-HT_{7C} y 5-HT_{7D}) los tejidos de rata y de humanos parecen solo expresar 3 de estas variantes. Así, solo las isoformas de los receptores 5-HT_{7A}, 5-HT_{7B} y 5-HT_{7C} son expresadas en tejidos de rata debido a la ausencia del exón responsable para la expresión de la isoforma 5-HT_{7D} en el gen de la rata (Barnes y Sharp, 1999). Aunque el gen humano puede aparentar ser capaz de generar la isoforma 5-HT_{7C} no ha sido detectado en tejido humano nativo (Heidmann y col., 1997).

La secuencias predichas para las distintas isoformas del receptor a 5-HT₇ muestra 7 regiones membranales putativas características de la superfamilia de receptores asociados a proteínas G. El receptor contiene secuencias para dos sitios destinados a la N-glicosilación terminales y secuencias para sitios donde se efectúan las fosforilaciones por acciones de las cinasas de proteínas A y C en el tercer bucle intracelular y un C-terminal citoplasmático. El receptor a 5-HT₇, tanto el recombinante como el nativo, estimulan la adenilato ciclasa en relación a sus 7 segmentos transmembranales. Coherentemente con otros miembros de la superfamilia de receptores asociados a proteínas G, los restos aminoácidos del tercer bucle intracelular del receptor 5-HT₇, sugieren una actividad asociada a proteínas G α s (Obosi y col., 1997).

En ratas y en cobayos se ha sugerido que la distribución del mRNA y de la unión receptor-ligando, en el SNC es similar, lo que sugiere que el receptor se expresa cerca del lugar de síntesis del mRNA. La expresión del receptor 5-HT₇ es

relativamente alta en regiones como lo son el tálamo, el hipotálamo y el hipocampo con niveles de expresión menores en áreas como la corteza cerebral y la amígdala (To y col., 1995).

En un estudio comparativo entre la técnica de binding, que es una técnica que busca la presencia del receptor mediante la unión de este y su ligando, y la técnica de hibridación *in situ*, realizado por To y col., 1995, para 5-HT₇ en ratas adultas, reportan una distribución similar entre el transcrito y el receptor, exceptuando las zonas CA1 y CA2 del hipocampo y giro dentado, siendo mayor la expresión del receptor que del transcrito en estas zonas.

Exposiciones crónicas de astrocitos a antidepresivos como, amitriptilina, clomipramina, mianserina, maprotilina y setiptilina, indican un aumento en la producción de AMP cíclico estimulado por serotonina que se ha asociado a su interacción con el receptor 5-HT₇ (Shimizu y col., 1998).

La relación entre la expresión del mRNA para receptor a 5-HT₇, mediante hibridación *in situ* con una sonda de 45pb marcada con [³⁵S]-dATP, y la presencia del receptor; mediante la unión del ligando [³H]-5-CT fue reportada para distintas zonas del encéfalo de rata adulta. En todas las áreas reportadas para la hibridación *in situ*, en el encéfalo de rata de 200-225 gr, se considera la expresión restringida a neuronas, aunque se requieren estudios en células gliales. La zona con una expresión mas fuerte de mRNA fue CA3 del hipocampo y una expresión moderada en zonas como corteza piriforme, capa granular del cíngulo, cortezas retrospleniales, induseum griseum, taenia tecta y parasubiculum, y una pobre expresión en zonas como la capa 2 de la neocorteza dorsal, CA1 y CA2 del hipocampo, septum lateral y medio, y la región dorsal del núcleo amigdaloido. Un dato especial que reportan es la ausencia de señal de expresión en el núcleo supraquiasmático (SCN). Además reportan una fuerte concordancia entre la expresión del mRNA y la presencia del receptor en zonas como la capa superficial

de la neocorteza, el septum lateral, el hipotálamo, y partes de la formación del hipocampo (Gustafson y col., 1996).

El estudio realizado de 5-HT₇ durante el desarrollo postnatal reportado por Vizuete y col., 1997, indica una fuerte hibridación en el tálamo de las edades postnatal P5, P8, P15, P21 y adulto, reportando una disminución considerable en la transición de P5-P8 a adulto en la zona de CPu, y una expresión similar en la capa piramidal celular CA3, IMD y la habénula lateral. Un aumento en la señal de la hibridación entre las edades postnatal 15 y 21 en las zonas de la corteza granular retrosplenial, subiculum y habénula media.

En el estudio de Venero y col., 1997, la expresión de mRNA para receptor a 5-HT₇, es inducida principalmente en estrato óptico después de remover los globos oculares; efecto evidente hasta la edad postnatal 21 de igual manera, observaron un aumento en la expresión del mRNA en la corteza visual primaria de la edad postnatal 15 a postnatal 21, con estos resultados sugieren que el receptor 5-HT₇ juega un papel importante en la neurogénesis activada por efecto de la pérdida de los ojos.

Se sugiere que la administración intracerebroventricular de oligonucleótidos antisentido contra mRNA para receptor a 5-HT₇ reducen en un 45% aproximadamente la unión entre el receptor 5-HT₇ y [³H]5-HT en el hipotálamo de rata, mas no así en la corteza cerebral. Este tratamiento no indica cambios en el sistema locomotor, comportamiento de exploración, ni ningún tipo de ansiedad; sin embargo, es común que con este tipo de tratamientos puedan aparecer efectos no específicos como una reducción en la asimilación de alimento (Clemett y col., 1998).

La expresión del mRNA para receptor a 5-HT₇ fue estudiada mediante hibridación *in situ*, utilizando un sonda de 379pb marcadas con [³²P]-UTP y [³⁵S]-UTP, en encéfalo de rata, observando cambio en la expresión a través del

crecimiento de la rata comparando entre diferentes edades nombrándolas como joven (3 meses), edad media (12 meses) y adultas (24 meses), reportando altos niveles de expresión en zonas como la tenia tecta, el septum lateral, el tálamo, CA3 del hipocampo y zonas aledañas así como en el núcleo supraquiasmático (SCN) mostrando una discrepancia importante con el reporte hecho por Gustafson y col., 1996 donde reportan una ausencia de expresión en el SCN. Niveles menores de expresión fueron observados en zonas como la corteza, amígdala, área CA1 y giro dentado del hipocampo. Los resultados indican una baja significativa en la expresión del mRNA en el área CA3 del hipocampo entre las edades joven y edad media (Kohen y col., 2000).

El estudio realizado por Kinsey y col., 2001, reporta una comparación de la distribución del mRNA en encéfalo de rata para receptores 5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}, 5-HT₆ y 5-HT₇. Usando ratas de 230 gr y una sonda para las bases complementarias de 1097-1140 y marcadas en el extremo 3' con [³⁵S]desoxiadenosina TdT 5' alfa-tiotrifosfato, reportaron los más altos niveles de expresión para mRNA de 5-HT₇ en núcleo talámico incluyendo zonas como paratenial, paraventricular y anteroventral, así como en hipocampo; particularmente en la zona CA3 y en zonas como corteza piriforme, tenia tecta y núcleo medio mamilar, siendo zonas consistentes con los demás estudios y principalmente la zona CA3 reportada previamente. Este estudio reporta la relativa ausencia de mRNA en el núcleo supraquiasmático, sustentando los reportes hechos por Gustafson y col., 1996, y teniendo discrepancia nuevamente con Kohen y col., 2000, sugiriendo así la reducción de una intervención de este receptor como parte del proceso en los ritmos circadianos. Reportan además zonas de expresión común para las 3 familias de receptores, como son el hipocampo; sugiriendo un papel importante de estos receptores en el proceso de memoria y aprendizaje, además de una expresión común en el núcleo amigdalóideo, donde sugieren un papel para los receptores relacionado en comportamientos como la ansiedad.

II.4 Expresión Genética

Los receptores para serotonina así como todas las proteínas que se encuentran en el cuerpo humano son consecuencia de la expresión de genes. Los planos para la construcción de un organismo están codificados en su ácido nucleico; gran parte del desarrollo físico de un organismo a lo largo de su vida está programado en estas células y las funciones que realizará están todas registradas en esta cinta molecular (Mathews y Van Holde, 2001). El flujo de la información genética en la célula puede resumirse mediante el sencillo esquema siguiente de la Figura 3.

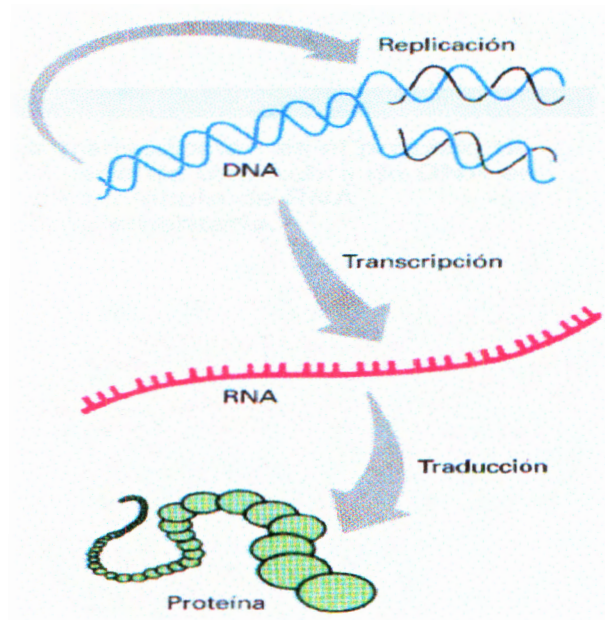


Figura 3. Flujo de información genética en una célula típica. Replicación, transcripción y traducción de un gen en una célula eucariota, es el proceso por el cual debe de pasar un gen para poder ser expresado (Mathews y Van Holde, 2001).

II.4.1 Replicación: la replicación del DNA es conceptualmente sencilla, pero compleja en su mecánica; la transferencia de la información implica simplemente desenrollar las hebras de una doble hélice de DNA original, acompañada de la síntesis de dos hebras hijas complementarias. La replicación es semiconservativa, esto quiere decir que da lugar a moléculas de DNA hijas que contienen una hebra original y un material de nueva síntesis.

II.4.2 Transcripción: es la síntesis de RNA utilizando DNA como molde. La expresión de la información genética comporta siempre un primer paso de transcripción de los genes en moléculas complementarias de RNA. Cada uno de estos procesos, la replicación del DNA y la transcripción requieren de un conjunto especial de enzimas catalizadoras. Entre las que se encuentran las polimerasas.

II.4.3 Traducción: es la síntesis de proteínas a partir de mRNA por acción de tRNA, enzimas especiales y ribosomas (Mathews y Van Holde, 2001).

II.5 Regulación de la expresión genética.

La mayor parte de las células especializadas de un organismo pluricelular son capaces de alterar su patrón de expresión génica como respuesta a señales extracelulares o responder a cambios según las condiciones fisiológicas (Alberts y col., 1996), otros genes son regulados durante el desarrollo, como los genes que organizan a las células en tejidos y éstos en órganos (Griffiths y col., 1999).

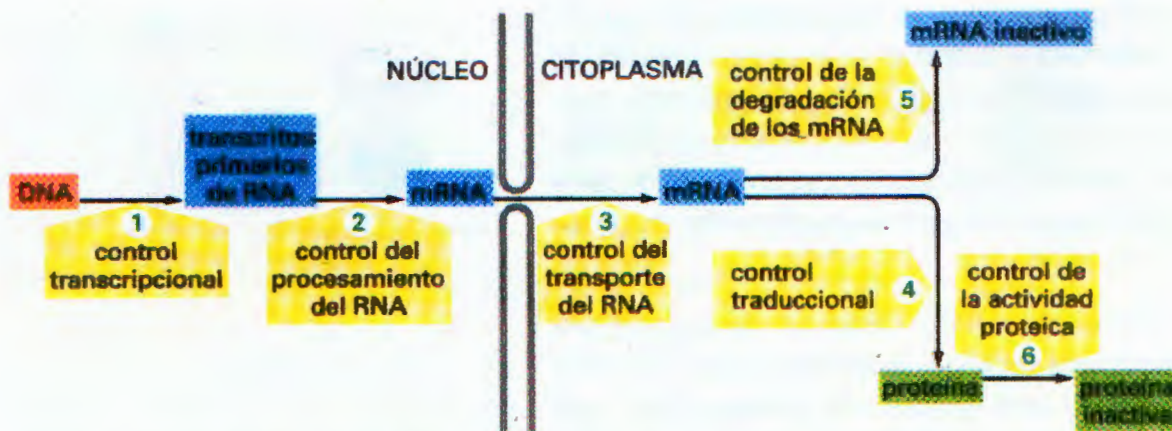


Figura 4. Etapas de control en la expresión genética. La regulación del momento y la frecuencia de la transcripción de genes concretos (control transcripcional), control del modo de maduración o procesamiento de los transcritos primarios del RNA (control del procesamiento del RNA), selección de los mRNA maduros que van a ser exportados al citoplasma (control del transporte de RNA), selección de los mRNA citoplasmáticos que van a ser traducidos por los ribosomas (control traduccional) desestabilización selectiva de algunas moléculas de mRNA citoplasmático (control de la degradación de mRNA), activación, inactivación o ubicación de modo selectivo de las proteínas ya sintetizadas (control de la actividad proteica) (Alberts y col., 1996).

La mayor parte de los genes en organismos eucarióticos, están regulados a nivel de la transcripción (Griffiths y col., 1999). La transcripción es la síntesis de RNA catalizada por la enzima RNA polimerasa II. Se sabe que existen 5 tipos de RNA polimerasa, aunque probablemente la más importante de las 5 sea la RNA pol. II, ya que toma el DNA para codificar productos proteicos, principalmente, y algunos RNA's nucleares pequeños, mientras que la RNA pol. I transcribe rRNA (excepto 5S), la RNA pol. III transcribe rRNA 5S y otros RNA's pequeños y las RNA mitocondrial y cloroplástica transcriben únicamente RNA mitocondrial y cloroplástico respectivamente (Mathews y Van Holde, 2001).

La transcripción necesita la presencia de un promotor mínimo que es la región de DNA que se encuentra aproximadamente 30 pb antes del sitio de inicio de la transcripción (Griffiths y col., 1999) que contiene a la caja TATA (una

secuencia de DNA rica en timina y adenina). Esta región es reconocida por una proteína denominada TBP (TATA binding protein), proteína a la cual se le unen otras proteínas como TFIID, TFIIE, TFIIH, TFIIJ, etc, denominadas TAF's o factores generales de transcripción y facilitan la unión de la RNA pol. II, que en presencia de ATP la RNA pol. II es fosforilada para poder dar inicio a la transcripción. Figura 5 (Alberts y col., 1996).

Existen además, simultáneamente, secuencias de DNA que se encuentran adyacentes al promotor, como la secuencia CCAAT o un segmento rico en GC; (Griffiths y col., 1999) o secuencias muy lejanas por delante de él e incluso por detrás, que son conocidas como secuencias reguladoras las cuales sirven como sitio de reconocimiento para la unión de proteínas o factores reguladores, conocidos como activadores o represores, los cuales pueden controlar la velocidad del proceso de ensamblaje de las proteínas TAF determinando así la velocidad de inicio de la transcripción y el aumento o disminución en la velocidad de transcripción (Alberts y col., 1996). Existen 3 mecanismos de acción principales de las proteínas represoras: compitiendo con el activador por el sitio de unión en la misma secuencia reguladora de DNA, creando un complejo con el dominio del activador o actuando directamente sobre los factores generales de transcripción. El mecanismo de acción de las proteínas activadoras es principalmente: la unión de la proteína reguladora al complejo TFIID facilitando la unión de TFIIB. Existe además, el control integral de complejos y proteínas tanto activadores como represores, que consiguen un solo efecto, aunque no se conoce su acción conjunta. La posición relativa de éstas secuencias reguladoras dependerá del gen al que estén regulando (Alberts y col., 1996). Algunos factores transcripcionales específicos pueden ser regulados, en el cuerpo humano, desde una región muy distante, esto es por acción de hormonas lipofílicas, principalmente hormonas esteroideas (Griffiths y col., 1999).

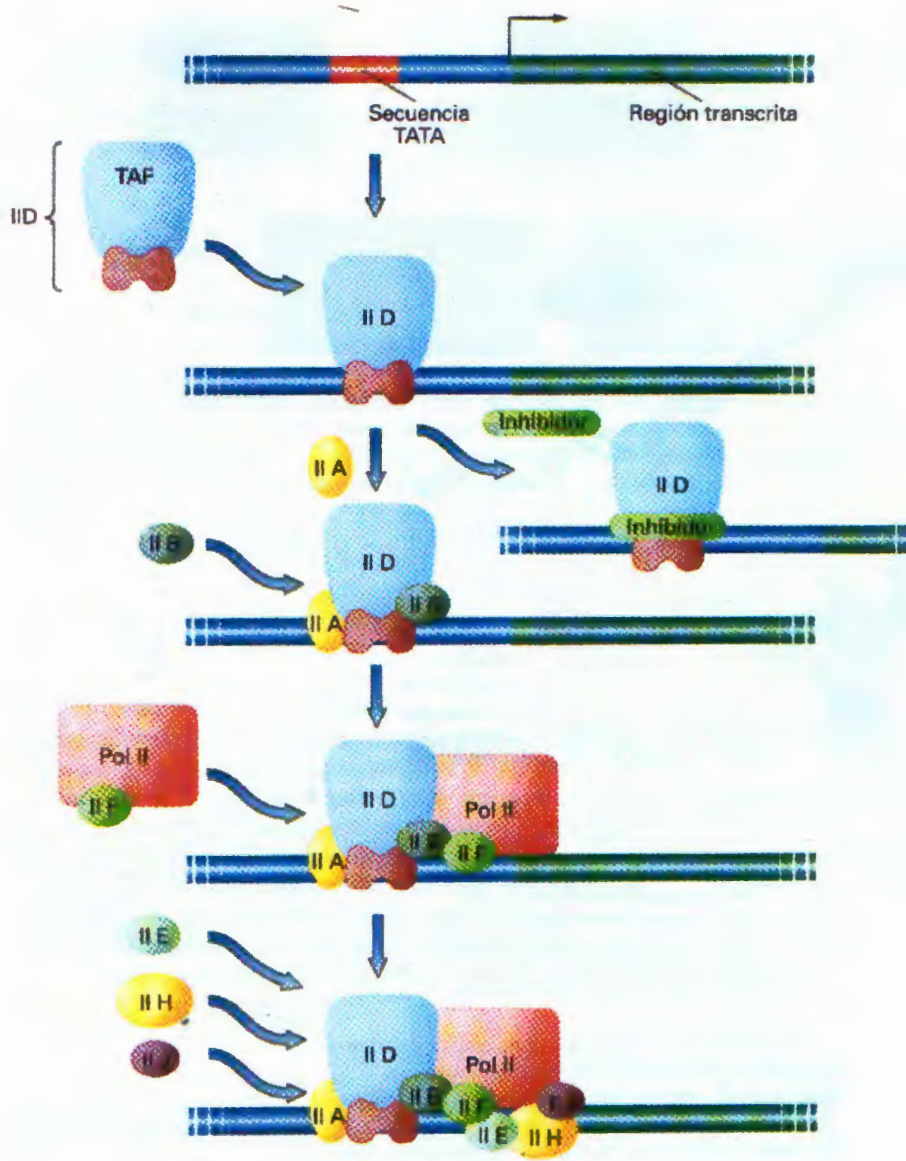


Figura 5. Ensamblaje para la transcripción por la RNA pol II. La formación del complejo de iniciación comienza con la unión de TFIID; compuesto por una subunidad de unión a la caja TATA (TBP) y más de 8 subunidades adicionales denominadas TAF. En este punto, los inhibidores pueden unirse a este complejo TFIID-promotor y bloquear la unión de los demás factores y por consecuencia la transcripción. La unión de TFIIA al complejo TFIID-promotor, impide la unión de inhibidores. TFIIB se une entonces al complejo, seguido por una unión previamente formada entre TFIIF y la polimerasa de RNA II. Finalmente TFIIE, TFIIH y TFIIJ se incorporan en ese orden al complejo y en presencia de ATP, se da la fosforilación de Pol II y la transcripción puede iniciarse (Griffiths y col., 2000).

II.6 Desarrollo del sistema nervioso central.

La presencia de receptores a serotonina dependientes del control en la expresión genética, son eventos continuos y fundamentales que se dan a través de todo el proceso del desarrollo, el cual comienza con el período embrionario. El período preembrionario se inicia cuando se fecunda un oocito. La fecundación es una secuencia de fenómenos que se inicia con el contacto entre un espermatozoo y un oocito secundario y termina con la fusión de los núcleos del espermatozoo y el óvulo y con la combinación de los cromosomas maternos y paternos (Moore, 1995). Cuando el cigoto ha llegado al período bicelular, experimenta una serie de divisiones mitóticas que producen un rápido incremento en el número de células. Tres días después de la fecundación el embrión compactado vuelve a dividirse para formar la mórula de 16 células.

Cuando la mórula entra en la cavidad uterina, comienza a introducirse líquido hacia los espacios intercelulares que poco a poco confluyen y forman una cavidad única, el blastocele, en esta etapa el embrión recibe el nombre de blastocisto. Las células de la masa celular interna; llamadas embrioblasto, están situadas en un polo, y las de la masa celular externas, llamada trofoblasto se aplanan y forman la pared celular del blastocisto (Sadler, 2001).

La implantación del blastocisto termina al final de la segunda semana de desarrollo. Al mismo tiempo se forma el saco vitelino primario y surge el mesodermo extraembrionario de la superficie interna del citotrofoblasto.

El inicio del período embrionario se da a partir de la tercera semana. El desarrollo rápido del embrión a partir del disco embrionario se caracteriza por la formación del tallo de conexión, notocordio y tres capas germinales las cuales originan todos los tejidos órganos del embrión. El proceso por el cual el disco embrionario bilaminar pasa a trilaminar se conoce como gastrulación Figura 6. La gastrulación establece las tres capas germinales del embrión, cada una de estas

capas origina tejidos y órganos específicos. El ectodermo forma la epidermis, el sistema nervioso y varias estructuras más. El endodermo constituye el origen de los recubrimientos epiteliales de las vías respiratorias y digestivas, así como las glándulas de los órganos anexos como el hígado y el páncreas. El mesodermo forma las capas musculares lisas, tejido conjuntivo y vasos que riegan tejidos y órganos (Sadler, 2001).

GASTRULACIÓN

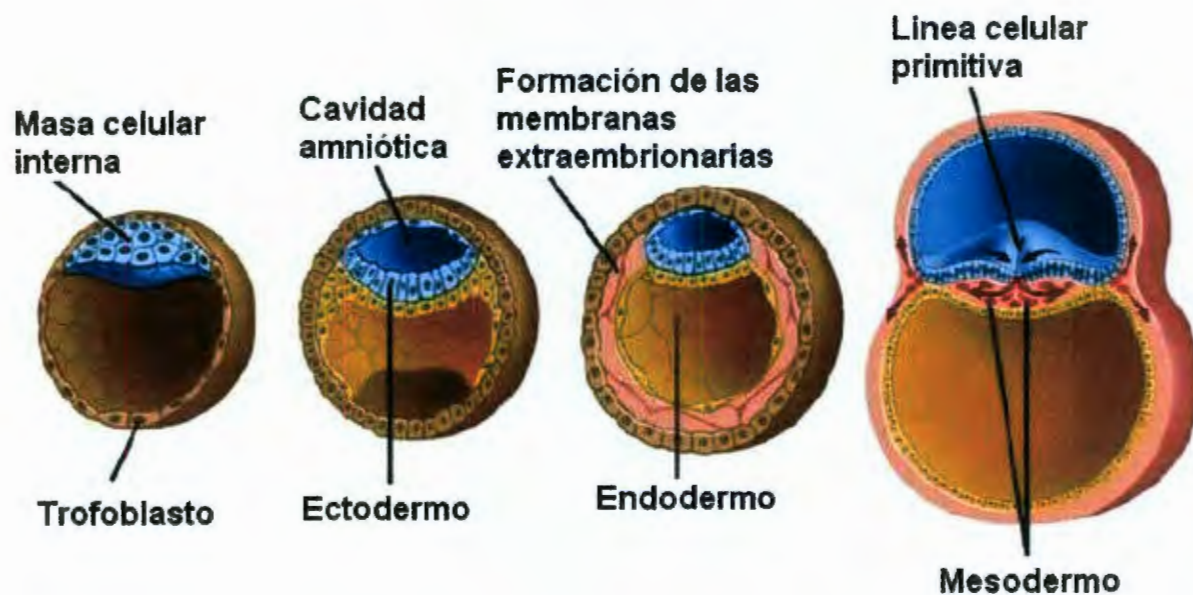


Figura 6. Gastrulación. Proceso de formación del disco trilaminar a partir del disco bilaminar por medio de la elevación de la blastoporo (Gilbert, 2001).

La neurulación es el proceso que se relaciona con la formación de la placa neural, los pliegues neurales y el cierre de estos para formar el tubo neural Figura 7 (Moore, 1995).

El sistema nervioso central aparece al comienzo de la tercera semana del desarrollo como una placa alargada y en forma de zapatilla de ectodermo

engrosado: la placa neural. Poco después sus bordes laterales se elevan y forman los pliegues neurales.

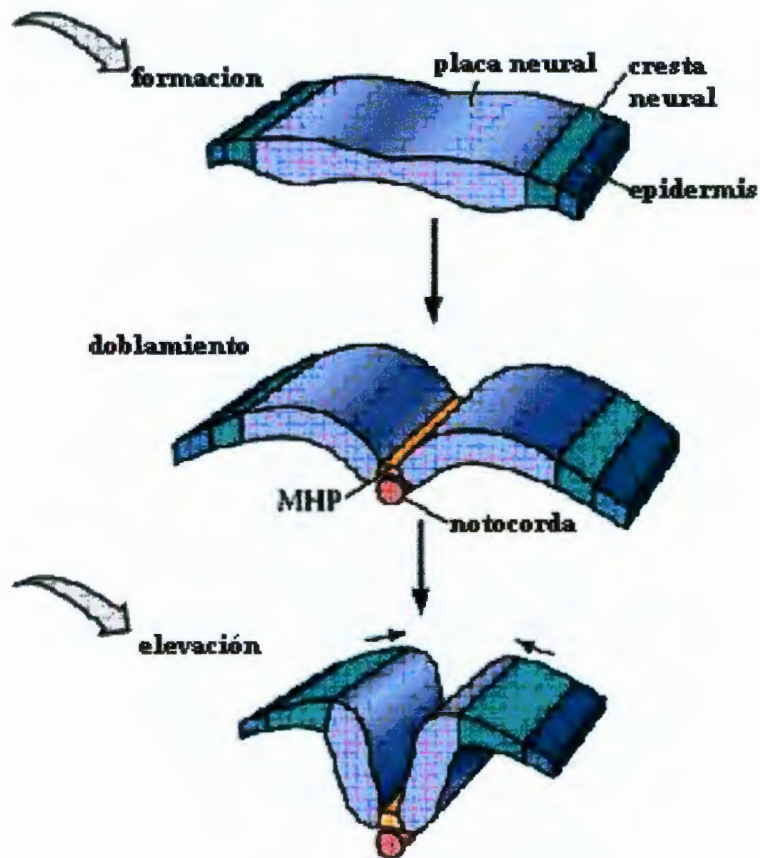


Figura 7. Neurulación I. Proceso de formación del engrosamiento del ectodermo (placa neural) y se crea una elevación y un doblez para formar el tubo neural (Gilbert, 2001).

Conforme el tubo neural se separa las células neuroectodérmicas que perdieron afinidad epitelial, migran a cada lado del tubo neural en forma ventrolateral donde originarán los ganglios sensoriales de los nervios raquídeos y craneales. La fusión comienza en la región cervical y continúa en dirección cefálica y caudal (Sadler, 2001).

El tubo neural tiene aberturas en sus extremos craneal y caudal que se llaman neuroporos craneal y caudal respectivamente. La neurulación termina en la

cuarta semana del humano, cuando se cierran los neuroporos Figura 8 (Moore, 1995).

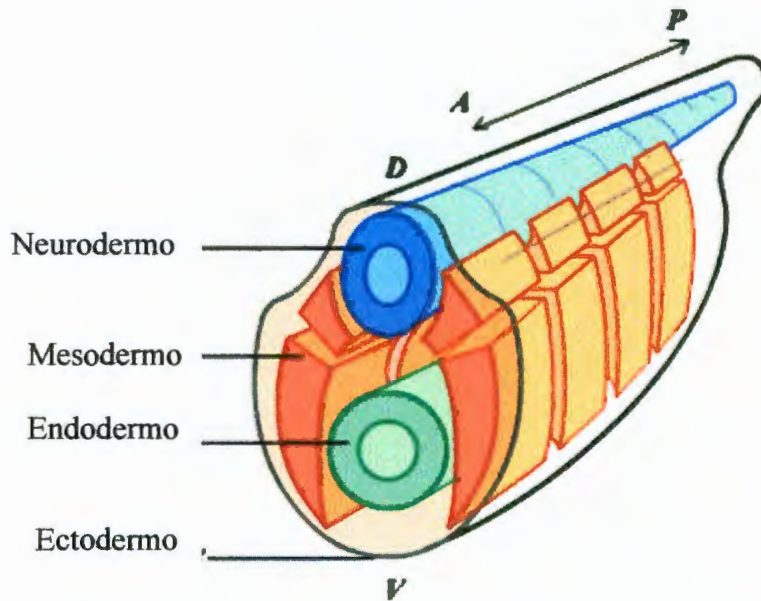


Figura 8. Neurulación II. Finalización de la neurulación por efecto del cierre del neuroporo caudal (Gilbert, 2001).

En este momento el sistema nervioso central es una estructura tubular con una porción cefálica ancha, el encéfalo, y una porción larga caudal, la médula espinal. El encéfalo constituye la porción craneal del sistema nervioso y, en su origen, consta de rombencéfalo, mesencéfalo y prosencéfalo. El rombencéfalo está dividido a su vez en mielencéfalo que da origen al bulbo raquídeo, el metencéfalo que da origen al cerebelo y el puente que es la vía para la unión entre médula espinal y las cortezas cerebral y cerebelosa; el mesencéfalo posee los núcleos oculomotores y finalmente el prosencéfalo compuesto por el telencéfalo, en la quinta semana embrionaria, da origen a los hemisferios cerebrales y el diencéfalo que participa en la formación de los ojos, hipófisis, tálamo e hipotálamo (Sadler, 2001).

En base a los antecedentes mencionados:

- a. La serotonina ejerce sus funciones principalmente en el sistema nervioso central interactuando con una gran variedad de receptores.
- b. La distribución de los receptores a serotonina en ratas adultas ha sido determinada mediante el uso de agonistas y antagonistas de afinidad variable.
- c. Se ha sugerido que el receptor a 5-HT₇ participa en el proceso de neurogénesis.
- d. Se han reportado cambios en la distribución del receptor a 5-HT_{1b} durante el desarrollo del encéfalo de rata.

Se planteará la hipótesis.

III. HIPÓTESIS.

La distribución del transcrito para 5-HT₇ en encéfalo de rata estudiado con el método de hibridación *in situ* se modifica durante la ontogenia.

IV. OBJETIVOS.

General

Estudiar la distribución del mRNA para receptor 5-HT₇ durante la ontogenia encéfalo de rata mediante la técnica de hibridación *in situ*.

Específicos

- Estandarizar los tiempos de hibridación y revelado en la técnica de hibridación *in situ* para el mRNA específico del receptor a 5-HT₇.
- Comparar la distribución del transcrito a través de las diferentes etapas de desarrollo del encéfalo de rata.

V. METODOLOGÍA.

Materiales.

- Jeringas de 1 mL con aguja.
- Guillotina.
- Equipo de disección.
- Tubos Falcon de 50 y 15 mL.
- Crióstato LEICA CM 1850
- Laminillas DAIGGER Superfrost/Plus
- Plato caliente
- Cámara de hibridación.
- Micropipetas de 1000, 200 y 20 μ L con puntas.
- Vasos de precipitado de 250 y 125 mL.
- Probetas de 100, 250 y 500 mL.
- Papel aluminio.

Métodos.

Se usaron ratas Sprague Dawley de diferentes edades; embrionario 18 (E18), post-natal 0 (P0), post-natal 5 (P5) y post-natal 11 (P11) mantenidas con agua y alimento *ad libitum*, con períodos de luz y oscuridad de 12:12 horas, a una temperatura de 22 ± 2 °C aproximadamente.

Para obtener los tejidos, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/Kg por vía intraperitoneal, se decapitaron y se les practicó una disección del encéfalo. Una vez obtenido el encéfalo se introdujo en solución de paraformaldehído al 3.5 % a 4 °C por 24 horas. Posteriormente se pasó el tejido a una solución de sacarosa al 30 % a 4 °C hasta que el tejido descendió al fondo del recipiente.

Se pasaron los tejidos a recipientes de papel aluminio lo suficientemente pequeños para que entre el tejido, y se les añadió Tissue-Tek y se guardaron en el congelador a -70 °C toda la noche. Una vez fijados los tejidos se hicieron cortes coronales de 10 μm a través de todo el encéfalo con ayuda de un crióstato LEICA CM 1850 y posteriormente se montaron en laminillas DAIGGER Superfrost/Plus almacenadas hasta su uso. El día de su uso las laminillas se pusieron en plancha caliente a 60 °C durante 20 minutos para evitar que se desprendieran los tejidos.

Técnica de Hibridación *in situ* en corte de Tejido

La técnica de hibridación *in situ* consta de tres partes:

1. La muestra se somete a 2 lavados durante 8 minutos con solución de PBT (PBS 1X y Tween 20 al 0.1%) a temperatura ambiente (TA), se lleva a cabo una deshidratación y rehidratación gradual del tejido con mezclas de alcoholes en dilución con PBT; 1 lavado de 3 minutos con metanol al 50 % a TA, 2 lavados de 3 minutos con metanol al 100 % a TA, 1 lavado de 3 minutos con metanol al 66 % a TA, 1 lavado de 3 minutos con metanol al 50 % a TA, 1 lavado de 3 minutos con metanol al 33 % a TA. Se aplicaron 2 lavados de 5 minutos con solución de PBT a TA y un lavado de 5 minutos con una mezcla 1:1 de PBT y mezcla de hibridación (formamida 50 %, SSC (en ácido cítrico) 1.3 X, EDTA (pH 8) 5 mM, RNA de levadura 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Tween-20 0.2 %, CHAPS 0.5 %, heparina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 1 lavado de 5 minutos con mezcla de hibridación a TA, 1 lavado de 1 hora con mezcla de hibridación a 50 °C en una cámara saturada con formamida 50 %, finalmente se le adicionó una mezcla de sonda con mezcla de hibridación (se calientan 500 μL de la mezcla de hibridación a 70 °C y se le agregan 3 μL de sonda en suspensión, se calienta por 10 minutos a 68-70 °C, y se incuba en hielo durante 2 minutos, esta mezcla es suficiente para un portaobjetos) y se incuba toda la noche a 50 °C en una cámara húmeda.

2. La segunda parte de la hibridación consiste primeramente de un bloqueo de la reacción de hibridación lavando 2 veces con mezcla de hibridación (50 °C) por 10 minutos a TA, 2 lavados con mezcla de hibridación (50 °C) por 45 minutos a TA, 1 lavado con una mezcla 1:1 de TBST (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 25 mL Tris-Cl pH 7.5 y 11 g de tween-20 y aforar a 1 litro) y mezcla de hibridación (50 °C) por 10 minutos a TA, 2 lavados de 15 minutos con TBST a TA en cámara húmeda, 1 lavado de 60 minutos con solución de bloqueo 1 X (para la solución de bloqueo 10 X: agente de bloqueo 10 % en buffer de ácido maleico) a TA y finalmente la adición de mezcla con anticuerpo anti-dig 1:200 (500 µL de solución de bloqueo mas 1 µL de anticuerpo, agitar 1 hora a 4 °C y diluir hasta 2 mL con TBST. Esta mezcla es suficiente para 2 portaobjetos) y se incubó toda la noche a 4 °C. Este anticuerpo reconoce la digoxigenina que se encuentra en la sonda con la que se llevo a cabo la hibridación para su posterior identificación

3. Como paso final de la hibridación se realizó el revelado de la hibridación de la siguiente manera: se lavó 2 veces durante 10 minutos con solución TBST a TA, 2 lavados durante 45 minutos con solución TBST a TA y dos lavados de 10 minutos con solución de NTMT (NaCl 5 M, Tris HCl 2 M pH 9.5, MgCl₂ 2 M, Tween-20 10 %) a TA. Finalmente se adicionó la solución reveladora previamente preparada que consta de una mezcla de 1.5 mL de NTMT, 3.5 µL de BCIP y 4.5 µL de NBT; esta solución fue suficiente para 2 portaobjetos. En este punto, el revelado se hizo en una cámara donde los portaobjetos no fueron expuestos a la luz UV, y finalmente se monitoreó el tiempo de revelado cada 30 minutos, hasta el punto en el que los tejidos adquieran un ligero color rosa-violeta, aproximadamente 3 horas. Al mismo tiempo se realizó la hibridación con un control negativo para hacer una comparación con la intensidad del revelado de la hibridación. Al finalizar el revelado se lavó 3 veces con solución de PBT durante 5 minutos a TA y se

montaron los portaobjetos en glicerol al 90 % para su posterior análisis en microscopio óptico.

VI. RESULTADOS.

La presencia de genes activos que codifican para el receptor a 5HT-7 en la corteza frontal cerebral (Fr), se expresan fuertemente en E18 y disminuye gradualmente hasta la edad P11 donde se observa una débil expresión en esta zona.

Como se puede observar en la Figura 9, la corteza frontal presenta una fuerte expresión en las zonas de la corteza agranular insular (AI), corteza cingulete (Cg), corteza frontal (Fr); en las tres primeras edades correspondientes a E18, P0 y P5 mientras que para la última edad, P11, estas tres regiones disminuyen su expresión.

Desde la edad E18 hasta P0 la corteza orbital (Orb) presenta una expresión intensa sin embargo, disminuye su expresión considerablemente en P5 y manteniéndose así hasta P11. La corteza piriforme (Pir) expresa un alto nivel de transcrito para la edad E18 y P0, disminuyendo levemente en P5 y P11. El núcleo olfatorio anterior (AO), se hace presente en P5 con una moderada cantidad en la expresión del transcrito y se expresa levemente en la edad P11. Niveles bajos del transcrito se observaron en las zonas de la corteza motora secundaria (M2), corteza orbital dorsolateral (DLO) y la corteza orbital ventral (VO) para la edad P11.

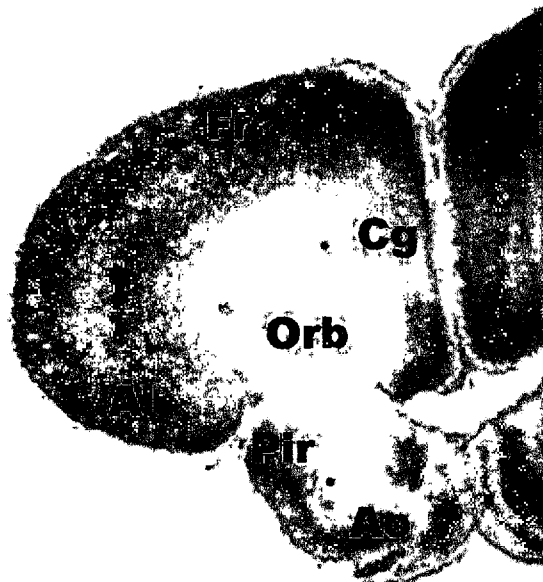
Los resultados indican que la distribución del transcrito en el área del hipocampo, presenta una fuerte señal en E18 que disminuye en P0 y aún más en P5. En las ratas de 11 días de nacidas la señal se mantiene en los mismos niveles que en P5 para la región del hipocampo. (Figura 10). En la corteza granular retrosplenial (RSG) del hipocampo el transcrito para 5-HT₇ se expresa fuertemente en E18 disminuyendo hacia P0, aumentando en P5 y nuevamente disminuyendo hacia P11. Subiculum (S) se expresa fuertemente en E18 y disminuye hacia P0 no observándose ni en P5 o P11. Alveus (alv) se expresa fuertemente en E18 y



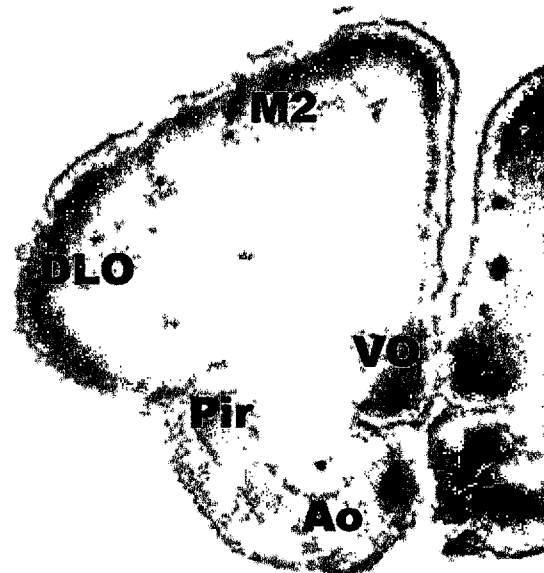
E18



P0



P5



P11

Figura 9. Cortes coronales de corteza frontal. Se observa la expresión del transcrito a receptor 5-HT7 con hibridación *in situ*, durante la ontogenia, E18, P0, P5 y P11. Existe una fuerte expresión del transcrito para edades tempranas como E18 y P0, disminuyendo hacia P11.

disminuye hacia P0 manteniéndose así hasta P11. La zona CA1 del hipocampo presenta una gradual disminución en la expresión del transcrito desde E18 hasta P11. De manera similar, CA3 se encuentra fuertemente expresado en E18 y esta expresión se ve disminuida hasta P5 donde se mantiene así hasta P11. Por otro lado, CA2 solo se expresa levemente en P11. La capa polimórfica del giro dentado (PoDG) exhibe una expresión alta para E18 y una disminución para P0 que se conserva en P5 y una leve disminución para P11. La habénula lateral (LHb) presenta una expresión moderada y constante del transcrito a través de las 4 edades. Los núcleos talámicos presentan una expresión moderada del transcrito, podemos observar que el núcleo lateral dorsal (LD) se expresa en E18 con una gradual disminución hacia P5 no encontrándose así en P11; el núcleo lateral posterior (LP) no presenta cambios de E18 a P0 no encontrándose ni en P5 o P11. En el intergeniculate leaf (IGL), el núcleo talámico centrolateral (LC) y el núcleo talámico medio dorsal central (MDC), se presentan aisladamente en las edades P0, P5 y P11 respectivamente, presentando una leve expresión del transcrito. El núcleo dorsolateral genicualdo (DLG) presenta una moderada expresión en la edad temprana de E18 y se mantiene constante hasta P11. En general, los núcleos talámicos presentan una moderada expresión del transcrito a través de las diferentes edades.

Es interesante resaltar, el aumento en la expresión del transcrito en el área 1 de la corteza parietal (Par1) en el cambio de P0 a P5. La comparación directa a través de la ontogenia se puede observar en el Cuadro 3 presentado a continuación.

Cuadro 3. Comparación de las zonas hibridadas en el hipocampo. Análisis de las distintas zonas del hipocampo en el encéfalo de rata a través de sus diferentes edades, mostrando en cada una de ellas la expresión del transcrito.

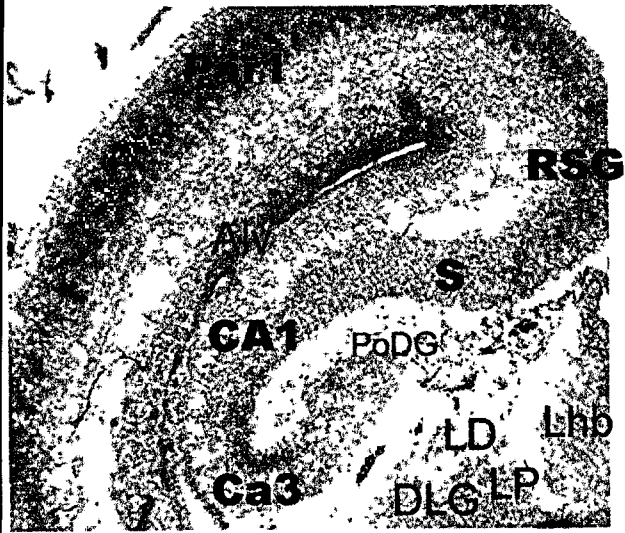
Zona	E18	P0	P5	P11
RSG	++++	++	+++	+
CA1	++++	+++	++	+
CA3	++++	+++	++	++
CA2	-	-	-	+
PoDG	+++	++	++	+
Par1	+++	++	+++	++
LHb	++	++	++	++
LP	++	++	----	----
LD	++	++	++	----
S	++++	++	----	----
Alv	+++	++	++	++
DLG	++	++	++	++
LC	----	----	++	----
MDC	----	----	----	++
IGL	----	++	----	----

En el cerebelo se presenta una fuerte expresión del transcrito en las edades E18, P0 y P5, y en el cambio de P5 a P11 se presenta una disminución de la señal.

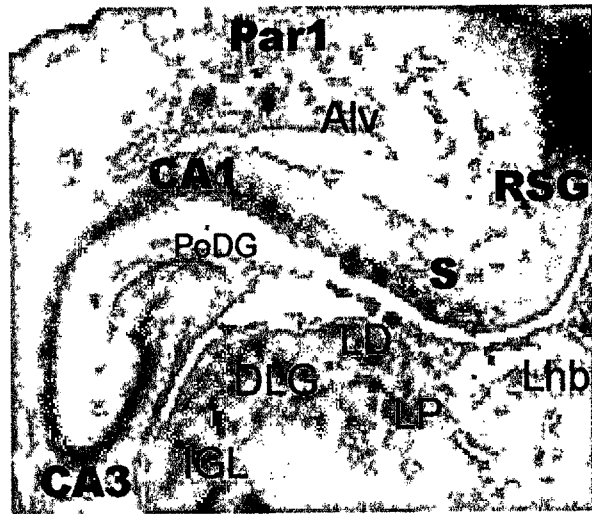
En la región del cerebelo, como podemos observar en la Figura 11, una expresión moderada en el núcleo parabraquial (X35) es observada, así como en el núcleo trigeminal principal (X_{5p}), niveles menores de expresión en el transcrito fueron observados en zonas como el núcleo central superior de raphe (X8), pons anterior (X_{3a}), núcleo coclear (X23), núcleo superior vestibular (X16) y el núcleo trigeminal motor (X_{5n}), para la edad E18. La capa germinal de células externa (EGL) que en

cantidad es muy prominente en P0 presenta una intensa expresión del transcrito que disminuye para P5, en el cambio de P5 a P11 disminuye un poco mas la intensidad del transcrito aunque el patrón de expresión es similar que para P5. Por otro lado, la capa de células de Purkinje (Pk) presenta una intensa expresión a través de todo el tejido para P0, disminuyendo la intensidad en P5 y en P11 baja aún más la expresión. Para P0 se observa una intensa expresión en la zona de L3v o vermis cerebelar. En P5 y P11 se observa una zona llamada capa molecular de células (Mocb) que al igual que EGL y Pk exhibe una fuerte expresión en P5 bajando considerablemente hacia P11. Una expresión leve del transcrito se observó en el pedúnculo cerebelar superior (scp) e inferior (icp) para P5 siendo casi nula la expresión para estas zonas en P11.

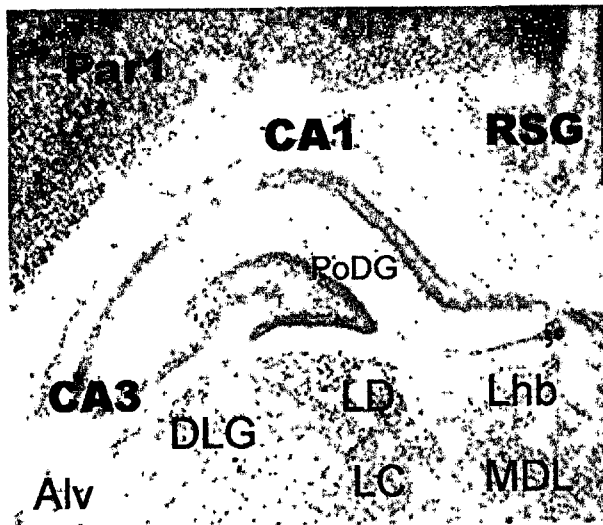
En la Figura 12 se observa un cuadro comparativo en el que se encuentran las 3 regiones estudiadas, corteza frontal, hipocampo y cerebelo, en sus diferentes edades estudiadas que son E18, P0, P5 y P11. Se reporta una disminución notable a través del tiempo, principalmente para la región de la corteza frontal. Para el hipocampo como ya se describió, también presenta una disminución gradual para algunas zonas y para otras como RSG y Par1, se observa una disminución en el cambio de E18 a P0, un aumento de P0 a P5 y nuevamente una disminución de P5 a P11. Finalmente en la región cerebelar los resultados indican que las edades con mayor expresión en la cantidad del transcrito son P0 y P5 disminuyendo hacia P11.



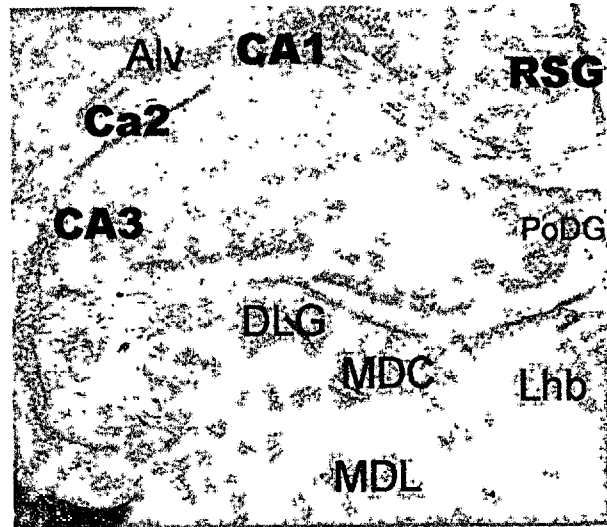
E18



P0

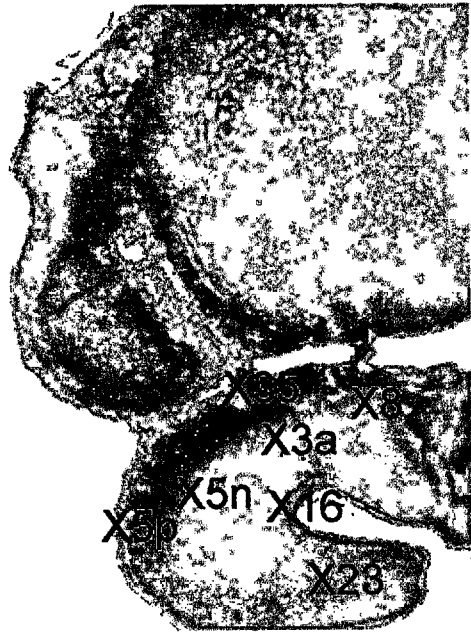


P5



P11

Figura 10. Cortes coronales de hipocampo. En esta zona del hipocampo durante las distintas edades del desarrollo como lo es E18, P0, P5 y P11, se puede observar una intensa expresión del transcrito para zonas como PoDG y una constante expresión en los núcleos talámicos, mientras que en el cambio de P0 a P5 se presenta una aumento en la expresión del transcrito en RSG, Par1 y S.



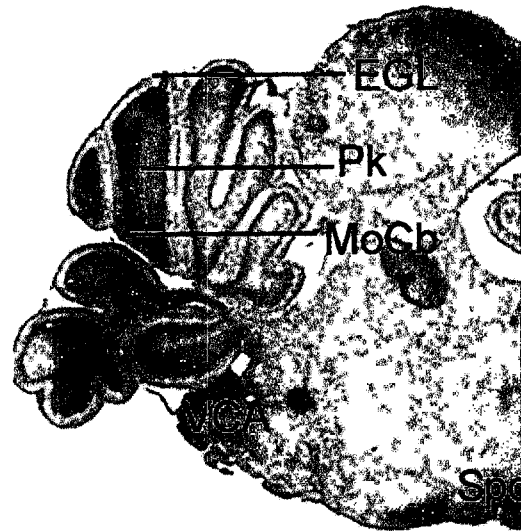
E18



P0



P5



P11

Figura 11. Cortes coronales de cerebelo. Se presenta la distribución para el transcrito 5-HT₇ en cortes coronales de cerebelo de rata donde se puede observar una gradual disminución en la expresión del transcrito desde P0 hasta P11; principalmente en EGL y Pk.

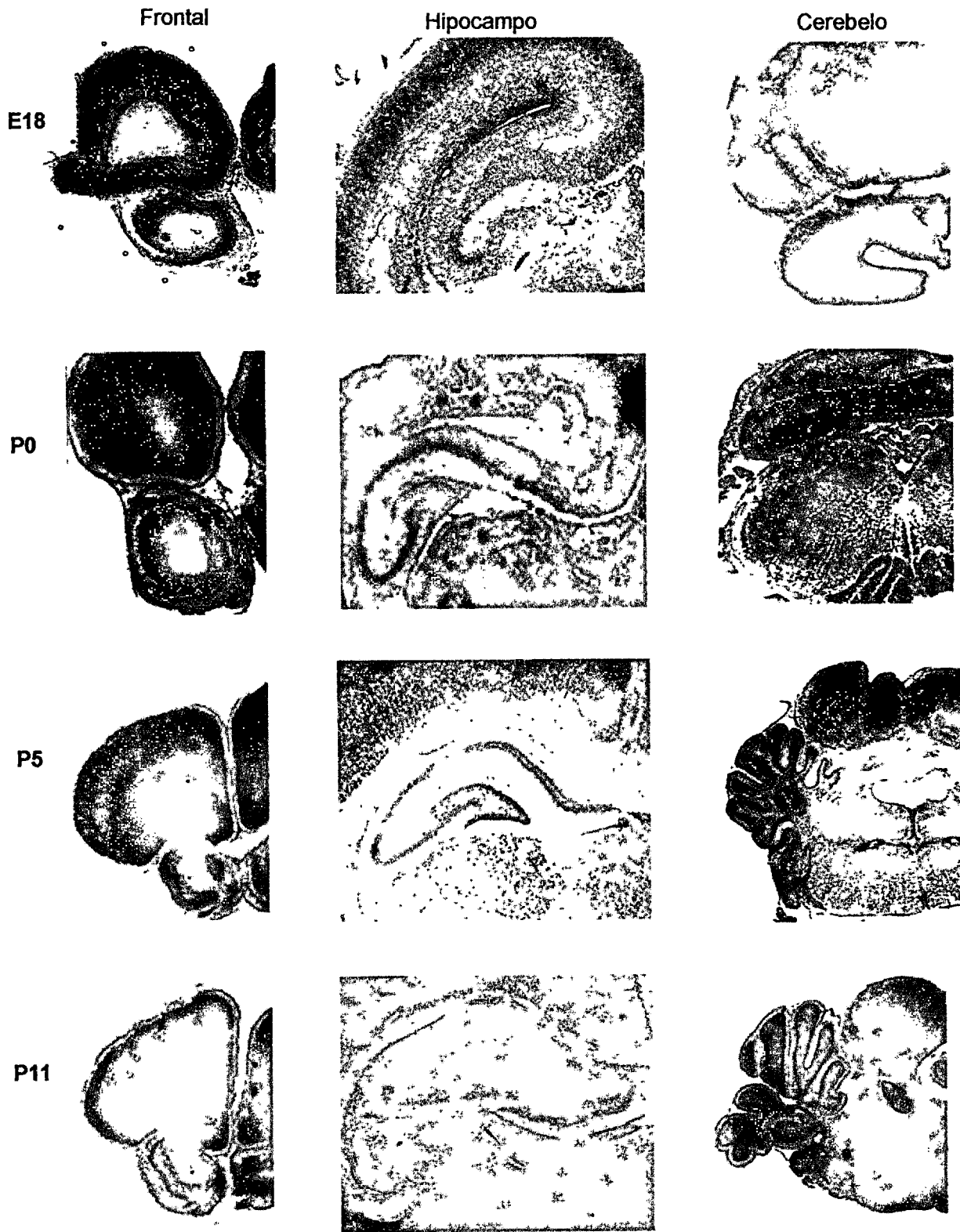


Figura 12. Cuadro comparativo de de las distintas zonas del encéfalo de rata; corteza frontal, hipocampo y cerebelo, durante las distintas etapas de la ontogenia. Nótese la intensa señal de hibridación que existe en las tres zonas del cerebro en la edad E18 y la disminución de la presencia del transcrito durante la ontogenia estudiada.

VII. DISCUSIÓN.

El control en la transcripción es probablemente el factor más importante que determina la expresión de un gen. En este trabajo se estudió el gen que codifica para receptor a serotonina del tipo 7 mediante el RNA mensajero o transcrito. La importancia de este trabajo está en función de la presencia de este transcrito determinado mediante la técnica de hibridación *in situ*, a lo largo de la ontogenia. La expresión de un transcrito, en la mayoría de las células especializadas de un organismo pluricelular, es regulada por distintos factores (Alberts y col., 1996) como polimerasas, factores generales de transcripción secuencias reguladoras, activadores, represores, etc, (Griffiths y col., 1999) como ya se ha mencionado, en este caso el factor estudiado que determina en general la expresión del transcrito fue la edad. A través del desarrollo se observó la intensidad con la que se expresa este transcrito utilizando el modelo de rata. En edades tempranas se presenta una alta expresión del mRNA, disminuyendo hacia las edades mas adultas de su desarrollo, comprobando así que es un intermediario en un proceso el cual se conoce como traducción (Mathews y Van Holde, 1998) o cambio de RNA a proteína; esto quiere decir que en edades tempranas del desarrollo el organismo necesita una mayor cantidad de transcrito para poder satisfacer sus necesidades de proteína puesto que mucho de ese RNA será degradado por los múltiples procesos de control post-transcripcional. Hacia las edades adultas, la cantidad de transcrito producido será menor que en las edades tempranas del organismo, esto se debe en gran medida a que una parte de ese transcrito ya fue traducido a proteínas. Pero existe además un proceso que rompe con el esquema mencionado anteriormente, en el que parte del transcrito aumenta a medida que crece el organismo. Se observaron zonas como Par1 en la que existe un aumento en la expresión de mRNA, esto puede deberse a una gran cantidad de factores; por ejemplo una propuesta es la hecha por Venero y col., 1997, en la que sugieren que un traumatismo puede influir en el aumento de la expresión de un gen, en este estudio sin haber recurrido a este tipo de técnica podemos decir que el encendido y apagado en la expresión del gen puede deberse a un proceso de retroalimentación,

esto quiere decir que la misma presencia y funcionalidad de la proteína determinará una próxima transcripción de un gen. Un error en la producción del transcrito, factores transcripcionales, factores post-transcripcionales, etc llevará hacia una falla en la producción de la proteína de cualquier tipo, esto quiere decir que se puede presentar una ausencia de la proteína o una existencia de la proteína pero con falta de funcionalidad, pudiendo desarrollar así una enfermedad como se propone sucede en el Alzheimer y trastornos en los procesos de memoria y aprendizaje, y dependiendo del origen de la falla será la dificultad con la que pueda tratarse esa enfermedad. La presencia de un mRNA se puede determinar mediante la técnica de hibridación *in situ* (Lovenberg y col., 1993, Molineaux y col., 1989, Vizuite y col., 1997, Venero y col., 1997, Kohen y col., 2000, Kinsey y col., 2001, Ruat y col., 1993, Mengod y col., 1990, To y col., 1995) como se hizo en este trabajo; el paso de mRNA a proteína supone que todo o un gran porcentaje del transcrito será traducido a proteína y tanto esta proteína como su localización puede ser determinada mediante técnicas inmunohistoquímicas y binding (To y col., 1995, Clemett col., 1998) mientras que su funcionalidad puede ser determinada mediante técnicas electrofisiológicas. Esto supone un proceso biológico continuo y funcional; por lo tanto estos tres elementos: localización y presencia de mRNA y funcionalidad de la proteína, pueden ser elementos de estudio comparables.

Los resultados de este trabajo son consistentes con los reportados por Lovenberg y col., 1993, que sugieren de manera general una fuerte expresión del transcrito para 5-HT₇ principalmente en regiones como el tálamo e hipotálamo de encéfalos de rata adultas. Para el área del hipocampo los resultados presentan una fuerte expresión de CA1 para E18, y una permanente expresión para la capa polimórfica del giro dentado desde E18 hasta P11 mientras que en estudios realizados en cobayos de edad adulta por To y col., 1995 reportan su mayor cantidad de expresión en zonas como CA1, CA2 y giro dentado del hipocampo, así como en zonas del tálamo y el hipotálamo. En encéfalos de ratas de entre 200 y 225 gr, una fuerte expresión del transcrito fue reportada por Gustafson y col., 1996, para la zona CA3 del hipocampo, esto correlaciona con los resultados encontrados

en nuestro trabajo en donde existe una fuerte expresión en esa zona en la edad embrionaria 18. Una moderada expresión del transcrito es reportada en corteza retrosplenial, que en este estudio, tanto la corteza retrosplenial granular como la corteza retrosplenial agranular muestran una fuerte marca de hibridación desde E18 hasta P5, mientras que para P11 la corteza retrosplenial granular muestra una considerable disminución con respecto a P5. CA1 presenta una constante expresión a través del crecimiento disminuyendo considerablemente de P5 a P11 concordando únicamente en estas edades con los hallazgos de Gustafson y col., 1996, ya que reportan además una pobre expresión en CA2, y en este trabajo se encontró hasta P11 y no así en las demás edades. Al igual que Kinsey y col., 2001, quien reporta sus resultados en encéfalos de rata adulta, CA3 muestra ser una zona del hipocampo con una fuerte expresión del transcrito, al igual que la corteza piriforme. En el estudio realizado por Vizúete y col., 1997, donde utilizan ratas a diferentes edades: P5, P8, P15, P21 y P90, reportan una fuerte señal de hibridación, sin cambio a través del crecimiento, en los núcleos talámicos centrolateral, central posterior y medio dorsal central, así como giro dentado y colículo superior. Sin embargo reportan un aumento en la expresión del transcrito en la zona de la corteza retrosplenial en el cambio de P8 a P15 y manteniéndose así hasta la edad adulta, mientras que nosotros observamos una leve disminución en el cambio de E18 a P0, un aumento en el cambio a P5 y nuevamente una disminución hacia la edad P11, esto se debe probablemente al hecho de que la regulación en la expresión genética es dependiente de la funcionalidad de la proteína que se está traduciendo, esto quiere decir, que el encendido y apagado en la expresión del gen se debe en gran medida a que probablemente la proteína no está funcionando correctamente o a la necesidad del propio organismo. Vizúete y col., 1997, reportan además una disminución de la mitad aproximadamente en la expresión del transcrito en la zona de habénula lateral de P5 a P15, mientras que en este trabajo se reporta una constante expresión del transcrito en E18, P0, P5 y P11 para esta zona. Aunque la única edad que coincide es P5, nuestro estudio no considera al igual que Vizúete y col., 1997, que la expresión en la habénula lateral sea dos veces mayor que la de la corteza retrosplenial, sino que por el contrario, la

expresión en la corteza retrosplenial es ligeramente mayor que la observada en la habénula lateral para esta edad, y en E18 la corteza retrosplenial muestra una expresión mucho mayor que la habénula lateral. En nuestro estudio notamos una disminución gradual en CA3 del hipocampo a partir de E18 hasta llegar a P11, mientras que Kohen y col., 2001, reportan solamente una disminución considerable en el cambio de las ratas de 3 meses a las ratas de 12 meses.

Los resultados de este trabajo en el área del cerebelo presentan concordancia con el trabajo realizado por Kinsey y col., 2001, que de la misma manera, reportan una significativa expresión de este nuevo receptor a serotonina en las fibras del olivo inferior así como en las células de Purkinje del cerebelo, apoyando así la teoría de que este receptor juega un papel en la coordinación motriz; mientras que en el trabajo descrito por Lovenberg y col., 1993 reportan una completa ausencia de la expresión de este transcrito en tejido cerebelar.

El trabajo presentado ha definido la expresión del transcrito para receptor a serotonina del tipo 7 durante la ontogenia del encéfalo de rata. Una aportación importante de este trabajo es la presencia de la edad embrionaria 18 (E18) y la presencia de una fuerte expresión en esta edad, con la cual se propone la investigación de la expresión del transcrito desde las etapas embrionarias, aunque algunos investigadores como Vizuite y col. 1997, proponen que las vías del desarrollo serotoninérgico ocurren en mayor parte postnatalmente. Las observaciones hechas indican una considerable disminución en la expresión del transcrito conforme avanza la edad, claramente observado en zonas de la corteza frontal y principalmente en el cambio de p5 a p11, resultados que confirman los de Kohen y col., 2000, y no hace necesaria la espera del crecimiento del encéfalo hasta la edad adulta para poder observar dicha disminución.

Como perspectivas para este estudio, se propone la realización de un nuevo trabajo en el que se incorpore el estudio de zonas como el núcleo supraquiasmático para poder hacer una comparación con estudios realizados por Lovenberg y col.,

1993 y Kohen y col., 2000, que proponen que los receptores a 5-HT₇ juegan un papel importante en el cambio de fase en los ritmos circadianos por encontrar la presencia del transcrito en este núcleo, propuesta que a su vez no es apoyada por Gustafson y col., 1996 y Kinsey y col., 2001, al no encontrar expresión de transcrito en esta zona; además es posible proponer que estudios de este tipo se continúen no solo en las zonas ya analizadas sino en diferentes edades embrionarias y en todas aquellas estructuras que jueguen algún papel importante en los que se involucre a los ritmos circadianos y los procesos cognoscitivos.

Por otro lado no se realizaron experimentos que apoyen las propuestas hechas por Venero y col., 1997, que indican que un aumento en la expresión del mRNA en la corteza visual primaria, así como en el colículo superior, es dependiente de la extirpación de ambos ojos en el día del nacimiento de igual manera un nuevo proyecto puede ser propuesto para encontrar una nueva razón por la cual exista un encendido y apagado en la expresión de los genes, que no dependa solamente del desarrollo del individuo.

VIII. CONCLUSIONES.

La técnica de hibridación *in situ* con sonda marcada con digoxigenina es altamente confiable para la detección inmunoquímica de este transcrito.

Los tiempos en los lavados de preparación de los tejidos para la hibridación, la hibridación y los tiempos de revelado de las muestra fueron desarrollados y estandarizados en la metodología ya mencionada, encontrándose así, tiempos ideales que aumenten la facilidad de detección de las hibridaciones y disminuya la cantidad de fondo o ruido inherente presente a causa del revelador.

La distribución del mRNA para receptor a 5-HT₇ se da principalmente en la corteza frontal, el hipocampo y el cerebelo, expresándose con mayor intensidad en edades tempranas tales como embrionaria 18 y la post-natal 0.

Al comparar la distribución del transcrito a través de las diferentes etapas del desarrollo del encéfalo de rata se observa que la expresión del mismo es dependiente del crecimiento del organismo, siendo así una expresión mas intensa en edades tempranas y una expresión moderada o leve en edades maduras.

Un efecto de "switch" o "apagador" está presente en la expresión de este transcrito, esto es, la expresión del mRNA puede aumentar en el cambio de una edad a otra, siendo que lo esperado sería una disminución.

IX. BIBLIOGRAFÍA.

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. 1996.** *Biología Molecular de la célula.* Garland Publishing Inc., U.S.A.: 451-472.
- Barnes, N.M., Sharp, T. 1999.** A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacol*: 38: 1083-1152.
- Clemett, D.A., Cockett, M.I., Marsden, C.A., Fone, K.C.F. 1998.** Antisense oligonucleotide-induced reduction in 5-hydroxytryptamine (7) receptors in the rat hypothalamus without alterations in exploratory behavior or neuroendocrine function. *J Neurochem*: 71: 1271-1279
- Florez, J., Armijo, J., Mediavilla, A. 2000.** *Farmacología humana.* Ed. Masson, 3ª edición. Barcelona: 17-45, 315-325.
- Gilbert, S. 2001.**
http://students.biology.lsa.umich.edu/bio208_17/Common%20Development%20Stages.htm
- Goodman, A., Ruddon, R., Molinoff, P., Limbird, L., Hardman, J. y col., 1996.** *Las bases farmacológicas de la terapéutica.* 9ª edición. Ed. Mc Graw Hill – Interamericana. México: 32-41, 265-280.
- Griffiths, A., Gelbart, W., Miller, J., Lewontin, R. 2000.** *Genética moderna.* Ed. McGraw Hill – Interamericana, Madrid: 448-460.
- Gustafson, E., Durkin, M.M., Bard, J.A., Zgombick, J., Brancheck, T.A. 1996.** A receptor autoradiographic and *in situ* hybridization analysis of the distribution of the 5-HT₇ receptor in rat brain. *British Journal of Pharmacology*: 117: 657-666.
- Heidmann, D.E.A., Metcalf, M.A., Kohen, R., Szot, P. 1997.** Four 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: species differences due to altered intron-exon organization. *J. Neurochem*: 68: 1372-1381
- Kinsey, A., Wainwright, A., Heavens, R., Sirinathsinghji, D., Oliver, K. 2001.** Distribution of 5-HT₇, 5-HT_{5b}, 5-HT₆ and 5-HT₇ receptor mRNAs in the rat brain. *Molecular Brain Research*: 88:194-198.

Kohen, R., Heidmann, D.E.A., Anthony, J., White, S.S., Hamblin, M.W., Szot, P. 2000. Changes in 5-HT₇ serotonin receptor mRNA expression with aging in rat brain. *Molecular Brain Res*: 79:163-168.

Landwehr, V. 2001. <http://www.mirror.ac.cn/biosoft/photo/html/chapter15.htm>

Lovenberg, T., Baron, B.M., Lecea, L., Miller, J. D., Prosser, R.A., Rea, M.A., Foye, P.E., Racke, M., Slone, A.L., Siegel, B.W., Danielson, P.E., Sutcliffe, J.G., Earlander, M.G. 1993. A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT₇) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron*: 11:449-458.

Mathews, C., Van Holde, K. 2001. Bioquímica. 2da. ed., Mc Graw Hill Interamericana, Madrid: 1159-1202.

Meneses, A. 1999. 5-HT system and cognition. *Neurosc and biobehavioral reviews*: 23:1111-1125.

Mengod, G., Nguyen, H., Le, H., Waeber, C., Lübbert, H., Palacios, J.M. 1990. The distribution and cellular localization of the serotonin 1C receptor mRNA in the rodent brain examined by *in situ* hybridization histochemistry. Comparison with receptor binding distribution. *Neurosc*: 35:577-591.

Molineaux, S., Jessell, T.M., Axel, R., Julius, D. 1989. 5-HT_{1c} receptor is a prominent serotonin receptor subtype in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*: 86:6793-6797.

Moore K.L. 1995. Embriología básica. Ed. Interamericana – Mc Graw Hill. 3^a edición. México D.F.: 27-80.

Obosi, L.A., Hen, R., Beadle, D.J., Bermúdez, I., King, L.A. 1997. Mutational analysis of the mouse 5-HT₇ receptor: importance of the third intracellular loop for receptor-G-protein interaction. *FEBS Lett*: 412:321-324.

Paxinos, G., Watson, C. 1986. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. Orlando.

Ruat, M., Traiffort, E., Leurs, R., Tardivel-Lacombe, J., Díaz, J., Arrang, J., Schwartz, J. 1993. Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activation camp formation. *Proc Natl Acad Sci USA*: 90:8547-8551.

- Sadler, T.W. 2001.** Embriología médica de Langman con orientación clínica. Ed. Médica Panamericana. 8ª edición. Madrid: 48-108, 398-447.
- Shimizu, M., Nishida, A., Zensho, H. 1998.** Agonist-induced desensitization of adenylyl cyclase activity mediated by 5-hydroxytryptamine₇ receptors in rat frontocortical astrocytes. *Brain Res*: 784:57-62.
- Thomas, D.R., Atkinson, P.J., Hastie, P.G., Roberts, J.C., Middlemiss, D.N., Price, G.W. 2002.** [³H]-SB-269970 radiolabels 5-HT₇ receptors in rodent, pig and primate brain tissues. *Neuropharmacol*: 42:74-81.
- To, Z.P., Bonhaus, D.W., Eglen, R.M., Jakeman, L.B. 1995.** Characterization and distribution of putative 5-HT₇ receptors in guinea-pig. *British Journal of Pharmacology*: 115:107-116.
- Venero, J.L., Vizuite, M.L., Machado, A., Cano, J. 1997.** Developmental expression of 5-HT₇ receptor mRNA in rat brain visual structures after neonatal enucleation. *Neuroreport*: 8:1531-1535.
- Vizuite, M.L., Venero, J.L., Traiffort, E., Vargas, C., Machado, A., Cano, J. 1997.** Expression of 5-HT₇ receptor mRNA in rat brain during postnatal development. *Neurosc Letters*: 227:53-56.