

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CAMBIOS ONTOGENÉTICOS DE LOS RECEPTORES A
SEROTONINA 5-HT_{5A} EN EL INTESTINO DE RATA POR
INMUNOFLUORESCENCIA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ELIZABETH MARTÍNEZ ROJO

DIRIGIDO POR

DRA. MA. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CAMBIOS ONTOGÉNICOS DE LOS RECEPTORES A
SEROTONINA 5-HT_{5A} EN EL INTESTINO DE RATA POR
INMUNOFUORESCENCIA”**

TESIS

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

PRESENTA

ELIZABETH MARTÍNEZ ROJO

DIRIGIDA POR

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SINODALES

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER
DIRECTOR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA
SINODAL

M. en C. DAVID GUSTAVO GARCÍA GUTIERREZ
SINODAL

I. Q. AI. KARLA MARGARITA PADILLA OLVERA
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. Antecedentes	1
1.1 Serotonina	1
1.2 Serotonina en el intestino	3
1.3 Receptores de serotonina	4
1.3.1 Receptor a serotonina 5-HT ₅	5
1.3.2 Receptor a serotonina 5-HT _{5A}	7
1.4 Sistema Nervioso Entérico	7
1.5 Anatomía del Intestino Delgado	10
1.5.1 Ontogenia del Intestino Delgado	13
1.6 Contracción y excitación del músculo liso	18
2. Hipótesis	20
3. Objetivos	21
3.1 Generales	21
3.2 Específicos	21
4. Metodología	22
4.1 Reactivos	22
4.2 Materiales	22
4.3 Equipos	22
4.4 Animales	23
4.5 Preparación de reactivos y equipo	23
4.6 Métodos	24
4.6.1 Métodos biológicos	24

4.6.2 Inmunofluorescencia	25
4.6.3 Toma de fotografías	26
5. Resultados	27
6. Discusiones	33
7. Conclusiones	37
8. Referencias	38

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Distribución y función para los subtipos de receptores a serotonina	6
2	Principales neurotransmisores del SNE	10
3	Etapas del desarrollo del intestino	15

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura molecular de la serotonina	1
2	Síntesis de serotonina	2
3	Corte transversal del intestino	8
4	Esquema que muestra los plexos mientérico y submucoso	11
5	Anatomía del intestino delgado	11
6	Esquema del intestino delgado	13
7	Etapas de herniación del intestino	14
8	Diferenciación celular en el intestino	17
9	Criostato LEICA, CM 1850	25
10	Control negativo de la técnica	27
11	Blanco de la técnica	28
12	Distribución del receptor 5-HT _{5A} en intestino proximal de rata neonatal	29
13	Distribución del receptor 5-HT _{5A} en intestino proximal de rata adulta	30

14	Distribución del receptor 5-HT _{5A} en intestino distal de rata adulta	31
15	Comparación de la distribución del receptor 5-HT _{5A} en el intestino proximal y distal de rata adulta.	32

RESUMEN

La serotonina es un neurotransmisor sintetizado a partir de L-triptofano proveniente de la dieta, modula una variedad de procesos fisiológicos y de comportamiento; en el intestino se libera desde las neuronas del plexo mientérico y se secreta como hormona local por parte de las células enterocromafines del epitelio intestinal. 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 expresión del receptor 5-HT_{5A} 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. La técnica utilizada fue la inmunofluorescencia. Los resultados indicaron que la expresión del receptor serotoninérgico 5-HT_{5A} se encuentra diferencialmente distribuida en la lámina propia de las vellosidades en las porciones distal y proximal de rata adulta y únicamente en intestino proximal de rata neonatal.

1. ANTECEDENTES

1.1 Serotonina

La serotonina (5-hidroxitriptamina), figura 1, es uno de los neurotransmisores/neuromoduladores menos abundantes en el Sistema Nervioso Central (SNC); sólo el 1 - 2% de la serotonina del organismo se encuentra en el cerebro; aproximadamente el 90% se localiza en las células enterocromafines del aparato gastrointestinal y existe también una pequeña porción en las plaquetas. Únicamente las neuronas y las células cromafines de la pared intestinal sintetizan 5-HT; las plaquetas almacenan 5-HT procedente del plasma por un mecanismo de transporte activo (Lorenzo, 2008; Fidalgo, 2012).

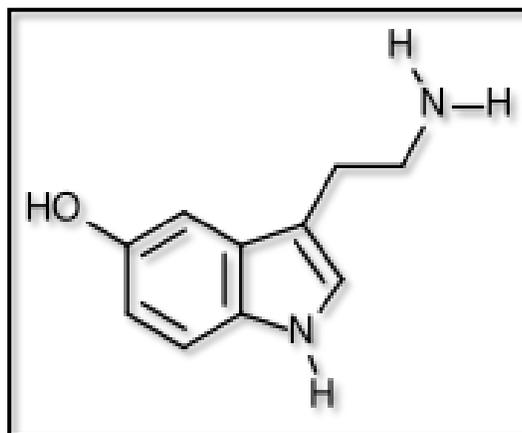


Figura 1. Estructura molecular de la serotonina

La síntesis se produce a partir del aminoácido L-triptófano que viene de la dieta y es captado por la célula; sufre su primer proceso de oxidación en el C5 del anillo indólico mediante la *triptófano hidroxilasa* (TpH), que la convierte en 5-hidroxitriptófano (5-HTP). TpH1 es principalmente encontrada y expresada en las células enterocromafines en el epitelio de las criptas del intestino delgado, mientras que la TpH2 se encuentra únicamente en los tejidos nerviosos (Hasler, 2009). Posteriormente, el 5-HTP es descarboxilado en la cadena lateral mediante la L-aminoácido descarboxilasa y convertido en 5-hidroxitriptamina, ver figura 2. La

serotonina es almacenada en estructuras vesiculares que la protegen de enzimas intracelulares, como la monoaminoxidasa (MAO).

De las células enterocromafines, la serotonina puede ser liberada por diversos estímulos: nerviosos, químicos y mecánicos. La 5-HT pasa así a la sangre, donde es captada por el hígado en el endotelio vascular, en especial el pulmonar; allí es transformada por la MAO y la aldehído-deshidrogenasa en ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). La fracción que escapa de esta captación es incorporada activamente en las plaquetas, de las que es liberada cuando éstas sufren el proceso de agregación, que puede ser provocado por muy diversos agentes (Flórez, 2000).

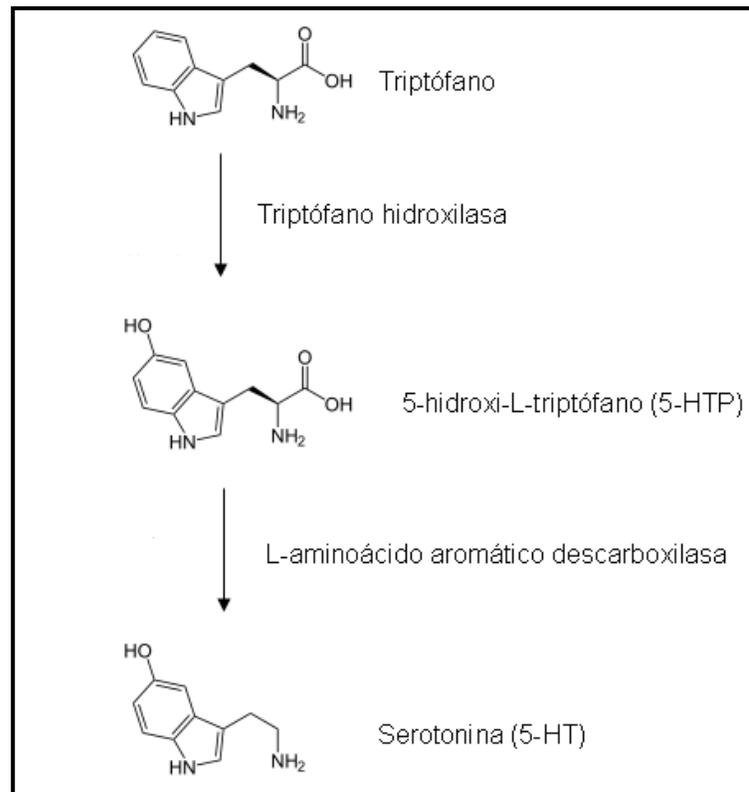


Figura 2. Síntesis de serotonina

La serotonina modula una variedad de procesos fisiológicos y de comportamiento, incluyendo la función cardiovascular, el peso corporal, el comportamiento de la

alimentación, la termorregulación, la agresividad, los ciclos de sueño-vigilia, el comportamiento reproductivo, y los ritmos circadianos. También se le relaciona en los trastornos psiquiátricos, como ansiedad y depresión, lo que sugiere que la serotonina es un importante regulador del estado de ánimo (Duncan, 2000).

Además de estar asociada con funciones nerviosas centrales, funciona como mediador en la periferia. En el intestino, se libera como neurotransmisor desde las neuronas del plexo mientérico y se secreta como hormona local por parte de las células enterocromafines (células EC) del epitelio intestinal. La serotonina aumenta la motilidad intestinal. Las células EC también pueden afectar de manera indirecta las funciones nerviosas centrales y circulatorias. Cuando son excitadas por sustancias tóxicas presentes en el contenido intestinal después de la administración oral pueden inducir el vómito por estimulación de terminaciones de las fibras aferentes del nervio vago mediada por la liberación de serotonina (Lüllmann, 2008).

La serotonina es liberada por las células enterocromafines del aparato digestivo, pasando a la luz del intestino, cuando se eleva la presión intraluminal dentro del órgano por la presencia de los alimentos, sus acciones fisiológicas son:

1. Estómago

- Aumenta la secreción de moco por las glándulas gástrica.
- Antagonista de la acción de la histamina sobre la secreción de ácido clorhídrico.

2. Intestino delgado

- Aumenta el tono y la motilidad de la mayor parte del tubo digestivo.
- Facilita el reflejo peristáltico.

3. Sistema nervioso entérico

- Estimula la contracción del músculo liso tanto por efectos directos sobre el músculo como por medio indirecto al estimular las neuronas excitadoras del sistema nervioso entérico (Piñol, 2013).

1.2 Serotonina en el intestino

La serotonina participa en funciones normales y patológicas del intestino delgado, incluyendo la motilidad, la secreción, crecimiento celular e ingesta de alimentos (Cuadro 1).

5-HT participa en el control fisiológico de la función motora intestinal; en un modelo de ratones *Knockout* de receptores a serotonina se observó un incremento en la motilidad del colon y la expulsión de agua fecal, resultando en diarrea. La destrucción de células serotoninérgicas por 5,7-dihidroxitriptamina interrumpe las contracciones en el intestino. Además la acción de la serotonina aumenta el peristaltismo al unirse a los receptores 5-HT₄.

En cuanto a la secreción intestinal logra que el Cl⁻ sea secretado en mayor cantidad y disminuye la absorción de Na⁺; de igual manera la serotonina liberada por exposición al exceso de ácido duodenal estimula la secreción de bicarbonato.

La serotonina regula el crecimiento de varios tejidos incluyendo el músculo liso y los fibroblastos pulmonares, tejidos mamarios, los nervios, y las células epiteliales de las criptas intestinales. 5-HTP induce el desarrollo de las microvellosidades epiteliales.

También juega un papel importante en la ingesta de comida y el control de peso corporal, la destrucción de neuronas serotoninérgicas con 5,7-dihidroxitriptamina o la síntesis incompleta de serotonina incrementan el consumo de comida (Hasler, 2009).

1.3 Receptores a serotonina

En los primeros ensayos farmacológicos realizados con órganos periféricos aislados, en especial intestino, se diferenciaron dos tipos de respuesta a la 5-HT: la bloqueada por morfina y la bloqueada por dibenamina (Flórez, 2000).

En las últimas dos décadas, la aplicación de las técnicas de fijación de radioligandos, el desarrollo de diversos estudios bioquímicos y funcionales, y los estudios de clonación molecular han permitido identificar hasta siete tipos de receptor 5-HT, los cuales se designan de 5-HT₁ a 5-HT₇. Los tipos 5-HT₁, 5-HT₂ y 5-HT₅ comprenden, a su vez, cinco (5-HT_{1A} a 5-HT_{1F}), tres (5-HT_{2A} a 5-HT_{2C}) y dos (5-HT_{5A} y 5-HT_{5B}) subtipos respectivamente, mientras que los tipos 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ constan, hasta el momento, de un subtipo cada una. Exceptuando el receptor 5-HT₃, todos los demás están relacionados estructuralmente como la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Lorenzo, 2008).

1.3.1 Receptor a serotonina 5-HT₅

Aunque hace más de una década que se conoce sobre estos receptores, se hace referencia a ellos como los receptores “huérfanos” de serotonina, porque se sabe muy poco de ellos.

Los receptores 5-HT₅ fueron identificados en ratón por primera vez en 1992; este tipo de receptores consta de dos subtipos, el 5-HT_{5A} y 5-HT_{5B}, que comparten 69% de identidad de aminoácidos y tienen 23-34% de homología con los otros receptores 5-HT.

El gen del receptor humano 5-HT_{5A} codifica una proteína con características farmacológicas similares a las del receptor de ratón 5-HT_{5A}. En contraste, el gen humano de 5-HT_{5B} no codifica una proteína funcional debido a que su secuencia de codificación es interrumpida por los codones de parada. Los resultados de Grailhe, sugieren que el receptor 5-HT_{5B} se ha perdido en la evolución en algún momento después de la divergencia entre roedores y humanos (Grailhe, 2001).

Debido a una falta de agonistas o antagonistas selectivos, la función de los receptores 5-HT₅ es desconocida; aunque farmacológicamente estos receptores se parecen a los receptores del subtipo 5-HT₁, mostrando alta afinidad para el agonista 5-carbamidotriptamina (5-CT), ácido lisérgico (LSD) y ergotamina. Sin

embargo, por varias razones los receptores 5-HT₅ pueden representar un subtipo diferente (Noda, 2003).

Cuadro 1. Distribución y función para los subtipos de receptores a serotonina

Subtipo	Distribución	Función
5-HT _{1A}	Neuronas motoras entéricas, enterocitos	Regula la secreción visceral, inhibe las contracciones gástricas e ileacas.
5-HT _{1B}	Neuronas entéricas, nervios extrínsecos, músculo liso	Disminuir la contractilidad antral, retrasar el vaciamiento gástrico.
5-HT _{1D}	Neuronas entéricas, nervios extrínsecos, músculo liso	Disminuir la contractilidad antral, retrasar el vaciamiento gástrico.
5-HT _{2A}	Neuronas entéricas, músculo liso, enterocitos.	Estimula la secreción, aumenta la contracción antral y del colon.
5-HT _{2B}	Neuronas entéricas, músculo liso, células intersticiales de Cajal.	Incrementa las contracciones del colon e íleon, regula la sensación visceral, regula el crecimiento nervioso entérico.
5-HT ₃	Neuronas entéricas, células intersticiales de Cajal, enterocitos, nervios extrínsecos, células enterocromafines.	Incrementa la frecuencia de complejos motores intestinales, regula la sensación visceral, estimula la secreción.
5-HT ₄	Neuronas entéricas, células intersticiales de Cajal, enterocitos, nervios extrínsecos, células enterocromafines, neuronas entéricas.	Aumenta el peristaltismo, relaja el músculo liso, estimula la secreción, mejora la supervivencia neuronal.
5-HT ₇	Neuronas entéricas, músculo liso.	Relaja el músculo liso, regula la sensación visceral

1.3.2 Receptor a serotonina 5-HT_{5A}

Este receptor fue identificado primero en ratón y después en rata. *Rees et al.* (1994) clonó el homólogo del receptor humano 5-HT_{5A}. La función fisiológica todavía no es clara, esto debido a la falta de ligandos específicos. Algunos resultados recientemente obtenidos con ratones que carecen del gen del receptor 5-HT_{5A} sugieren la implicación de este subtipo de receptor en la conducta exploratoria (Bart, 2000).

Los receptores 5-HT_{5A} pertenecen al grupo de la superfamilia de receptores metabotrópicos acoplados a proteína G. En ratas, ratones y humanos el receptor 5-HT_{5A} está formado por 357 aminoácidos, y el gen está localizado en el cromosoma 5B, para ratones y en el 7q36 en humanos (Barnes, 1999).

Estudios de mRNA e inmunolocalización han demostrado que el receptor 5-HT_{5A} preferentemente es expresado en el cerebro, incluyendo las áreas cortical y límbica, que sugieren que el receptor tiene un papel importante en las funciones cerebrales superiores (Corbett, 2005).

El mRNA para el receptor 5-HT_{5A}, se expresa en muchas regiones del cerebro, incluyendo el hipocampo, el tálamo, el hipotálamo, corteza cerebral, el cerebelo y protuberancia, pero no en los órganos periféricos, tales como corazón, riñón, pulmón, hígado e intestino. La localización de la proteína del receptor 5-HT_{5A} con técnicas de autorradiografía del receptor no ha sido factible en animales de tipo salvaje, debido a la falta de ligandos selectivos para este receptor (Duncan, 2000).

1.4 Sistema Nervioso Entérico

El tubo digestivo tiene un sistema nervioso propio, llamado *sistema nervioso entérico (SNE)*, el cual se extiende a todo lo largo del aparato digestivo, desde el esófago hasta el ano, y forma un anillo entrettejido de fibras nerviosas (Enriquez-Blanco, 2010).

Es la parte más compleja del sistema nervioso periférico, está constituido por una gran cantidad de células gliales y neuronas: 80 a 100 millones de neuronas. El SNE proviene de las células de la cresta neural y dan origen a dos plexo nerviosos: un plexo externo que descansa entre las capas longitudinales y circular que recibe el nombre de plexo mientérico o de Auerbach; y un plexo interno, llamado submucoso o de Meissner (Figura 3).

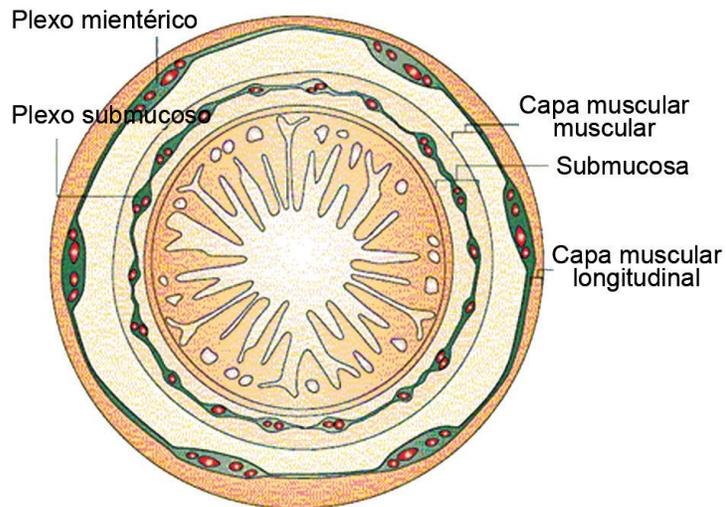


Figura 3. Corte transversal del intestino, el plexo mientérico se desarrolla primero y posteriormente se desarrolla el plexo submucoso.

La mayor parte del SNE deriva de células precursoras de la cresta neural vagal a nivel de las somitas 1-7, que migran a lo largo de todo el tubo digestivo, aproximadamente en la cuarta semana de gestación en humanos. Estas células migran de la región rostral a la caudal, para ir colonizando de manera secuencial, el intestino anterior, el intestino medio y el intestino posterior.

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 (ver cuadro 1).

Tipos de neuronas del SNE:

- 1) Neuronas aferentes intrínsecas primarias (NAIP): responden a estímulos mecánicos y regulan las funciones fisiológicas del tubo digestivo, transmitiendo la información a otras neuronas. Se encuentran en ambos plexos nerviosos y son neuronas colinérgicas.
- 2) Neuronas motoras: inervan las capas musculares del tubo digestivo, vasos sanguíneos y las glándulas, se encuentran en los ganglios mientéricos, aunque pueden encontrarse en los ganglios submucosos. Pueden dividirse en excitatorias o inhibitorias. Un subgrupo de estas neuronas se encarga de regular la secreción de agua y electrolitos.
- 3) Interneuronas: se encargan de integrar la información generada por las NAIP y de enviar la información a las neuronas motoras, se clasifican en ascendentes y descendentes.
- 4) Intestinofugas: se encuentran en el plexo mientérico, conducen señales eferentes y funcionan como mecanorreceptores que detectan cambios en el volumen intestinal (Romero-Trujillo y col., 2012).

El SNE puede actuar de 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 endocrinas, las células intersticiales de Cajal y las células del sistema inmune, como los mastocitos (Tresguerres, 2010).

Como ya se había hecho mención el SNE está compuesto por dos plexos nerviosos (figura 4):

- 1) Plexo mientérico o de Auerbach: está formado en su mayor parte por cadenas lineales de muchas neuronas interconectadas que se extienden a lo largo del tubo digestivo, controla los movimientos gastrointestinales.
Los efectos principales de su estimulación comprenden: aumento de la contracción tónica, aumento de la intensidad de las contracciones rítmicas, ligero aumento de la frecuencia de las contracciones y aumento de la velocidad

de conducción de las ondas de excitación a lo largo del intestino. No es enteramente excitador, pues algunas de sus neuronas son inhibitorias.

Cuadro 2. Principales neurotransmisores del SNE

Exitatorios:

ACh

5 – HT (Serotonina)

Taquicinas

SP (Sustancia P)

NKA (Neurocinina A)

NKB (Neurocinina B)

GRP (Péptido liberador de la gastrina)

Inhibitorios:

Noradrenalina

VIP (Polipéptido intestinal vasoactivo)

NO (Óxido nítrico)

GABA (Ácido γ aminobutírico)

ATP, adenosina

PACAP (Polipéptido activador de la adenilciclase hipofisiaria)

- 2) Plexo submucoso o de Meissner: situado entre la capa interna de la capa muscular circular y la submucosa, está más desarrollado en el intestino delgado y el colon; su función principal es la regulación de las funciones de digestión y absorción a nivel de la mucosa y de los vasos sanguíneos (Guyton, 2001).

1.5 Anatomía del Intestino Delgado

El intestino delgado se extiende desde el estómago hasta el colon; mide unos 5m en una persona vivía, pero es más largo en un cadáver porque se relaja y elonga después de la muerte. Consta de tres partes: duodeno, yeyuno e íleon, ver figura 5 (Segarra, 2006).

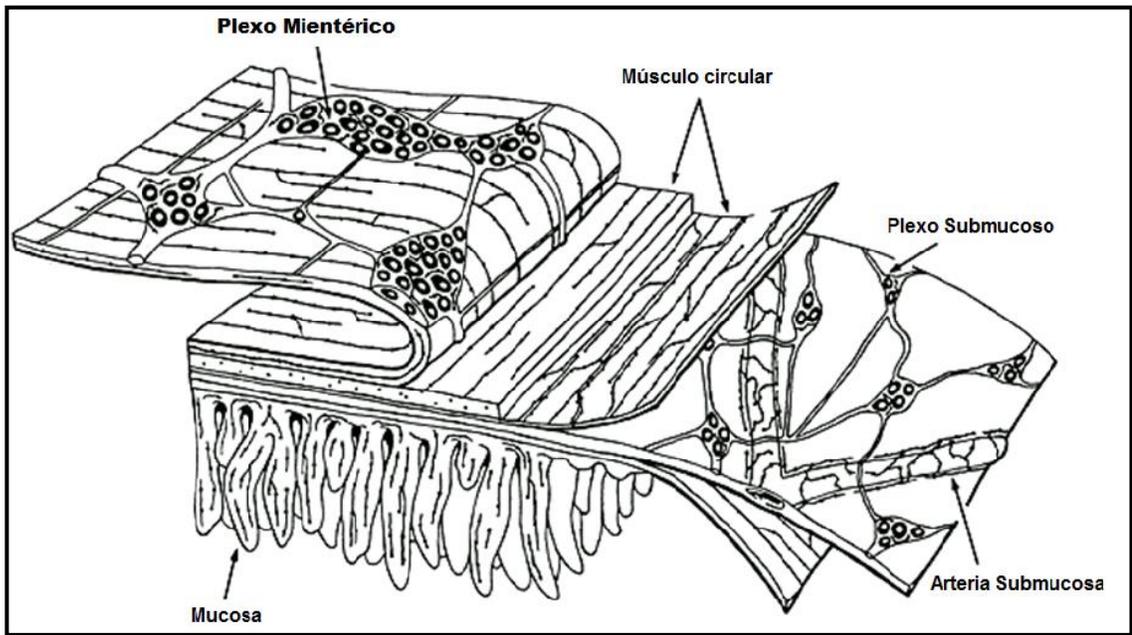


Figura 4. Esquema donde se pueden observar los plexos mientérico y submucoso.

La primera porción del duodeno en ocasiones se conoce como bulbo duodenal. Es la región a la cual llega el contenido gástrico exprimido a través del píloro. El duodeno se convierte en yeyuno a la altura del ligamento de Treitz. Por convención arbitraria, 40% proximal del intestino delgado distal al duodeno se llama yeyuno y 60% distal se conoce como íleon, aunque no existe un límite anatómico preciso entre ambos. La válvula ileocecal marca el punto final del íleon y el principio del colón (Ganong, 2006).

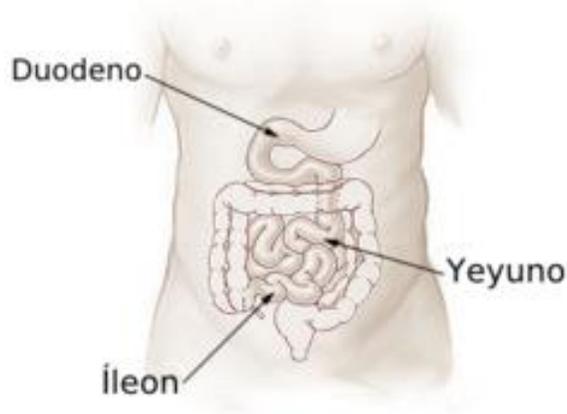


Figura 5. Anatomía del intestino delgado.

El epitelio del intestino delgado contiene varios tipos de células, figura 6:

- Enterocito: son células de absorción intestinal, las más numerosas y se encuentran principalmente en las vellosidades, en la superficie del intestino delgado y en las glándulas intestinales. Son células cilíndricas con un borde estriado por microvellosidades. Se forman por mitosis activa de células indiferenciadas en las criptas de Lieberkuhn; migran hacia los vértices de las vellosidades y luego se desprenden hacia la luz intestinal. Un enterocito vive entre 2 a 5 días con capacidad funcional máxima de 24 horas.
- Células indiferenciadas: se localizan en la mitad inferior de las criptas intestinales y dan origen a los enterocitos, a las células caliciformes y a las células endócrinas.
- Células caliciformes: se encuentran situadas en la pared lateral de las criptas y entre los enterocitos; producen moco y son más numerosas en las vellosidades.
- Células de Paneth: se encuentran en la parte más profunda de las criptas del intestino delgado; sintetizan y secretan proteínas. Son fagocíticas y contienen gránulos de lisosima, una enzima que digiere las paredes bacterianas; los enterocitos migratorios se exponen a una alta concentración de lisosimas, las cuales los protegen mientras se mueven hacia la punta de las vellosidades. Se cree que interviene en la regulación de la flora intestinal.
- Células endócrinas: localizadas en la profundidad de las glándulas intestinales, secretan serotonina (Segarra, 2006).

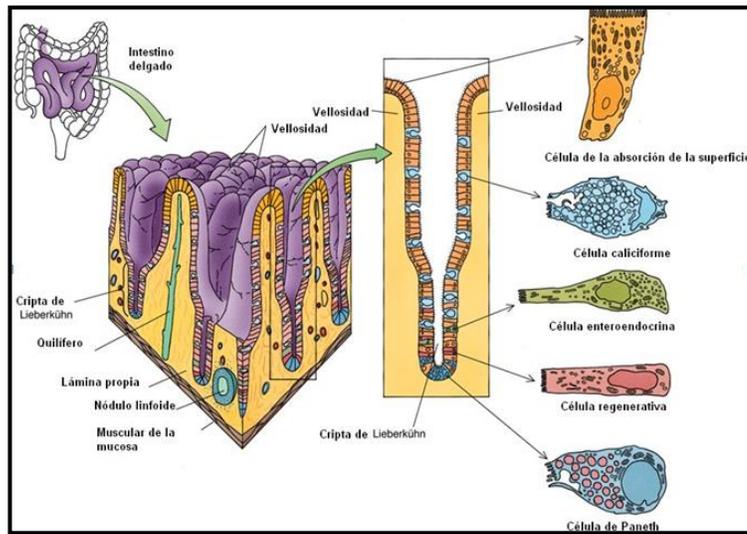


Figura 6. Esquema del intestino delgado, se pueden observar los tipos de células y su localización.

1.5.1 Ontogenia del Intestino Delgado.

En el momento de nacimiento, el intestino humano es morfológica y bioquímicamente más maduro que otros mamíferos. Los roedores nacen en una etapa más inmadura que los seres humanos, por lo que la maduración enzimática que se produce antes del nacimiento en los humanos, sólo se produce después del nacimiento en los roedores.

La madurez del intestino delgado es un reflejo de la duración del período de gestación, el desarrollo del intestino delgado del ser humano está casi terminado en el útero a finales del primer trimestre.

A pesar de las diferencias temporales en la ontogenia del intestino delgado entre las especies, los procesos que intervienen en el desarrollo del intestino delgado son similares. Así, el intestino humano pasa a través de cada una de las etapas que se producen en los roedores, de modo que los estudios en animales se pueden utilizar para comprender mejor el desarrollo del intestino humano.

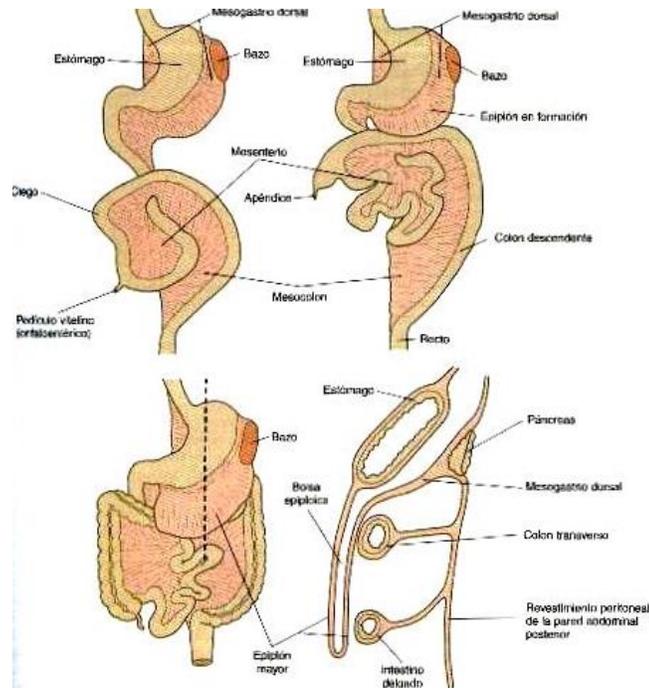


Figura 7. Etapas de la herniación del intestino en el pedículo vitelino

El intestino se forma a partir de la parte posterior del intestino anterior, el medio y el posterior; dos puntos de referencia resultan útiles para comprender la transformación macroscópica del intestino primitivo tubular, desde que es un cilindro relativamente recto hasta que se convierte en la compleja estructura plegada típica del intestino adulto; el primero es el pedículo vitelino, que se extiende desde el suelo del intestino medio hasta el saco vitelino, el segundo; en el lado dorsal del intestino medio primitivo, una rama ventral impar de la aorta, la arteria mesentérica superior, y sus ramas irrigan al intestino medio. La arteria mesentérica superior sirve como eje para la posterior rotación del intestino.

En la quinta semana, el rápido crecimiento del tubo intestinal determina que se pliegue en un asa a modo de horquilla con una rotación en sentido antihorario de la rama caudal del asa intestinal, alrededor de la rama superior cruzando desde su posición ventral (figura 7).

Cuadro 3. Etapas del desarrollo del intestino	
Periodo	Procesos
3 semanas	Comienza la formación del intestino tubular.
4 semanas	La mayor parte del intestino es tubular
5 semanas	Expansión y rotación inicial del estómago, se forma asa intestinal.
6 semanas	Se completa la rotación del estómago, asa intestinal prominente.
7 semanas	Herniación del asa intestinal
8 semanas	Rotación en sentido antihorario del asa intestinal herniada; recanalización del intestino.
9 semanas	Regreso del intestino herniado a la cavidad corporal, comienza la diferenciación de tipos epiteliales en el revestimiento intestinal.
11 semanas	Aparecen las vellosidades en el intestino delgado; se diferencian las células calciformes.
16 semanas	Las vellosidades revisten todo el intestino.
20 semanas	Se observan las placas de Peyer en el intestino delgado.

La hernia intestinal empieza ya en la sexta o séptima semana de gestación; hacia la novena semana, la cavidad abdominal ha crecido lo bastante como para acoger el tracto intestinal y las asas herniadas del intestino empiezan a desplazarse a través del anillo intestinal de vuelta hacia la cavidad abdominal (Carlson, 2009).

El desarrollo epitelial del intestino es un proceso muy organizado desde el punto temporal y espacial, dando como resultado células especializadas en absorción de nutrientes y secreción de sustancias con funciones endócrinas e inmunológicas.

Este proceso consta de cinco fases; en los cuales se dan modificaciones en las funciones digestivas y de transporte, para que al final se obtengan características del órgano adulto.

- 1) Morfogénesis
- 2) Diferenciación celular y preparación del epitelio fetal para absorción de calostro y leche
- 3) Nacimiento y periodo temprano
- 4) Periodo de lactancia
- 5) Crecimiento y destete

La morfogénesis a su vez, ocurre en tres fases principales; una fase temprana de proliferación y morfogénesis epitelial, una fase intermedia de diferenciación celular, en el que aparecen los tipos celulares distintivos que caracterizan el epitelio intestinal y una fase posterior de maduración fisiológica de los diferentes tipos de células epiteliales.

En la etapa temprana del desarrollo, se observan células indiferenciadas con núcleos grandes, pocas mitocondrias y componentes membranosos que luego son substituidos por células con núcleos más pequeños, estructuras citoplasmáticas más numerosas y con microvellosidades que se desarrollan en la pared apical (Vásquez, 2012), en este momento el epitelio deja de ser estratificado para convertirse en cilíndrico simple. Cuando se forman las vellosidades, aparecen también las criptas intestinales como fositas en la base de las mismas; las criptas contienen células madre epiteliales. Cuando una célula madre se divide, una de las células hijas sigue siendo pluripotencial, mientras que la otra continúa proliferando a la vez que asciende a la punta de la vellosidad para dar lugar a la formación de los cuatro linajes celulares. (Carlson, 2009).

La proliferación celular se produce en las criptas, las células diferenciadas se cubren de vellosidades, y el equilibrio dinámico entre la proliferación y la diferenciación se equilibra con la apoptosis de las células senescentes (Drozdowski, 2010).

Así, se puede dividir el epitelio en dos regiones, la funcional, que aloja a células diferenciadas y se encuentra en las vellosidades, y la región proliferativa que representa el nicho epitelial de las células madre y está localizada en las criptas de Lieberkühn (Vásquez, 2012).

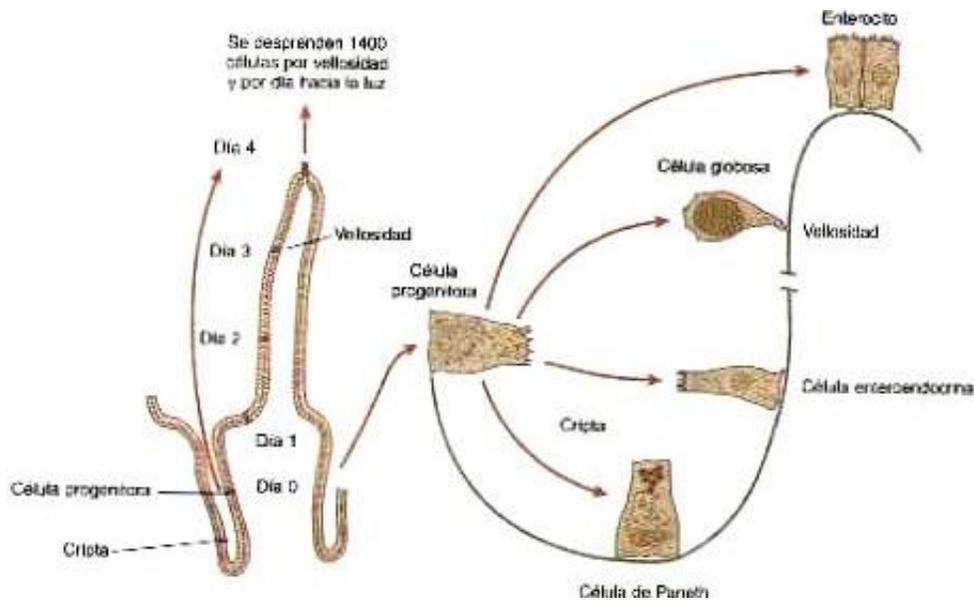


Figura 8. Diferenciación de las células epiteliales intestinales a partir de células madre.

Al final del segundo trimestre del embarazo en humanos se han diferenciado todos los tipos celulares del endotelio intestinal, pero muchas de estas células aún no tienen la capacidad funcional adulta; a las 12 semanas de gestación existen varios patrones bioquímicos específicos de diferenciación, que maduran, posteriormente, durante el periodo fetal. Otras diferenciaciones bioquímicas intestinales se producen después del parto, mayormente como respuesta a patrones dietéticos.

El SNE empieza a madurar durante el desarrollo embrionario, cuando los precursores neuronales migran desde la cresta neural a la pared intestinal. Cuando los precursores neuronales llegan al intestino, los factores tróficos y las proteínas de matriz extracelular estimulan la diferenciación neuronal y la formación de circuitos. Sin embargo, el SNE sigue madurando en el periodo postnatal (Brian, 2007).

1.6 Contracción y excitación del músculo liso

La presencia de serotonina en el sistema nervioso entérico puede participar tanto en la diferenciación celular como en la contracción y excitación del músculo liso. El músculo liso contiene filamentos tanto de actina como de miosina, que tienen características químicas similares a los filamentos de actina y miosina del músculo esquelético. No contiene el complejo troponina normal que es necesario para el control de la contracción del músculo esquelético, de modo que el mecanismo de control de la contracción es diferente.

Se han llevado a cabo diversos estudios entre los que se encuentran los químicos para mostrar que los filamentos de actina y miosina del músculo liso interactúan de manera muy similar a como lo hace el músculo esquelético. Además, el proceso contráctil es activado por los iones calcio, el trifosfato de adenosina (ATP) el cual es degradado a difosfato de adenosina (ADP) para proporcionar la energía para la contracción.

Sin embargo, hay diferencias importantes entre la organización física del músculo liso y la del músculo esquelético, así como diferencias en el acoplamiento excitación-contracción, el control del proceso contráctil por los iones calcio, la duración de la contracción y la cantidad de energía necesaria para la misma.

El músculo liso no tiene la misma disposición estriada de los filamentos de actina y miosina que se encuentran en el músculo esquelético. Por el contrario las técnicas de microfotografía electrónica indican una organización física diferente en donde grandes números de filamentos de actina unidos a los denominados cuerpos densos. Algunos de estos cuerpos están unidos a la membrana celular, otros se encuentran dispersos en la célula. Algunos de los cuerpos densos de la membrana de células adyacentes están unidos entre sí por puentes proteicos intercelulares. La fuerza de contracción se transmite de unas células a otras principalmente a través de estos enlaces.

Interpuestos entre los filamentos de actina de la fibra muscular están los filamentos de miosina. Estos filamentos tienen un diámetro superior al doble que los filamentos de actina. En las microfotografías electrónicas habitualmente se ven 5 a 10 veces más filamentos de actina que de miosina. En la unidad contráctil se ven

grandes números de filamentos de actina que irradian desde dos cuerpos densos; los extremos de estos filamentos se superponen a un filamento de miosina que está localizado a mitad de camino entre los cuerpos densos. Esta unidad contráctil es similar a la unidad contráctil del músculo esquelético, aunque sin la regularidad de su estructura; de hecho, los cuerpos densos del músculo liso tienen la misma función que los discos Z del músculo esquelético (Guyton y Hall, 2006).

2. HIPÓTESIS

El receptor a serotonina 5-HT_{5A} está distribuido diferencialmente en el intestino de rata durante la ontogenia.

3. OBJETIVOS

3.1 General

- Localizar los receptores a serotonina 5-HT_{5A} en las diferentes regiones del intestino de rata adulta y neonatal.

3.2 Específicos

- Localizar los receptores 5-HT_{5A} en la región proximal del intestino de rata adulta.
- Localizar los receptores 5-HT_{5A} en la región distal del intestino de rata adulta.
- Localizar los receptores 5-HT_{5A} en la región proximal del intestino de rata neonata.
- Localizar los receptores 5-HT_{5A} en la región distal del intestino de rata neonata.
- Comparar la distribución de los receptores en la región proximal y distal de la rata neonata con los observados en las mismas regiones de la rata adulta.

4. METODOLOGÍA

4.1 Reactivos

- Solución Buffer de sales de fosfatos (PBS) 10X
- Solución Buffer de fosfato con Tween 20 (PBT)
- Solución de p-formaldehído (PFA) al 4%
- Sacarosa al 30% en PBS 1X
- Adhesivo para tejidos Tissue tek
- BSA 3% en PBS 1X
- Glicerol
- Anticuerpo primario contra 5HT_{5A} en conejo
- Anticuerpo secundario anti-conejo Rodamina

4.2 Materiales

- Estuche de disección
- Cajas petri de plástico
- Tubos Eppendorf de 2ml y 1ml
- Tubos Falcon de 15ml
- Refractario de vidrio con tapa (Pyrex)
- Micropipetas
- Frascos de vidrio para dilución (Pyrex)
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Cajas de refrigeración a 4°C (Cryo-Safe™)

4.3 Equipos

- Estereoscopio (Zeiss, Stemi DV4)
- Criostato (LEICA, CM1850)
- Microscopio con cámara (Zeiss, DME)
- Balanza analítica (Sartorius, CP124S)

- Refrigerador (4°C) y congelador REVCO (-20°C y -70°C)

4.4 Animales

Se usaron dos ratas *Sprogue Dawley* adultas y 4 crías, las cuales fueron proporcionadas por el bioterio del Instituto de Neurobiología (INB), UNAM Campus Juriquilla.

4.5 Preparación de reactivos y equipo

- Solución Buffer de sales de fosfatos (PBS) 10X

-

- Solución Buffer de fosfato con Tween 20

Se preparó mezclando 5ml de Tween 20 con 955ml PBS 1X, con constante agitación, evitando la formación de burbujas.

- Solución de p-formaldehído (PFA) al 4%

Se pesaron 20g de p-formaldehído en 500ml de PBS 1X. Fue necesario agitar a una temperatura de 60°C; y las alícuotas se guardaron a -20°C.

- Sacarosa al 30% en PBS 1X

150g de sacarosa fueron pesados y disueltos en 500ml de PBS 1X.

- BSA 3% en PBS1X (Tratamiento bloqueador)

Para cada laminilla se usó 300µl de la solución, y esta se preparó sabiendo que para 100ml de PBT 1X es necesarios 3g de BSA, y que para cada 1000 µl de PBT 1X se necesitan 2mg de poli-Llisina.

- Anticuerpos primario y secundario

Se utilizó una dilución 1:100 del anticuerpo primario específico para el receptor 5-HT5A y para el secundario una dilución 1:750 del anticuerpo. Ambos fueron diluidos en PBT 1X.

- La cámara que se usó para mantener las laminillas húmedas, fue preparada con un refractario de vidrio (Pyrex), papel absorbente humedecido con agua destilada y un par de pipetas de plástico cortadas por la mitad.

4.6 Métodos

4.6.1 Métodos Biológicos

Se tomó como P0 el día en que las ratas nacieron, fueron sacrificadas por decapitación y se hizo la disección para tomar la porción proximal y distal del intestino delgado. Las ratas adultas se anestesiaron con pentobarbital 40mg/kg y la eutanasia fue llevada a cabo por dislocación, se realizó la disección y se tomó del intestino delgado, las porciones proximal y distal. Para ambas edades los segmentos de intestino delgado se dejaron en PBS.

Posteriormente se limpió el intestino con ayuda de una jeringa y PBS, y se abrieron longitudinalmente, fue necesaria la ayuda del estereoscopio para el tejido perteneciente a las ratas P₀.

Se colocaron los tejidos en PFA al 4%, durante 6 horas, cuidando que el tejido no se doblara.

Pasadas las 6 horas, los tejidos se enjuagaron con PBS 1X y se pasaron a un tubo Falcon con una solución de sacarosa al 30%, donde se dejaron en el refrigerador a 4°C, aproximadamente una hora, hasta que el tejido llegara al fondo del tubo.

Pasado el tiempo en la sacarosa se procedió a montar los tejidos con *tissue-tek* en cajas de aluminio, cuidando que las vellosidades estuvieran colocadas hacia abajo, y se congelaron a -70°C.

Finalmente se hicieron cortes al tejido de 12µm de grosor, con ayuda del criostato.



Figura 9. Criostato LEICA, CM1850

4.6.2 Inmunofluorescencia.

Se seleccionaron las mejores laminillas y se colocaron en las cámaras húmedas, donde se hicieron tres lavados con PBS 1X, de 10 minutos cada uno.

Se agregó a cada laminilla 300 μ l del tratamiento bloqueador, dejando incubar 30 minutos.

Pasado este tiempo se volvió a hacer 3 lavados con PBS 1X, de 10 minutos cada uno.

Se colocó el anticuerpo primario, 300 μ l a cada laminilla y al blanco solo se le agregó el buffer de dilución. Se dejaron incubar toda la noche en el refrigerador a 4°C.

Al día siguiente se realizaron 3 lavados más con PBS 1X, de 10 minutos cada uno.

En un cuarto oscuro, se agregó el anticuerpo secundario, 300 μ l a todas las laminillas, incluyendo el blanco, y se dejaron incubar por 2 horas.

Al finalizar la incubación se hicieron 3 lavados con PBS 1X, de 10 minutos cada uno.

Para proteger los tejidos y evitar que se secaran, se agregaron dos gotas de glicerol y se dejó caer un portaobjetos sobre cada laminilla, sin presionar. Se eliminó el residuo de glicerol con un papel absorbente y se cubrieron las laminillas para llevarlas al microscopio.

4.6.3 Toma de fotografías

Las fotografías se tomaron con ayuda del microscopio Axiostar Zeiss, acoplado a una cámara digital AxioCam MRC Zeiss y el software KS-300 Zeiss, en un cuarto cerrado y oscuro. Se usaron, el objetivo de 10X y el filtro de Rodamina.

5. RESULTADOS

La localización de los receptores 5-HT_{5A} se logró mediante la técnica de inmunofluorescencia en cortes de intestino delgado de rata adulta y rata neonatal.

Para asegurarnos que no existiera ninguna interferencia por fluorescencia endógena del tejido o bien, por falta de especificidad de los anticuerpos, se llevaron a cabo pruebas a las que llamamos controles negativos y blancos; en el primero no se agregó ningún anticuerpo y en el segundo se agregó sólo el anticuerpo secundario, con lo anterior se pretendió resolver el problema de marcas inespecíficas.

Los resultados de las muestras control, a las que no se agregó ningún anticuerpo, se muestran en la figura 10, como se puede apreciar no hay ninguna marca inmunorreactiva que pudiera indicar una fluorescencia del tejido. Los mismos experimentos fueron repetidos en las regiones proximal y distal de las ratas neonatas y adultas y como se puede apreciar en la figura en ninguna se encontró señal inmunofluorescente.

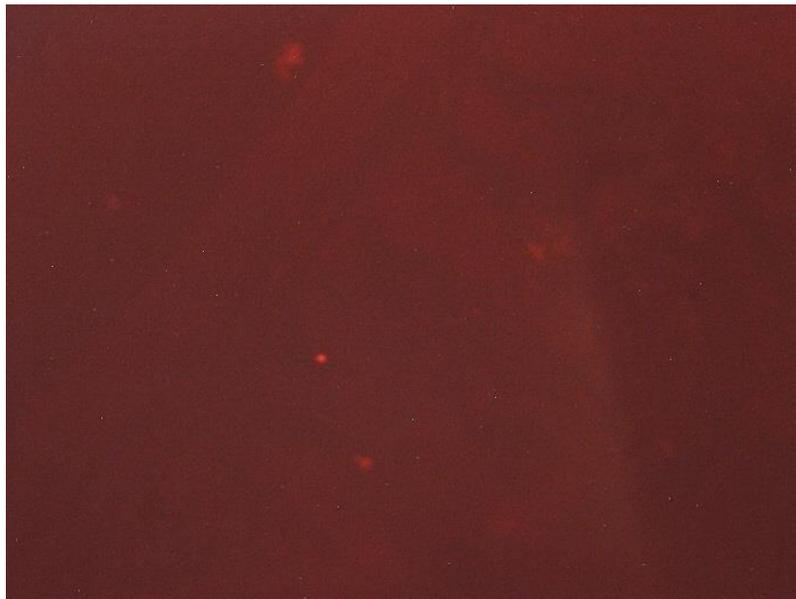


Figura 10. Control negativo. En la figura se observa el resultado del experimento en el que no se aplicaron ninguno de los anticuerpos, el tejido utilizado en esta muestra fue la porción distal de rata adulta.



Figura 11. Blanco. En la figura se muestra un corte del intestino adulto proximal; al cual no se agregó anticuerpo primario, se puede notar la ausencia de marca inmunorreactiva.

Con la idea de explorar la posible interferencia de los anticuerpos secundarios, se realizaron experimentos en donde se siguió la misma metodología, solo que no se aplicó el anticuerpo secundario. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 11 en donde se puede apreciar que no existe ninguna marca inmunorreactiva,

Una vez establecidos los controles se llevaron a cabo los experimentos problema en donde se pretendía explorar los cambios de los receptores a serotonina 5-HT_{5A} durante la ontogenia, para lo cual se realizaron experimentos con las regiones proximal y distal de rata neonata.

En el intestino de rata neonata, en la región proximal, se observa que la distribución de los receptores 5-HT_{5A} se encuentra en la parte central de las vellosidades, correspondiente a la lámina propia (figura 7).

El resultado de la región proximal de rata neonata difiere con lo obtenido en la región distal, ya que esta última no presentó marca inmunorreactiva.

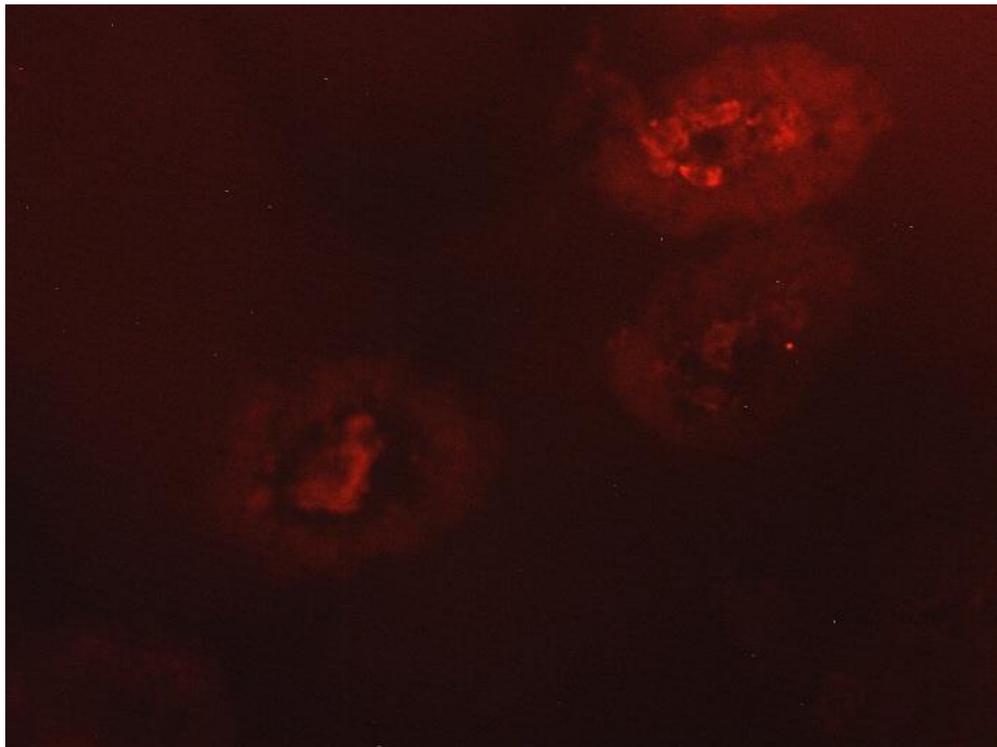


Figura 12. Porción proximal de tejido de rata neonata. Se observa la distribución de las marcas inmunorreactivas para el receptor 5-HT_{5A} en el centro de la vellosidad, perteneciente a la lámina propia.

El resultado de la región distal de rata neonata a diferencia de la región proximal no se encontró marca inmunorreactiva, lo que sugiere que a esta edad dicho receptor no está llevando a cabo ninguna función en esta región (Figura 13).

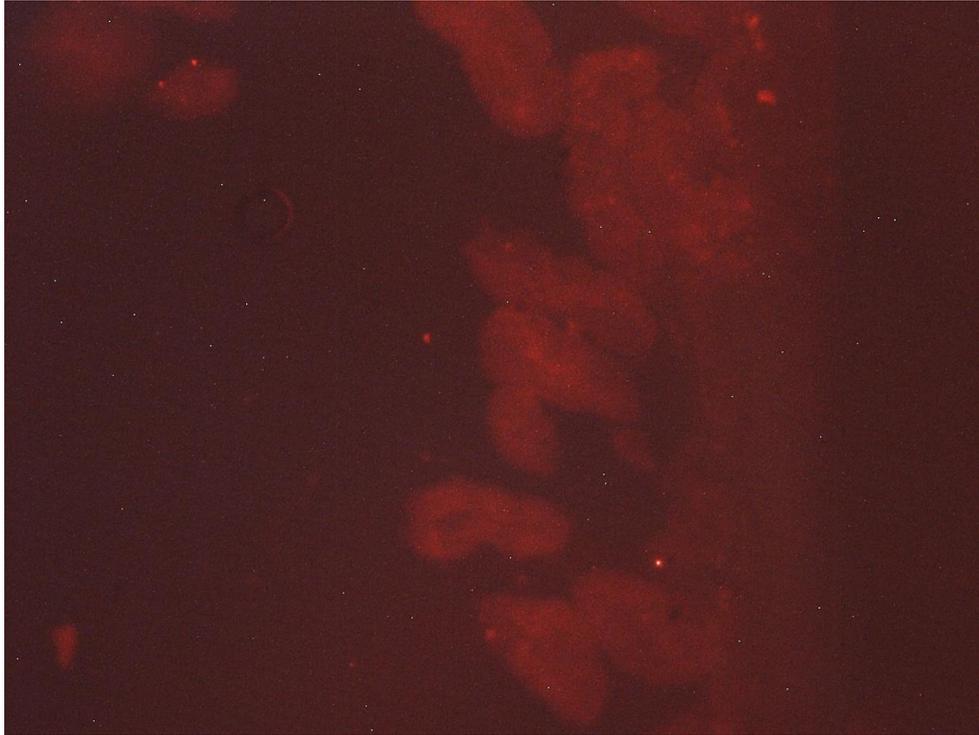


Figura 13 Ausencia de marca inmunorreactiva para el receptor 5-HT_{5A} en la región distal del intestino de rata neonata. En la región distal no se encontró la expresión del receptor 5-HT_{5A}.

En la región proximal del intestino delgado de rata adulta, se observó la marca inmunorreactiva para el receptor 5-HT_{5A} en la zona central de las vellosidades, correspondiente a la lámina propia, Nótese que para este receptor no se encontró ninguna señal inmunorreactiva en las vellosidades. En la figura 14 se pueden observar los resultados de dicha marca.

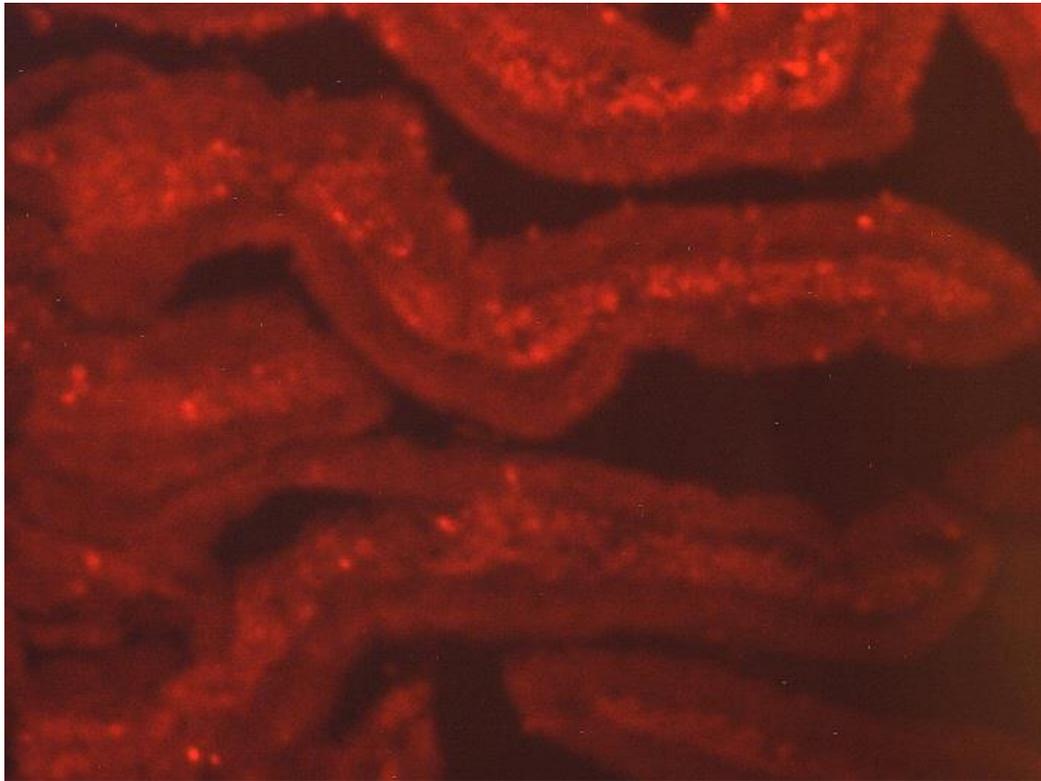


Figura 14. Porción proximal del tejido de rata adulta. Las células de la lámina propia se encuentran marcadas con intensidad.

Al realizar experimentos para conocer la marca inmunorreactiva de la porción distal del intestino de rata adulta, se encontró que existe marca en la lámina propia con una menor intensidad que en la región proximal y también en la periferia de las vellocidades, lo cual puede corresponder a las diferentes células que se encuentran en dichas vellocidades entre las que están: Las enterocromafines, las de Paneth, las calciformes, las absortivas o bien las regenerativas (Figura 14).

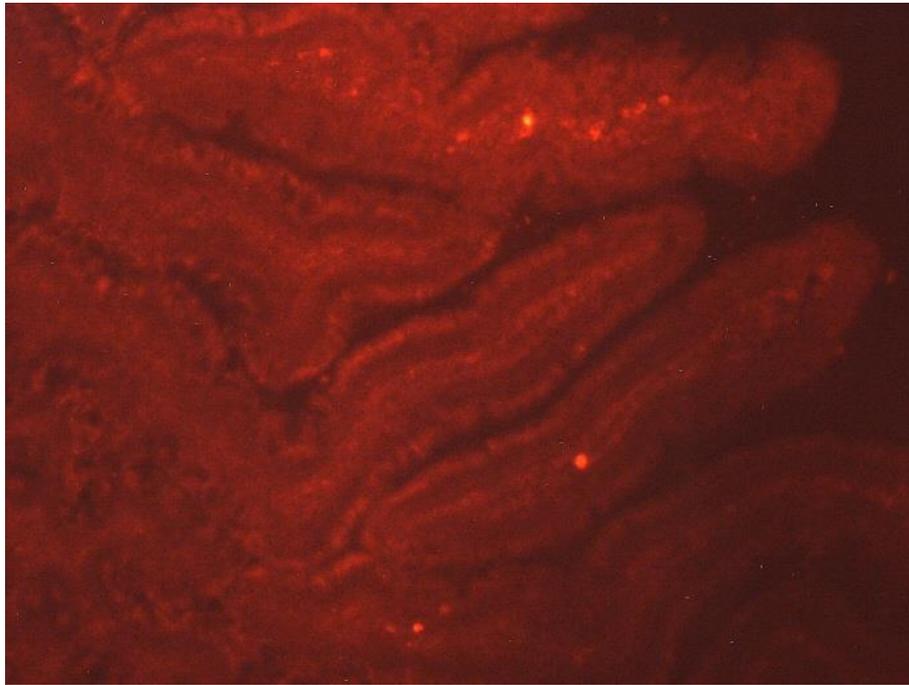


Figura 15. Porción distal del tejido de rata adulta. La marca inmunorreactiva se encuentra en la lámina propia, nótese que la intensidad es menor que en la región proximal. La marca también se observa en la periferia de las vellosidades.

Al comparar las marcas inmunorreactivas observadas entre las regiones proximal y distal de la rata adulta se puede apreciar que la intensidad en la región proximal es mayor que en la región distal y en esta última tenemos tinción en las vellosidades que no está presente en la región proximal. .

6. DISCUSIONES

En este estudio se investigó la distribución de los receptores 5-HT_{5A} durante la ontogenia del intestino delgado de rata en sus regiones proximal y distal, utilizando la técnica de inmunofluorescencia.

Se utilizaron las condiciones ideales de la fijación de tejidos realizadas por nuestro grupo de trabajo, las cuales fueron 6 hrs de fijación con p-formaldehído al 4 % (Padilla-Olvera, 2011), las concentraciones de los anticuerpos primario y secundario fueron 1:100 y 1:750, respectivamente.

En los tejidos del grupo control, a los cuales no se agregó ningún anticuerpo, se pudo observar que estaba libre de marca, lo que permitió asegurar que la marca en las muestras era propia del receptor y no de alguna interferencia como pudiera ser la fluorescencia endógena del tejido.

En los tejidos del grupo blanco no se observó marca inmunorreactiva, lo cual indica que además de no existir fluorescencia endógena, el anticuerpo secundario tampoco presenta marca inespecífica, lo cual apoya a que la marca encontrada en los experimentos siguientes es específica del receptor para el cual se prepararon los anticuerpos.

Una vez establecidas las condiciones ideales para la inmunofluorescencia, se procedió a analizar la distribución que mostraba el receptor en las vellosidades durante las etapas neonatal y adulta. Se observó que en la zona conocida como lámina propia, la cual se encuentra en la parte central de la vellosidad, se encontró marca inmunorreactiva, tanto para la edad neonatal como adulta en las porciones proximal y distal, la única diferencia fue que se encontró en menor intensidad en la porción distal, esto puede deberse a que está caracterizada por contener abundantes células redondas cuya identidad no se puede establecer con certeza (con el aumento de 40X) sin embargo, se trata principalmente de linfocitos y otras células del sistema inmune, componentes del tejido conectivo laxo y células musculares lisas aisladas. Lo anterior es importante porque la serotonina está

involucrada en el control gastrointestinal vía los diferentes subtipos de receptores (Shaath y Whorwell, 2001)

El resultado de la región proximal de rata neonata difiere con lo obtenido en la región distal de rata neonata, ya que esta última no presentó marca inmunorreactiva. Dichas diferencias pueden deberse al hecho que la maduración fisiológica de los diferentes tipos celulares en el intestino se producen después del parto, con frecuencia en respuesta a factores dietéticos (Carlson, 2009).

Al observar detenidamente la MIR se ubica en las membranas de las células, lo cual coincide con estudios realizados por Dutton y colaboradores en el año 2008, en el cual clonaron la secuencia génica del receptor 5-HT_{5A} en linfocitos humanos, para posteriormente inducir el vector en la línea celular COS-7 y ver su expresión por inmunofluorescencia, obteniendo marca inmunorreactiva principalmente en la membrana celular para el genotipo salvaje (Dutton y col., 2008), esto se debe principalmente a que es un receptor acoplado a proteína G_{i/o}, ocasionando que su expresión se localice en la membrana, donde se efectúa la unión ligando-receptor para así ejercer su función biológica (Francken y col., 1998).

Los resultados encontrados en la porción proximal del intestino de rata neonata para los receptores a serotonina 5-HT_{5A}, son consistentes con el trabajo de Gershon en el 2002, donde el receptor 5-HT_{2A} estaba fuertemente expresado en la porción proximal, tanto en el plexo mientérico como en el plexo submucoso del tracto gastrointestinal..

Con respecto a la distribución de los receptores 5-HT_{5A} en la porción distal del intestino de rata neonata, no se encontró MIR, esto puede deberse a que la mayor parte de la serotonina del cuerpo, aproximadamente el 90%, es almacenada y sintetizada por las células enterocromafines del tracto gastrointestinal (De Ponti, 2004), y ésta es distribuida en la circulación a través de las plaquetas, debido a que tienen una amplia capacidad para conducirla a los gránulos densos, las plaquetas activas liberan serotonina de los gránulos densos (Córdova-Pluma y col. 2011); y ya que el 100% de los alimentos ingeridos durante la edad neonatal es leche

materna, no requiere de todos los procesos involucrados durante la actividad mecánica del tracto gastrointestinal y la absorción de nutrientes, las cuales son algunas de las principales funciones de la serotonina en el tracto gastrointestinal (Gershon, 2006); por lo tanto el intestino proximal de rata neonatal lleva a cabo sus principales respuestas a través de la serotonina en la sección proximal del intestino y en la región distal, ya no es necesarias dichas funciones en esta edad. .

Las MIR en el intestino de las ratas adultas aumentaron su intensidad, siendo las más visibles las de la porción proximal que en la distal, y su localización está limitada a la lámina propia y células de las criptas, mientras que para Gershon en 2002, se presentó MIR en epitelio, plexos mientérico y submucoso además de la lámina propia y las células de las criptas. Es necesario realizar otros estudios para precisar el tipo celular marcado en la región distal, aunque se puede proponer que son tanto las células enterocromafines como calciformes, de Paneth y absortivas porque se observa distribuido en toda la periferia de la vellosidad.

La localización de los receptores a serotonina 5-HT_{5A} son consistentes con los reportados por Lüllmann (2008), quien asegura que la serotonina en el intestino delgado se libera como neurotransmisor desde las neuronas del plexo mientérico y se secreta como hormona local por las células enterocromafines en dirección a las porciones más internas de la pared del tracto intestinal. La presencia de dicho receptor serotoninérgico puede participar en las funciones que realiza la serotonina en el tracto gastrointestinal entre las que se encuentran la motilidad, la secreción y la sensibilidad visceral, así como su participación en mecanismos patológicos como la modulación de las respuestas inflamatorias inmunes que se pudieran presentar en el intestino. Las funciones de los receptores serotoninérgicos pueden ser moduladas por sus agonistas y antagonistas (Cirillo y col. 2011).

Otro punto que debemos tomar en cuenta para esclarecer la diferencia en intensidades de la porción proximal con la porción distal, es el hecho que, si bien, las células enterocromafines se encuentran en el intestino, la mayoría de ellas está en el duodeno (porción proximal) y el recto. Estudios recientes por (Witte y col.

2013), demostraron que la serotonina se encuentra principalmente en el duodeno; correspondiente a la porción proximal, con una concentración más alta en la lámina propia, esto explica por qué la intensidad de las MIR fue mayor en la porción proximal que en la distal.

Los resultados de la presencia de receptores 5-HT_{5A} en el intestino de rata durante la ontogenia pueden ampliar las funciones de la serotonina en el intestino y apoyar el entendimiento de numerosas drogas que se pueden administrar en diversas enfermedades como la diarrea, constipación, síndrome de colon irritable y cáncer (Sanger 2008; Camilleri 2002). También es interesante ampliar estos estudios para conocer su posible participación en la diferenciación de las neuronas entéricas por la estimulación regulada del receptor como se ha reportado para el receptor 5-HT_{2B} y el receptor 5-HT₄, el cual se ha reportado que participa en la reconstrucción del circuito entérico dañado en la región distal donde se encuentran células madre (Florica-Howells y col. 2000; Kawahara y col. 2011; Takaki y col. 2011). Los receptores encontrados en este trabajo son importantes para conocer los cambios de expresión de la proteína tanto en regiones como en las distintas edades, por lo que se considera importante seguir ampliando este tipo de estudios para conocer las células específicas donde se presentan los cambios y su posible asociación con los cambios fisiológicos que esto pudiese ocasionar. El lograr diferenciar si son las células de Paneth o las calciformes por ejemplo nos hablaría de diferencia en las acciones que dicho receptor tendría durante el desarrollo.

El receptor a serotonina 5-HT_{5A} es un receptor acoplado a proteína G inhibidora (Gi), lo que quiere decir, que inhibe a la adenilatoclasa, 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). La secreción regulada de 5-HT por las células enterocromafines se puede mejorar o inhibir por moléculas de señalización liberadas por las células circundantes, con el mecanismo mencionado anteriormente, y por nervios que inervan la mucosa. Las células enterocromafines son transductores sensoriales que responden a estímulos mecánicos o químicos aplicados a la mucosa provocando la liberación de 5-HT. La

5-HT liberada de las células enterocromafines inicia reflejos motores mediante la activación de receptores 5-HT localizados en las terminales de los nervios aferentes primarios (Fujimiya y col., 1997). La 5-HT liberada por las células enterocromafines inicia potenciales de acción antidrómicos en las neuronas aferentes primarias intestinales, que a su vez activan interneuronas y motoneuronas en los circuitos neuronales entéricas regulando el peristaltismo (Bian y col, 2007).

7. CONCLUSIONES

- La ubicación de los receptores 5-HT_{5A} en la región proximal del intestino de rata adulta, se encontró en la lámina propia de la vellosidad y en distintas células epiteliales de la misma.
- La ubicación de los receptores 5-HT_{5A} en la región distal del intestino de rata adulta, se encontró en la lámina propia de la vellosidad y en distintas células epiteliales de la misma.
- La ubicación de los receptores 5-HT_{5A} en la región proximal del intestino de rata neonatal, se encontró en la lámina propia de la vellosidad.
- En cuanto a la ubicación de los receptores 5-HT_{5A} en la región distal del intestino de rata neonatal, no se encontró marca inmunorreactiva.
- La marca inmunorreactiva de los receptores 5-HT_{5A} se encontró en mayor proporción en la edad adulta que en neonatal.

8. REFERENCIAS

- 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 Article: Serotonin receptors and their function Neuropharmacology. **1999**; 38: 1083 – 1152.
- Bart JBF**, Josson K, Lijnen P, Jurzak M, Luyten W y Leysen J. Human 5-HT5A receptors activate coexpressed gi and go proteins in *spodoptera frugiperda* 9 cells. Molecular Pharmacology. **2000**; 57: 1034 – 1044.
- Brian X**, Patel B, Dai X, Galligan JJ y Swain G. High mucosal serotonin availability in neonatal guinea pig ileum is associated with low serotonin transporter expression. Gastroenterology. **2007**; 132: 2438 – 2447.
- Camileri M**. Serotonergic modulation of visceral sensation: lower gut. Gut **2002**; 51: 81-86.
- Carlson**, B. Embriología Humana y Biología del Desarrollo. Cuarta edición. Barcelona, España. Editorial Elsevier. **2009**: 369 – 373.
- Cirillo C**, Vanden Berghe P, Tack J. Role of serotonin in gastrointestinal physiology and pathology. Minerva Endocrinol **2011**; 36(4): 311-324.
- Corbett**, DF. Descubrimiento de un potente y selectivo antagonista para el receptor 5-HT5A por HTS. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. **2005**; 15: 4014–4018.
- Córdova-Pluma VH**, Vargas-Viveros P, Vega C, Quintero M, Hurtado-Monroy R. Revisión Agregometría plaquetaria: el estudio de la agregación de las plaquetas y la disfunción plaquetaria. Med Int Mex **2011**; 27(1): 58-74.
- De Ponti F**. Pharmacology of serotonin: What a clinician should know. Gut **2004**; 53(10): 1520-1535.
- Drozdowski LA**, Clandinin T y Thomson ABR. Ontogeny, growth and development of the small intestine: Understanding pediatric gastroenterology. World Journal of Gastroenterology **2010**; 16: 787 – 799.
- Duncan**, MJ. Localización de los receptores de serotonina 5-HT5A en el sistema circadiano en hámster. Brain Research **2000**; 869: 178 – 185.

Dutton A, Massoura A, Dover T, Andrews N, Barnes N. Identification and functional significance of N-glycosylation of the 5-HT_{5A} receptor. *NCI*. **2008**; 52: 419-425.

Enríquez-Blanco H. Síndrome de Intestino Irritable y Otros Trastornos Relacionados. México. Editorial Médica Panamericana. **2010**: 41.

Fidalgo S, Ivanov DK y Wood SHI. Serotonin: from top to bottom. *Biogerontology*. **2012**: 1 – 2.

Flórez J. Farmacología Humana. Tercera edición. Barcelona, España. Editorial Masson. **2000**: 315 – 317.

Florica-Howells E, Maroteaux L, Gershon MD. Serotonin and the 5-HT_{2B} receptor in the development of enteric neurons. **2000**; 20(1): 294-305.

Francken B, Jurzak M, Vanhauwe J, Luyten W, Leysen J. The human 5-HT_{5A} receptor couples to G_i/G₀ proteins and inhibits adenylate cyclase in HEK 293 cells.

Fujimiya M, Okumiya K, Yamane T y Maeda T. Distribution of serotonin-immunoreactive nerve cells and fibers in the rat gastrointestinal tract. *Histochem Cell Biol* **1997**; 107:105-114.

Gangong, W F. Fisiología Médica. Veinteava edición. México. Editorial El Manual Moderno. **2006**: 474 – 480.

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

Guyton, Tratado de Fisiología Médica. Décima edición. México. Editorial Mc Graw Hill. **2001**: 868 – 869.

Guyton y Hall. Tratado de Fisiología Médica. Décimo primera edición, Madrid, Editorial Elsevier. **2006**: 92-95.

Grailhe, R. Receptores humanos 5-HT₅: el receptor 5-HT_{5A} es funcional, pero el receptor 5-HT_{5B} se perdió durante la evolución humana. *European Journal of Pharmacology*. **2001**; 418: 157 – 167.

Hasler, W. Serotonin and the GI tract. *Current Gastroenterology Reports*. **2009**; 11:383 – 391.

Kawahara I, Kuniyasu H, Matsuyoshi H, Goto K, Obata K, Misawa H, Fuji H, Takaki M. Comparison of effects of a selective 5-HT reuptake inhibitor versus a 5-HT₄

receptor agonist on in vivo neurogenesis at the rectal anastomosis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **2012**; 15;302(6): 588-97.

Lorenzo, P. Velázquez, *Farmacología Básica y Clínica*. Décima octava edición. Madrid, España. Editorial Médica Panamericana. **2008**: 478.

Lüllmann, H. *Farmacología, Texto y Atlas*. Sexta edición. Madrid, España. Editorial Médica Panamericana. **2008**:116.

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.

Piñol - Jiménez F, Paniagua – Estévez M, Salvador – Prato JC. *Hormonas – Neuropéptidos Gastrointestinales*. Consultado el 8 de Enero de 2013. Disponible en <http://www.hvil.sld.cu>.

Romero-Trujillo, JO, Frank-Márquez, N, Cervantes-Bustamante R, Cadena-León JF y col. Sistema nervioso entérico y motilidad gastrointestinal. *Acta Pediatr Mex* 2012; 33(4): 207-214.

Shaatha NM, Whorwell PJ. 5-HT and the treatment of irritable bowel syndrome: A clinical perspective. *Drugs Today (Barc)*. **2001**; 37(7), 437-440.

Sanger GJ. 5-hydroxytryptamine and the gastrointestinal tract: where next. *Trends Pharmacol Sci*. **2008**; 29(9): 465-471.

Segarra, E. *Fisiología de los Aparatos y Sistemas*. Editado por Universidad de Cuenca. Argentina. **2006**: 119.

Takaki M, Misawa H, Matsuyoshi H, Kawahara I, Goto K, Zhang GX, Obata K, Kuniyasu H. In vitro enhanced differentiation of neural networks in ES gut-like organ from mouse ES cells by a 5-HT₄-receptor activation. *Biochem Biophys Res Commun* **2011**; 25; 406(4): 529-533.

Tresquerres, J. *Fisiología Humana*. 4ta edición. China. Editorial Mc Graw Hill. **2010**: 772.

Vásquez, M. Desarrollo del epitelio del tracto intestinal y su participación en la defensa del organismo en mamíferos. *Revista electrónica de veterinaria*. **2012**; 13: 1 – 14.

Wite AB, D'Amato M, Poulsen SS, Laurent A, Knuhtsen S, Bindsley N, Hansen MB, Schidt PT. Duodenal epithelial transport in functional dyspepsia: Role of serotonin. *World J. Gastrointes. Pathophysiol.* **2013**, 15:4(2): 28-36.