



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL ARNm DEL RECEPTOR
DE SEROTONINA 2c (5-HT 2c) EN INTESTINO DE
RATA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

AMÉRICA SUSANA MARES GARCÍA

DIRIGIDA POR

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL ARNm DEL
RECEPTOR DE SEROTONINA 2c (5-HT 2c) EN
INTESTINO DE RATA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

AMÉRICA SUSANA MARES GARCÍA

DIRIGIDA POR

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES

SINODALES

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES
DIRECTORA

Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ
SINODAL

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO
SINODAL

Dra. MA. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 El sistema nervioso entérico	3
II.2 Serotonina	4
II.1.1 Biosíntesis y función	4
II.3 Receptores de serotonina	5
II.4 El receptor de serotonina 2c	8
II.5 PCR en tiempo real	9
II.5.1 Cuantificación absoluta	15
II.5.2 Cuantificación relativa	16
II.5.3 Veces de activación	17
III. HIPÓTESIS	18
IV. OBJETIVOS	19
IV.1 General	19
IV.2 Específicos	19
V. METODOLOGÍA	20
V.1 Materiales y reactivos	20
V.1.1 Material biológico	20
V.1.2 Materiales y equipo	20
V.1.3 Reactivos	21
V.2 Métodos	21
V.2.1 Extracción del ARN	21
V.2.2 Purificación del ARN	22
V.2.3 Cuantificación del ARN	22

V.2.4 Tratamiento con DNasa	22
V.2.5 Síntesis del ADNc	23
V.2.6 PCR en tiempo real	23
V.2.7 Purificación del producto de la PCR	24
V.2.8 Curva estándar externa	25
V.2.9 Cuantificación absoluta	25
V.2.10 Cuantificación relativa	25
V.2.11 Veces de activación	25
V.2.12 Análisis estadístico	26
VI. RESULTADOS	27
VI. 1 Verificación de cebadores y secuencia del amplicón	27
VI. 2 Estandarización de las condiciones de amplificación por PCR en tiempo real para el ADNc del receptor de serotonina 5-HT 2c	28
VI. 3 Cuantificación absoluta	33
VI. 4 Cuantificación relativa	35
VI. 5. Veces de activación	36
VII. DISCUSIÓN	38
VIII. CONCLUSIONES	42
IX. BIBLIOGRAFÍA	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación de la familia de receptores de serotonina	6
2	Programación general de ciclos para la PCR en tiempo real	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura anatómica de una sección del intestino	3
2	Síntesis de 5-hidroxitriptamina	5
3	Mecanismo de acción del receptor acoplado a proteína G	7
4	Desnaturalización del ADN por efecto del calor	11
5	Hibridación de los cebadores con la cadena molde de ADN	12
6	Incorporación de nucleótidos complementarios	13
7	Cinética de la reacción de amplificación	14
8	Curva de disociación de dos productos de la PCR con distintas temperaturas de disociación	15
9	Regresión lineal de una curva estándar	16
10	Cinética de la reacción de amplificación de un gen endógeno y un gen evaluado	17
11	Amplificación del fragmento del receptor de serotonina 5-HT 2c mediante una PCR <i>in silico</i> en el programa AmplifX	27
12	Curva de disociación del producto de amplificación del receptor de serotonina 5-HT 2c mediante PCR en tiempo real	29
13	Curva de disociación de los productos de amplificación del ADNc del receptor de serotonina 5-HT 2c a distintas concentraciones finales de MgCl ₂ en la mezcla de reacción	30
14	Curvas de disociación de los productos de amplificación con distintos tiempos de hibridación de los cebadores	31
15	Curvas de disociación de los productos amplificados del receptor de serotonina 5-HT 2c con diferentes concentraciones finales de cebadores en la mezcla de reacción	32

16	Curvas de disociación de los productos de amplificación únicos del receptor de serotonina 5-HT 2c y de la subunidad 18s ribosomal bajo las condiciones estandarizadas	33
17	Cinética de la reacción de amplificación de la curva estándar externa del receptor de serotonina 5-HT 2c	34
18	Cuantificación absoluta	35
19	Cuantificación relativa	36
20	Veces de activación del receptor de serotonina 5-HT 2c	37

RESUMEN

El sistema nervioso entérico (SNE), el cual es distinto del sistema nervioso central (SNC) y del sistema nervioso periférico (SNP), se localiza en el intestino. El SNE regula la función gastrointestinal, así como la secreción de sustancias tanto endócrinas como exócrinas y la microcirculación del tubo digestivo. La serotonina es un neurotransmisor secretado en el intestino por las células enterocromafines, la cual activa a sus receptores localizados en músculo liso, enterocitos y nervios, regulando la motilidad intestinal, la secreción de sustancias y la percepción sensorial. Estos receptores se clasifican en 7 familias del 5-HT 1 al 5-HT 7, denominadas numéricamente de acuerdo a la cronología de su descubrimiento, que a su vez se dividen en subfamilias con base en la homología de sus secuencias, la estructura del gen y las vías de señalización que activan. En este estudio se cuantifica la expresión del gen del receptor de serotonina 5-HT 2c en las regiones proximal y distal del intestino de rata adulta mediante PCR en tiempo real. Estos resultados contribuirán a la comprensión de la función del receptor de serotonina 5-HT 2c en distintas regiones del sistema nervioso entérico.

I. INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso entérico (SNE) se localiza en la pared del tubo digestivo, regula la función gastrointestinal con un elevado grado de autonomía respecto al sistema nervioso central (SNC) y controla la motilidad, la microcirculación del tubo digestivo y la secreción de sustancias tanto endócrinas como exócrinas.

Una de las moléculas más importantes en la regulación de la función del SNE es la serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT), que es una indolamina producto de la hidroxilación y posterior descarboxilación del aminoácido L-triptófano. El 95% de la serotonina corporal se encuentra en el tracto gastrointestinal, regulando la función del músculo liso en el aparato digestivo (90% en las células enterocromafines y 10% en las neuronas entéricas), y el 5% restante se encuentra en el cerebro y la sangre.

En el intestino, cuando la serotonina es liberada por las células enterocromafines, desencadena una diversidad de funciones motoras y sensoriales en el tracto gastrointestinal a través de neuronas del plexo submucoso y mientérico, como náuseas, vómitos, secreción intestinal y peristaltismo. Por lo tanto, su rol en la fisiología intestinal es muy importante.

La serotonina funciona como neurotransmisor a través de la activación de sus receptores, la mayoría de los cuales pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR por sus siglas en inglés), de la subclase de receptores activados por aminas biogénicas y están acoplados a distintos mecanismos de señalización transmembranal.

Existen varios subtipos de receptores de serotonina, clasificados en siete familias (5-HT 1 a 5-HT 7), denominadas numéricamente conforme a su descubrimiento. Se asocian de acuerdo a la homología de sus secuencias, la estructura del gen y las vías de señalización que activan. Los receptores de serotonina se acoplan por

medio de proteínas G a diversos sistemas efectores enzimáticos, a excepción del 5-HT₃ que funciona como canal iónico.

El receptor de serotonina 5-HT_{2c} ha sido estudiado en cerebro y se ha relacionado con la saciedad. En intestino no ha sido determinada su función fisiológica, aunque existen estudios que sugieren que estos receptores incrementan la motilidad gastrointestinal. En este trabajo se planteó cuantificar los niveles de la expresión génica del receptor de serotonina 5-HT_{2c} en las secciones proximal y distal del intestino delgado de rata adulta para aportar datos que sirvan para el mejor entendimiento de la función de este receptor en dicho tejido.

II. ANTECEDENTES

II.1 El Sistema nervioso entérico

El sistema nervioso entérico (SNE) se localiza en la pared del intestino y regula la función gastrointestinal con un elevado grado de autonomía respecto al sistema nervioso central (SNC). Controla la motilidad, secreciones endócrinas (como la serotonina), exócrinas y la microcirculación del tubo digestivo, aunque no está aislado totalmente, ya que es influenciado por el sistema nervioso autónomo (SNA).

El SNE es muy extenso, tiene de 10^7 a 10^8 neuronas y la diversidad fenotípica de sus neuronas es muy variada, carece de colágeno interno y su soporte deriva de la glía entérica. Las neuronas del SNE se agrupan en pequeños ganglios unidos por tractos de fibras nerviosas formando el plexo mientérico de Auerbach y el plexo submucoso de Meissner (Flórez, 2003). En la Figura 1 se muestra la anatomía de la pared intestinal donde se observan los plexos mientérico y submucoso (Venegas y col., 2007).

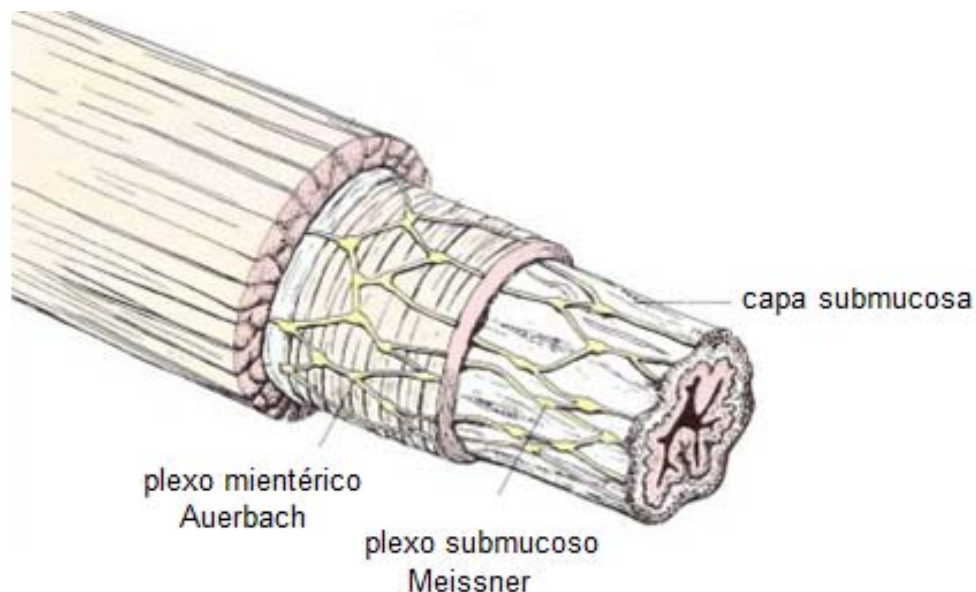


Figura 1. Estructura anatómica de una sección del intestino (modificada de Venegas y col., 2007).

Se han identificado en el SNE varios neurotransmisores y neuromoduladores, que también están presentes en SNC, entre ellos la serotonina, que es una molécula importante de señalización en el intestino y tiene como blanco a enterocitos, neuronas del músculo liso y neuronas entéricas (Sikander y col., 2009). Este neurotransmisor juega un papel crítico en la regulación de la motilidad gastrointestinal, secreciones y sensaciones, mediante la activación de sus receptores expresados en fibras neurales y músculo liso (Zhao y col., 2003; Moskwa y Boznanska, 2007).

La liberación de serotonina es una de las causas por las que el intestino es el único órgano que muestra reflejos y actividad neural integradora de manera independiente al SNC (Gershon, 2004).

El estímulo sobre la mucosa o la distensión mecánica de la pared produce una liberación de serotonina que estimula a las neuronas aferentes, éstas activan interneuronas colinérgicas y por último neuronas motoras excitatorias que provocan la contracción del músculo por encima del punto de estímulo. Al mismo tiempo, por debajo de este punto, las interneuronas colinérgicas activan motoneuronas inhibitorias, produciendo relajación (Córdova, 2003).

II.2 Serotonina

II.2.1 Biosíntesis y función

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) es una amina biógena compuesta por un anillo indólico y una cadena lateral etilamino, la cual fue aislada e identificada en plasma en 1948 y en el tejido enterocromafin del intestino en 1952. Se sintetiza a partir del aminoácido L-triptófano que proviene de la dieta y es captado por la célula. Este aminoácido sufre un proceso de hidroxilación mediante la triptófano hidroxilasa (TH) en el C5 del anillo indólico que lo convierte en 5-hidroxitriptófano (5-HTP), el cual después es descarboxilado en la cadena lateral mediante la L-

aminoácido aromático-descarboxilasa (LAAD), formando la 5-HT (Flórez, 1997). En la Figura 2 se muestra la síntesis de 5-HT a partir de L-triptófano.

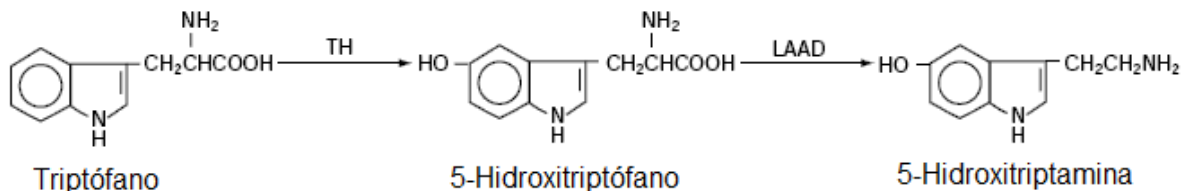


Figura 2. Síntesis de 5-hidroxitriptamina (Flórez, 1997).

En cerebro, las neuronas serotoninérgicas sintetizan, almacenan y liberan serotonina, la cual participa en funciones como sueño, estado de ánimo, regulación de la temperatura, percepción del dolor, regulación de la presión arterial, vómito y apetito (Katzung, 2007). Mientras que en el intestino es secretada y liberada por las células enterocromafines que a su vez funcionan como transductores de sensaciones y activan procesos en las neuronas aferentes primarias tanto extrínsecas como intrínsecas.

II.3 Receptores de serotonina

Los receptores son estructuras macromoleculares de naturaleza proteica que se encuentran en las membranas celulares, citoplasma y núcleo, los cuales tienen la función de reconocer al ligando e iniciar una cascada de señalización (Taleisnik, 2006). La acción de la serotonina desencadena una cascada de señalización a través de una superfamilia de receptores, clasificada en siete familias, designadas numéricamente 5-HT 1 a 5-HT 7 conforme fueron reconocidas, que a su vez, se clasifican en subfamilias con base en la homología de su secuencia, la estructura del gen y las vías de señalización en que están involucrados. Seis de las familias de receptores de serotonina están acopladas a proteínas G y una es un canal iónico dependiente de ligando (Katzung, 2007). En el Cuadro 1 se muestra la clasificación de las familias de receptores de serotonina, su localización y su efecto (modificado de Dezi, 2007).

Cuadro 1. Clasificación de familias de receptores de serotonina (modificado de Dezi, 2007).

Familia de receptor	Localización	Proteína G	Proteína efectora	Efecto
5-HT 1	Núcleo del rafé Sustancia nigra Ganglios basales	G _i / G _o	Adenilato ciclasa	Inhibición de la adenilato ciclasa
5-HT 2	Corteza frontal Plaquetas Tracto gastrointestinal	G _q	Fosfolipasa C Fosfolipasa A2	Liberación de Ca ²⁺
5-HT 3 Canal iónico dependiente de ligando	Tracto gastrointestinal Área postrema	No acoplado a proteínas G	Na ⁺ / K ⁺	Mayor concentración de Na ⁺ y K ⁺
5-HT 4	SNC Corazón Tracto gastrointestinal	G _i / G _o / G _s	Adenilato ciclasa	Activación de la adenilato ciclasa
5-HT 5	SNC	G _i / G _o	Adenilato ciclasa Fosfolipasa C	Inhibición de la adenilato ciclasa
5-HT 6	Ganglios basales	G _s	Adenilato ciclasa	Activación de la adenilato ciclasa
5-HT 7	SNC, vasos sanguíneos	G _s	Adenilato ciclasa	Activación de la adenilato ciclasa

El mecanismo de acción de los receptores de serotonina acoplados a proteínas G se lleva a cabo mediante la interacción con proteínas unidas a GTP que desencadenan cascadas de señalización intracelular, de esta forma, modulan los cambios en los niveles de mensajeros intracelulares y en la actividad de los canales iónicos (Hurley y col., 2003).

La proteína G es un heterotrímero constituido por una subunidad alfa (α) con actividad GTPasa y un dímero formado por las subunidades beta (β) y gamma (γ). En su forma inactiva, las tres subunidades están juntas formando un heterotrímero y el sitio de

fijación del guanilil nucleótido está ocupado por el GDP. La fijación del ligando al receptor hace que el complejo ligando-receptor se asocie a la proteína G y la active. En la proteína G activada el GDP es desplazado de la subunidad α , por un mecanismo dependiente de Mg^{2+} y su lugar es ocupado por el GTP; el complejo α -GTP se disocia del complejo $\beta\gamma$ y se une a la proteína efectora y la activa. Esta activación es muy breve porque el GTP es hidrolizado por la GTPasa para convertirlo en GDP, con lo que pierde su capacidad de asociarse y actuar sobre el sistema efector, y vuelve a reagruparse con el complejo $\beta\gamma$. En la Figura 3 se muestra el mecanismo de acoplamiento entre el receptor asociado a proteína G, la proteína G y el sistema efector

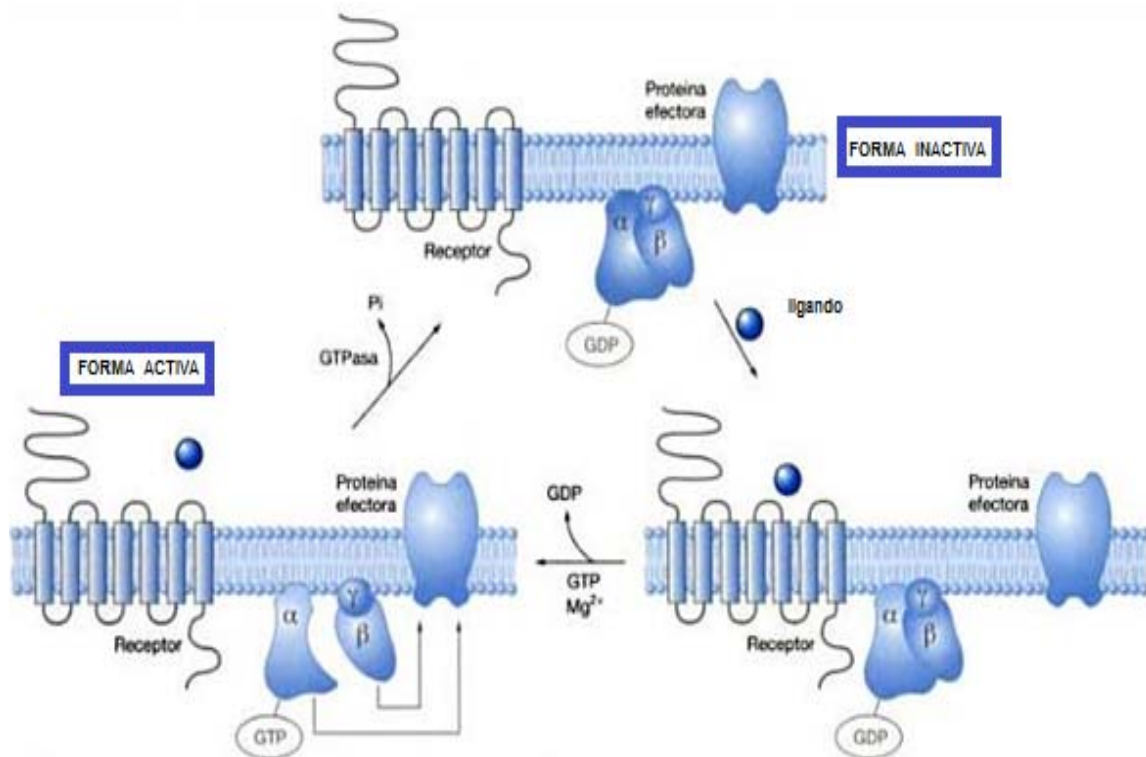


Figura 3. Mecanismo de acción del receptor acoplado a proteína G (modificada de Flórez, 2003).

La subunidad α y el dímero $\beta\gamma$ por separado pueden actuar sobre diferentes efectores, tales como la adenilato ciclasa, las fosfodiesterasas, la fosfolipasa C o los canales iónicos, activando cascadas de señalización intracelular (Flórez, 2003).

Una gran parte de los subtipos de los receptores de serotonina conocidos actualmente se han identificado en el tracto gastrointestinal de mamíferos (Briejer y col., 1997), donde se produce la mayor parte de la serotonina, la cual desempeña varias funciones en este sitio debido a que distintos tipos celulares gastrointestinales, como nervios entéricos, músculo liso, células intersticiales de Cajal y neuronas entéricas, expresan uno o varios tipos de receptores de serotonina (Wouters y col., 2007).

La activación de los receptores de serotonina se ha asociado con la relajación del tracto gastrointestinal, sobre todo las familias de los receptores de serotonina 5-HT 1 y 5-HT 7, mientras que la activación de algunos integrantes de las familias de los receptores de serotonina 5-HT 2, 5-HT 3 y 5-HT 4 estimulan la contracción del músculo liso del tracto gastrointestinal (Briejer y col., 1997).

II.4 El receptor de serotonina 2c

La familia de receptores 5-HT 2 fue una de las primeras en ser identificadas. Desde 1954 había evidencia de que existían subtipos de los receptores de 5-HT 2, de los cuales se han identificado 3 subtipos diferentes (Gaddum y Hammed, 1954; Gaddum y Picarelli, 1957; Peroutka y Snyder, 1979; McKenna y Repke, 1990; Kursar y Nelson, 1994), y actualmente se clasifican en 5-HT 2a, 5-HT 2b y 5-HT 2c (Baxter y col. 1995). Los tres subtipos son receptores de 7 dominios transmembranales acoplados a la proteína G_q .

El receptor de serotonina 5-HT 2c se ha localizado en corteza cerebral, plaquetas y tracto gastrointestinal. La estimulación de estos receptores produce la activación de la fosfolipasa C e incremento del inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), los cuales inducen el aumento de calcio intracelular y median varios procesos celulares (Dezi, 2007).

En general, los receptores 5-HT 2 son reguladores de crecimiento y estimulación celular (Hurley y col., 2003). Sin embargo, se ha probado que en el sistema

cardiovascular provocan la contracción del músculo liso y en el aparato gastrointestinal es un estimulante del músculo liso, lo que aumenta el tono y facilita el peristaltismo (Briejer y col., 1997).

En cerebro se ha reportado que el receptor de serotonina 5-HT 2c está involucrado en desórdenes tales como la esquizofrenia. Por otro lado, se probó en este mismo órgano que agonistas selectivos del receptor de serotonina 5-HT 2c pueden ser utilizados como agentes efectivos anti-obesidad (Bickerdike, 2003). Sin embargo, en intestino no se ha descrito completamente su función fisiológica, por lo que el análisis comparativo de los niveles de expresión en distintas regiones del intestino de rata adulta mediante la PCR en tiempo real, aportaría datos que ayuden a entender dicha función en el intestino.

II.5 PCR en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final es una técnica diseñada con base en el principio de la replicación del ADN, la cual se utiliza para sintetizar una secuencia específica de ADN *in vitro* y consta de 3 fases: desnaturalización, amplificación y elongación.

La técnica de PCR requiere de modificaciones cíclicas de temperaturas, ya que cada fase necesita de una temperatura específica para llevarse a cabo. Debido a que los cambios en la temperatura y el tiempo que se mantienen son factores críticos para la PCR, se utiliza un termociclador, que es un instrumento que automáticamente controla y alterna las temperaturas durante tiempos y ciclos programados.

La PCR en tiempo real es una variante de la PCR punto final, en la que la adición de marcadores nos permite detectar y cuantificar el producto sintetizado en tiempo real (Bustin y col., 2005). Una de sus aplicaciones es la detección de cambios en la expresión génica, ya que al ser cuantitativa, nos permite determinar los niveles de ARNm de cualquier gen de interés en las condiciones de estudio.

Existen dos clases principales de marcadores utilizados para detectar y cuantificar los productos amplificados durante la PCR en tiempo real: específicos y no específicos.

Los marcadores específicos emplean sondas de ácidos nucleicos que se unen a amplicones específicos. La mayoría utiliza el fenómeno de transferencia de energía entre fluorocromos (FRET por sus siglas en inglés) para emitir señales fluorescentes, captadas por el termociclador a medida que se va formando el producto. Entre sus ventajas están la precisión, análisis rápido y directo; pero su mayor desventaja es el diseño correcto de las sondas ya que está implicado directamente en la eficiencia de la interacción con el amplicón.

Los marcadores no específicos usan colorantes fluorescentes que se intercalan en las dobles cadenas de ADN durante la PCR. Una vez que el colorante se une a la doble cadena, emite una señal fluorescente que es detectada por el equipo. Así el aumento en la síntesis del producto de la PCR es proporcional a la fluorescencia detectada en cada ciclo de elongación. Dentro de los colorantes, el más utilizado es SYBR Green I, el cual no necesita un diseño experimental adicional ya que no reconoce una secuencia específica para intercalarse en la doble cadena de ADN. La principal desventaja de estos colorantes es que se unen a cualquier secuencia de doble cadena, emitiendo una señal fluorescente tanto para productos específicos como para inespecíficos. El SYBR Green no emite fluorescencia mientras está en solución, únicamente cuando está intercalado en la doble cadena de ADN (Vinueza, 2009).

Para llevar a cabo una cuantificación mediante la PCR en tiempo real se realiza una modificación del protocolo de la PCR punto final, adicionando una fase previa a la amplificación para la activación de la enzima y una fase posterior a la amplificación denominada curva de disociación.

La primera fase de la reacción es la desnaturalización, consta de un solo ciclo en el que se aumenta la temperatura hasta 95°C, la cual se mantiene por 10 minutos. Su

objetivo es la desnaturalización de la doble cadena de ADN y la activación de la ADN polimerasa.

La segunda fase es la amplificación y consta de 3 ciclos continuos que se repiten de 30 a 50 veces dependiendo de la cantidad inicial de ADN. Estos tres ciclos son: desnaturalización, hibridación de los cebadores y elongación.

La desnaturalización consiste en la elevación y mantenimiento de la temperatura a 95°C durante 10-15 segundos para separar la doble cadena de ADN en dos cadenas sencillas. Esto sucede puesto que los enlaces del hidrógeno que unen las bases de una a otra cadena son débiles y se rompen a altas temperaturas, mientras que los enlaces entre fosfatos y desoxirribosa, que son enlaces covalentes más fuertes, permanecen intactos. En la Figura 4 se muestra la desnaturalización de la doble cadena de ADN por efecto del aumento de la temperatura.

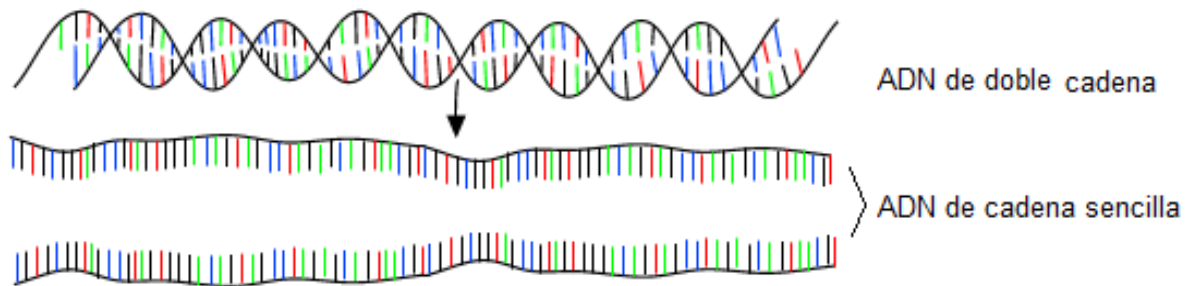


Figura 4. Desnaturalización del ADN por efecto del calor (modificada de Vierstraete, 1999).

La hibridación de cebadores es la unión de estas secuencias sintéticas de nucleótidos con la secuencia molde específica de ADN, tanto en sentido como en antisentido, limitando de esta manera la región que se va a amplificar. Esta interacción entre secuencias complementarias se promueve con la modificación de la temperatura (entre 40°C y 65°C) a la cual se hibridan los cebadores con la secuencia molde de ADN, dependiendo de la longitud y la secuencia de bases de

los cebadores. Tanto la temperatura como el tiempo que debe mantenerse la misma, permite que los cebadores se unan a la secuencia molde con alta especificidad generando una región de ADN de doble cadena que es necesario para que la ADN polimerasa lo reconozca como sitio de iniciación de la elongación. En la Figura 5 se muestra la hibridación de los cebadores: sentido y antisentido con la secuencia molde de ADN.

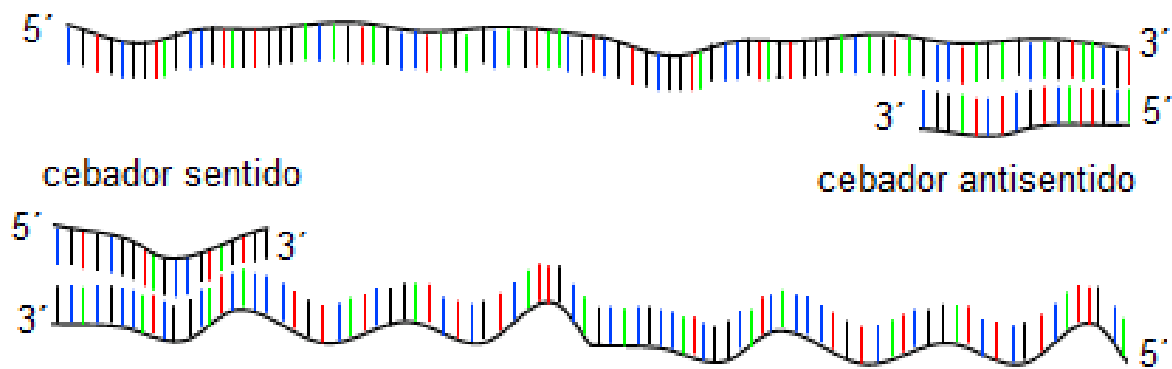


Figura 5. Hibridación de los cebadores con la cadena molde de ADN (modificada de Vierstraete, 1999).

El tercer ciclo es la elongación, durante este proceso se sintetizan dos nuevas moléculas de ADN de doble cadena, ambas idénticas a la original, mediante la unión de nucleótidos complementarios a la cadena molde por la acción de la ADN polimerasa, la cual tras reconocer la región de ADN-cebadores de doble cadena, comienza la polimerización a 72°C. El producto sintetizado se denomina amplicón (Roche, 2011). La Figura 6 muestra la incorporación de estos nucleótidos a la cadena molde de ADN.

Durante la fase de amplificación, dado que se adicionó SYBR Green, obtenemos de manera gráfica la cinética de la reacción de amplificación en tiempo real. El comportamiento de la reacción está constituida por tres fases: la fase basal, en la que la fluorescencia no presenta cambios significativos dado que el producto amplificado no rebasa los límites de detección; la fase logarítmica de amplificación, en la que se sintetiza exponencialmente el producto produciendo un aumento de la

fluorescencia proporcional a la cantidad de amplicón generado; y finalmente, la fase de plateau o fase de saturación, en la que ya sea por una disminución en la actividad de la ADN polimerasa o por la limitación de alguno de los reactivos, se restringe la síntesis del amplicón.

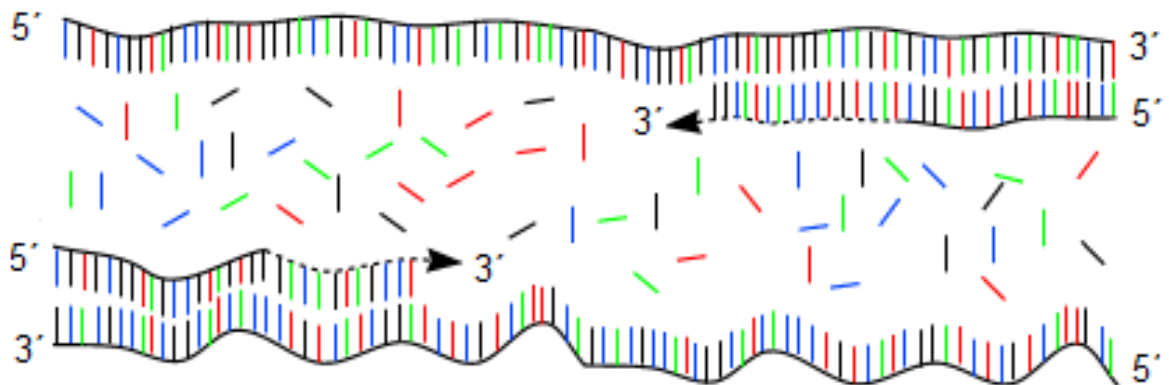


Figura 6. Incorporación de nucleótidos complementarios (modificada de Vierstraete, 1999).

El punto de inflexión entre la fase basal y la fase logarítmica se denomina punto de cruce (PC) y representa el punto crítico en el que la reacción se estabiliza y comienza una síntesis del producto de manera exponencial, por lo tanto, el equipo comienza a detectar un aumento en la fluorescencia proporcional al producto generado (Ruíz, 2010). En la Figura 7 se presenta la cinética de la reacción de amplificación donde se denotan sus diferentes fases.

La última fase denominada curva de disociación nos indica la temperatura a la cual se disocia por completo el producto sintetizado durante la fase de amplificación y consta de tres pasos: desnaturalización, hibridación y disociación.

El primer paso es la desnaturalización, en el que se eleva la temperatura a 95°C y se mantiene por 1 segundo para que el producto sintetizado durante la amplificación se desnaturalice por completo, el SYBR Green que se había intercalado en la doble cadena sintetizada es liberado, por lo tanto, el equipo detecta una pérdida total de la fluorescencia.

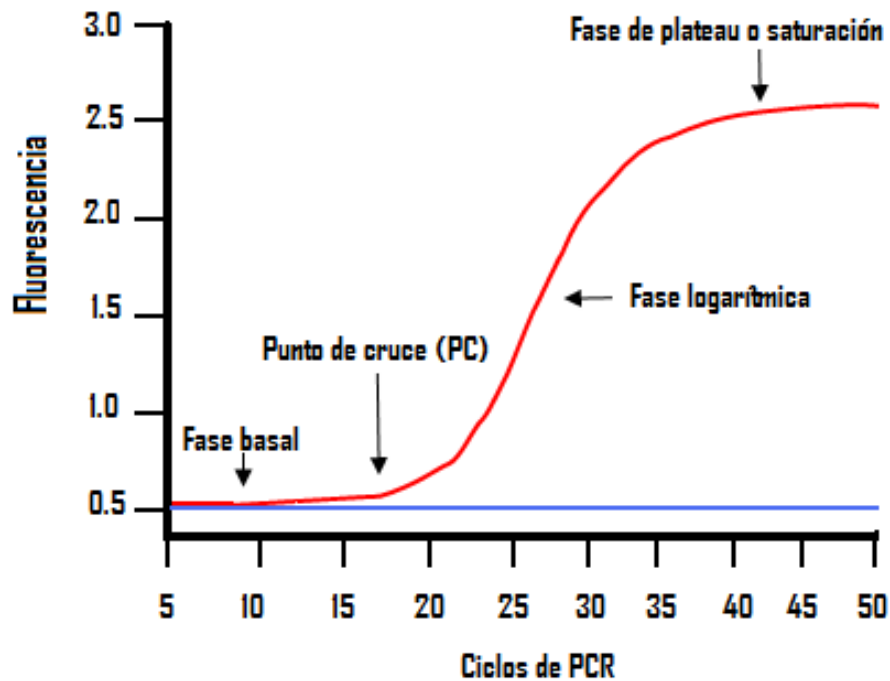


Figura 7. Cinética de la reacción de amplificación.

Posteriormente, comienza el proceso de hibridación, en el que se disminuye la temperatura a 65°C y se mantiene por 15 segundos, promoviendo la re-naturalización del ADN en doble cadena. En este proceso en contraparte al proceso anterior se obtiene un máximo de fluorescencia debido a que el SYBR Green se intercala en la doble cadena de ADN.

El último paso es la disociación, en el que se eleva la temperatura paulatina y constantemente desde 65°C hasta 95°C con una rampa de 0.1°C/segundo. En esta fase el producto sintetizado durante la amplificación se desnaturaliza, liberando al SYBR Green, lo que produce una pérdida de fluorescencia detectada de manera continua por el equipo. La derivada de la fluorescencia contra la temperatura se grafica obteniendo un área bajo la curva que representa el producto amplificado, en esta misma gráfica se muestra la temperatura a la cual se pierde completamente la fluorescencia, es decir, la temperatura de disociación del amplicón. En la Figura 8 se muestran dos curvas de disociación de amplicones distintos, denotando diferentes temperaturas de disociación.

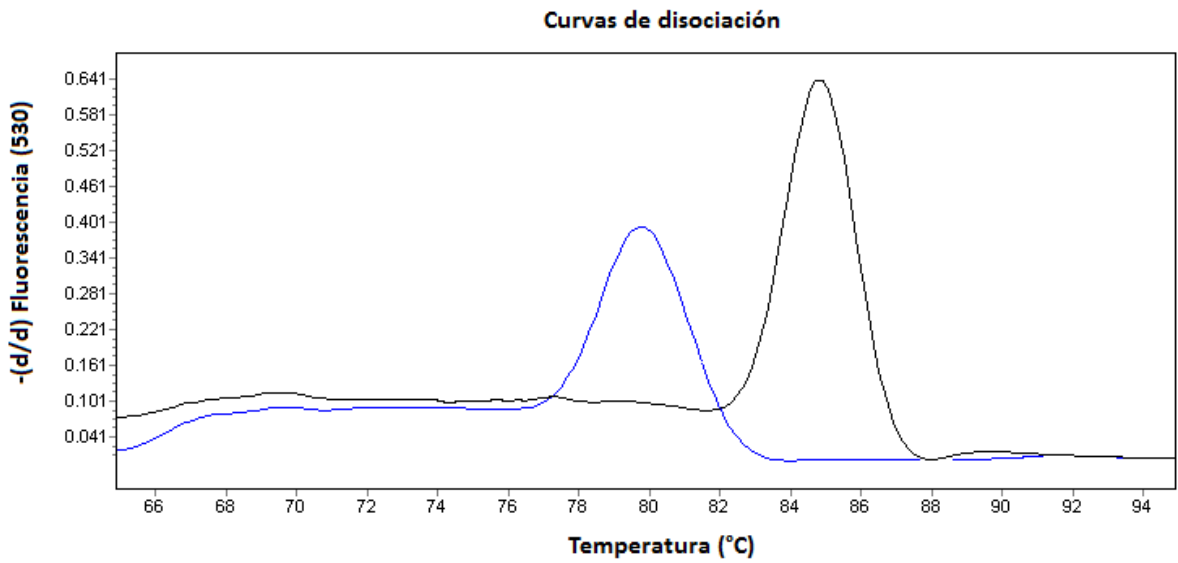


Figura 8. Curva de disociación de dos productos de la PCR con distintas temperaturas de disociación.

II.5.1 Cuantificación absoluta

Uno de los procesos mediante el cuál se calcula la cantidad de ADN o ARN presente en la muestra es la cuantificación absoluta. En esta cuantificación se relacionan los puntos de cruce (PC) de las muestras con los PC de una curva estándar externa (Vinueza, 2009).

Para la obtención de la curva estándar externa se parte de una concentración conocida de ADN o ARN y se preparan diluciones seriadas con diferencia de un orden de magnitud, mismas que posteriormente son amplificadas en las condiciones establecidas para el gen de estudio. Es importante calcular la eficiencia de la reacción (E) de la curva estándar, ya que los datos serán válidos solamente si la eficiencia obtenida oscila entre 1.8 y 2.0. La fórmula utilizada para calcularla es: $E=1^{-1/m}$ donde m es el valor de la pendiente de la ecuación de recta de la curva estándar.

Una vez concluida la reacción de amplificación de la curva estándar, se obtienen los PC de las diluciones, los cuales se grafican en el eje de las ordenadas frente al logaritmo de su concentración en el eje de las abscisas, con el objetivo de obtener

la regresión lineal y, posteriormente, calcular la ecuación de la recta, que será utilizada para sustituir los valores de los PC de las muestras problemas y así tener su concentración. En la Figura 9 se muestra un ejemplo de la regresión lineal de una curva estándar.

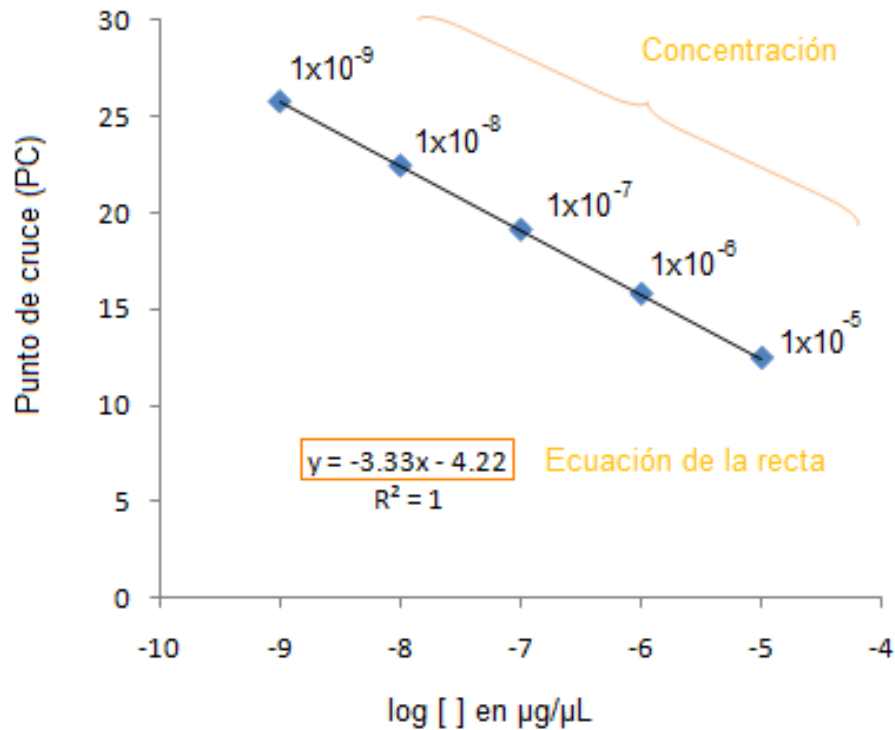


Figura 9. Regresión lineal de una curva estándar.

II.5.2 Cuantificación relativa

La cuantificación relativa se utiliza para obtener la relación de los cambios en los niveles de expresión del gen estudiado en comparación con un gen de referencia (Pfaffl, 2004). La cuantificación relativa se calcula comparando el cociente de los niveles de expresión del gen evaluado frente a la expresión del gen de referencia.

En la Figura 10, se muestra un ejemplo de la cinética de la reacción de amplificación de dos muestras tratadas diferencialmente, donde se observa que independientemente del tratamiento la amplificación del gen endógeno se

conserva, mientras que los niveles del gen evaluado varían dependiendo del tratamiento.

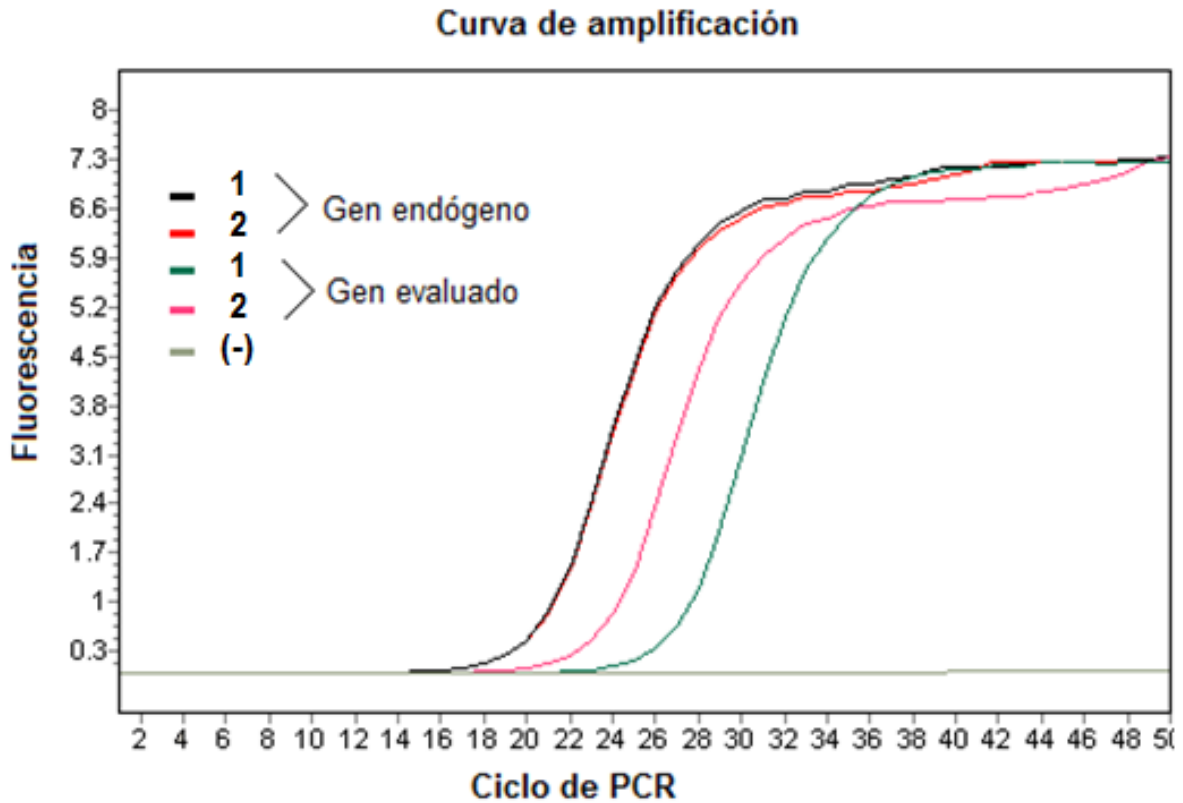


Figura 10. Cinética de la reacción de amplificación de un gen endógeno y un gen evaluado.

II.5.3 Veces de activación

El cálculo de las veces de activación es una representación gráfica de los resultados de la cuantificación relativa comparando los datos obtenidos con un valor de referencia seleccionado arbitrariamente. Este valor puede ser una de las muestras, un control de tratamiento o una unidad arbitraria. A este dato se le denomina con un valor unitario y todos los valores de las muestras evaluadas se refieren a él.

HIPÓTESIS

Las variaciones en los niveles de expresión del gen que codifica para el receptor de serotonina 5-HT_{2c} son dependientes de la región del intestino de la rata.

III. OBJETIVOS

IV.1 General

Cuantificar los niveles de expresión del gen que codifica para el receptor de serotonina 5-HT 2c en diferentes regiones del intestino de rata.

IV.2 Específicos

- Extraer el ARN total de las secciones proximal y distal del intestino de rata adulta.
- Sintetizar el ADNc a partir del ARN total del intestino de rata.
- Establecer las condiciones óptimas para la amplificación por PCR en tiempo real del ADNc del receptor de serotonina 5-HT 2c en diferentes regiones del intestino de rata adulta.
- Determinar mediante una cuantificación absoluta los niveles de expresión del gen endógeno *18s ribosomal* en intestino de rata adulta.
- Evaluar mediante una cuantificación absoluta los niveles de expresión del gen que codifica para el receptor de serotonina 5-HT 2c en diferentes regiones del intestino de rata adulta.
- Obtener la cuantificación relativa de los niveles de expresión del gen que codifica para el receptor de serotonina 5-HT 2c normalizando sus valores con los valores del gen endógeno *18s ribosomal*.
- Calcular las veces de activación del gen que codifica para el receptor de serotonina 5-HT 2c en diferentes regiones del intestino de rata adulta.

IV. METODOLOGÍA

V.1 Materiales y reactivos

V.1.1 Material biológico

Se utilizan ratas Sprague Dawley, a las que se les mantiene con agua y alimento *ad libitum* en ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Los animales se anestesian con pentobarbital sódico vía intraperitoneal, para posteriormente ser decapitados. Se disecan las secciones proximal (IPA), y distal (IDA) del intestino delgado, de 3 machos adultos. Los tejidos se lavan con PBS e inmediatamente se congelan con nitrógeno líquido para evitar la degradación de los ácidos nucleicos y se almacenan a -70°C .

V.1.2 Materiales y equipo

- Lentes de seguridad
- Guantes
- Mortero de porcelana con pistilo
- Termo para nitrógeno líquido
- Tubos Falcon de 15 ml y 50 ml
- Tubos eppendorf de 1.5 ml y 2.0 ml
- Gradillas
- Vórtex
- Espectrofotómetro
- Microcentrífuga
- Refrigerador (4°C)
- Congelador (-20°C)
- Ultracongelador
- Micropipetas
- Puntas para micropipeta con filtro
- Capilares

- Termomezclador
- Incubadora
- Termociclador

V.1.3 Reactivos

- Nitrógeno líquido (INFRA)
- Hielo seco
- Trizol (Invitrogen)
- Cloroformo (E.M Science)
- Etanol (J.T. Baker)
- DNasa (Invitrogen)
- Cebadores degenerados (Invitrogen)
- Cebadores sentido y antisentido para 5-HT 2c y 18s ribosomal (Invitrogen)
- Mezcla maestra para PCR con SYBR Green (Roche)
- Kit para la purificación de ARN (Qiagen)
- Kit para la retrotranscripción (Qiagen)
- Kit para la purificación del producto de PCR (Qiagen)

V.2 Métodos

V.2.1 Extracción del ARN

El tejido congelado se pulveriza en el mortero utilizando nitrógeno líquido para evitar la degradación de los ácidos nucleicos. Se pesa el tejido y posteriormente se agrega 1 mL de trizol por cada 100 mg de tejido. Después de agitar la mezcla con el vórtex, se deja incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se agregan 200 μ L de cloroformo por cada 1 mL de trizol. La mezcla se deja reposar 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga por 20 minutos a 8,000 rpm a 4°C. Se recupera el sobrenadante y se transfiere a un tubo limpio, agregando etanol absoluto frío en una proporción 1:1 v/v respecto a la cantidad de sobrenadante recuperado.

V.2.2 Purificación del ARN

La purificación del ARN obtenido se hace con las columnas de sílica gel contenidas en el kit para la purificación de ARN de Qiagen. Se hace pasar la mezcla de ARN-etanol por las columnas. Se centrifuga 1 minuto a 8,000 rpm y se descarta el líquido eluído. Este paso se repite cuantas veces sea necesario hasta haber pasado la totalidad de la mezcla de ARN-etanol. Se realiza un lavado con 700 μ L de la solución RW1 (etanol e isotiocianato de guanidina). Posteriormente, se hacen dos lavados con 500 μ L de la solución RPE (mezcla de etanol y agua). Después se centrifuga 2 minutos a 8,000 rpm para eliminar residuos de etanol. Finalmente se eluye con 40 μ L de agua, colocando la columna en un tubo limpio y centrifugando nuevamente para recuperar el producto de elución, el cual se almacena a -70°C .

V.2.3 Cuantificación del ARN

La cuantificación del ARN obtenido se realiza midiendo en un espectrofotómetro a tres longitudes de onda: 230, 260 y 280 nm. A estas longitudes de onda los compuestos orgánicos, los ácidos nucleicos y proteínas respectivamente tienen su máxima absorbancia. Para determinar la pureza del ARN, respecto a contaminantes proteicos, se calcula la relación $A_{260/280}$. Mientras que para conocer la pureza respecto a contaminantes orgánicos se utiliza la relación $A_{260/230}$. El ratio ideal es de 1.8 a 2.0, lo cual indica un alto grado de pureza.

V.2.4 Tratamiento con DNasa

Se elimina el ADN en la muestra, sometiendo el ARN purificado en la columna a digestión enzimática con DNasa. La mezcla de reacción consiste en 1X de solución amortiguadora DNasa, 0.5 unidades de DNasa I y 1 μ g de ARN total, llevando a un volumen final de 10 μ L con agua. Se incuba por 10 minutos a 37°C ; posteriormente, se adiciona 1 μ L de EDTA 25 mM (ácido etilendiaminotetraacético), y 1 μ M de cebadores degenerados (concentración final). Se calienta 10 minutos a 65°C e inmediatamente se coloca en hielo.

V.2.5 Síntesis del ADNc

La síntesis del ADNc (ADN complementario) a partir del ARN obtenido, se realiza utilizando el kit para retrotranscripción de Qiagen. La mezcla de reacción se prepara a una concentración final de 0.5 mM de desoxinucleótidos (dNTPs), 4 unidades de enzima transcriptasa reversa (TR), 1X de solución amortiguadora TR y 10 unidades de inhibidor de RNasas, y se lleva a un volumen final de 20 μ L, se incuba por 2 horas a 37°C y, posteriormente, se almacena a 4°C.

V.2.6 PCR en tiempo real

La síntesis de ADN a partir del ADNc por la técnica de PCR en tiempo real, se realiza a partir de la mezcla de reacción que incluye una concentración final de 1X solución amortiguadora, 2 μ M de cebadores sentido y antisentido (5-HT 2c: 5' TTC TTA ATG TCC CTA GCC ATT GC 3' y 5' GCA ATC TTC ATG ATG GCA TTA GT 3' y 18s ribosomal: 5' GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT 3' y 5' CCA TCC AAT CGG TAG TAG 3'), 4 mM de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), 1 μ L de ADNc y se ajusta a un volumen final de 10 μ L con agua.

En el Cuadro 2 se muestra la programación del termociclador que se utiliza para las pruebas de amplificación por PCR en tiempo real.

V.2.7 Purificación del producto de PCR

El producto de PCR se purifica utilizando las columnas de sílica incluidas en el kit de Qiagen. Por cada 100 μ L de producto se adicionan 300 μ L de solución amortiguadora PG (isopropanol y solución amortiguadora) y 100 μ L de isopropanol. Se hace pasar la mezcla por las columnas de sílica y se centrifuga 1 minuto a 12,000 rpm. Se descarta el líquido eluído y se lava la columna con 700 μ L de solución PE (etanol e isotiocianato de guanidina), se centrifuga 1 minuto a 12,000 rpm. Se descarta el líquido eluído y se centrifuga la columna para eliminar cualquier

residuo de etanol. Finalmente, se eluye con 40 μL de agua que se recuperan en un tubo limpio tras la centrifugación por 1 minuto a 13,000 rpm.

Cuadro 2. Programación general de ciclos para la PCR en tiempo real.

Modo de análisis	Ciclos	Fase	Temperatura	Tiempo	Modo de adquisición
Desnaturalización					
Ninguno	1		95°C	10-15 min	Ninguno
Amplificación					
Cuantificación	50	Desnaturalización	95°C	15 s	Ninguno
		Hibridación	(a)	(b)	Ninguno
		Elongación	72°C	(c)	Simple
Curvas de disociación					
Curvas de disociación	1	Desnaturalización	95°C	0s	Ninguno
		Hibridación	65°C	15s	Ninguno
		Disociación	95°C	0s	Continuo
Frío					
Ninguno	1		40°C	30s	Ninguno

- (a) Depende de la temperatura de hibridación de los cebadores.
 (b) Depende del tiempo de hibridación de los cebadores.
 (c) Depende del tamaño del amplicón.

V.2.8 Curva estándar externa

Para obtener la curva estándar externa se realizan diluciones seriadas a partir de concentraciones conocidas de ADNc de 5-HT 2c y 18s ribosomal, sintetizado a partir de ARN de corteza de rata. Las diluciones utilizadas en este estudio fueron de 1×10^{-5} a 1×10^{-8} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Posteriormente, se amplifica cada dilución por duplicado mediante PCR en tiempo real para obtener sus puntos de cruce (PC).

V.2.9 Cuantificación absoluta

Una vez obtenidos los PC de las diluciones de las curvas estándar de 5-HT 2c y 18s ribosomal, se grafica el logaritmo de la concentración de las diluciones frente al valor de sus PC. A partir de la gráfica obtenida se obtiene la regresión lineal y la ecuación de la recta. Esta ecuación se utiliza para calcular las concentraciones de las muestras problema interpolando los valores de los PC obtenidos de la amplificación de cada sección del intestino (proximal y distal) de rata adulta.

V.2.10 Cuantificación relativa

La cuantificación relativa se obtiene al comparar el nivel de expresión del receptor de serotonina 5-HT 2c respecto al nivel de expresión del 18s ribosomal en cada muestra, para obtenerla se calcula el cociente de la concentración del 5-HT 2c frente a la concentración del 18s ribosomal para cada muestra.

V.2.11 Veces de activación

Se asignó arbitrariamente el valor de una unidad al promedio de la concentración del receptor de serotonina 5-HT 2c en intestino proximal de rata adulta. Cada concentración obtenida se refirió a este valor arbitrario para calcular las veces de activación.

V.2.12 Análisis estadístico

El análisis de los datos obtenidos en los experimentos se realiza en el programa estadístico Origin 8.5.1, a través de un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una prueba *post-hoc* de Tukey, considerando como diferencia significativa una $p < 0.05$.

V. RESULTADOS

VI.1 Verificación de cebadores y secuencia del amplicón

La verificación de los cebadores, utilizados en este estudio, para cuantificar la expresión del receptor de serotonina 5-HT 2c, se realizó mediante la búsqueda de sus sitios de hibridación sobre la secuencia obtenida de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés), con número de referencia: NM_012765.

Se utilizó el programa AmplifX para realizar una PCR *in silico* con la secuencia NM_012765 y la secuencia de los cebadores para el receptor de serotonina 5-HT 2c. El resultado se muestra en la Figura 11, en donde se observa un único amplicón de 257 pb, el porcentaje de guaninas-citosinas de 46 y se sugiere una temperatura de hibridación de los cebadores de 55.2 °C.

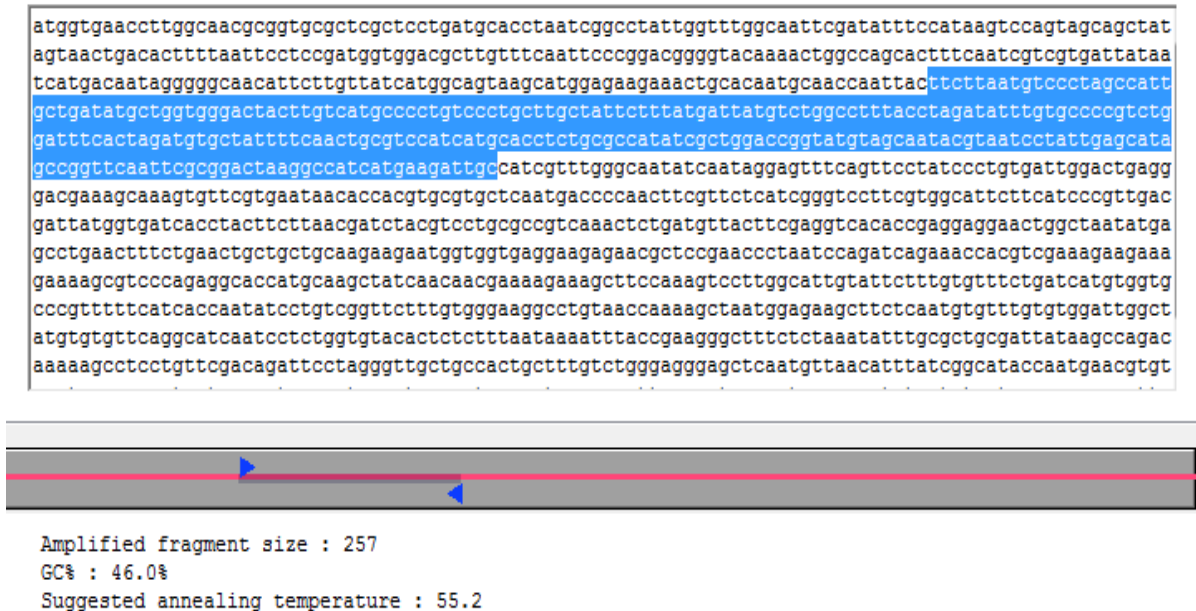


Figura 11. Amplificación del fragmento del receptor de serotonina 5-HT 2c mediante una PCR *in silico* en el programa AmplifX.

VI. 2 Estandarización de las condiciones de amplificación por PCR en tiempo real para el ADNc del receptor de serotonina 5-HT 2c

La optimización de las condiciones de amplificación de un único producto del ADN del gen de interés depende de varios parámetros, tanto en la mezcla de reacción como en el programa de amplificación.

Por tal razón, se comenzó realizando pruebas de amplificación del ADNc del receptor de serotonina 5-HT 2c con el fin de estandarizar las condiciones óptimas para amplificar el fragmento deseado. La temperatura de hibridación de los cebadores iniciales se eligió con base a la temperatura teórica de hibridación de los cebadores de 5-HT 2c (55 °C) sugerida por el programa AmplifX; mientras que las concentraciones de cebadores (0.2 μ M) y de MgCl₂ (4 mM) se seleccionaron por consenso tomando en cuenta la estandarización de otros genes amplificados en el laboratorio donde se realizó este trabajo. Tras la amplificación se analizaron las curvas de disociación, las cuales mostraron la presencia de varios productos inespecíficos, por lo cual se decidió probar modificaciones hasta encontrar las condiciones ideales de amplificación.

Se probó modificar la temperatura de hibridación de los cebadores en una rampa comprendida entre 57 y 71°C con el objeto de aumentar la especificidad de hibridación de los cebadores por la secuencia del ADNc. Se observa mediante la comparación de las curvas de disociación de los diferentes ensayos, que a una temperatura de 69°C se promueve la formación de un producto único para el gen que codifica para el receptor de serotonina 5-HT 2c. En la Figura 12 se observa la curva de disociación del producto de PCR a una temperatura de hibridación de los cebadores de 69°C. Se aprecia la presencia de dos productos a distintas temperaturas de disociación, uno a 85°C y otro, menos abundante, a 78°C.

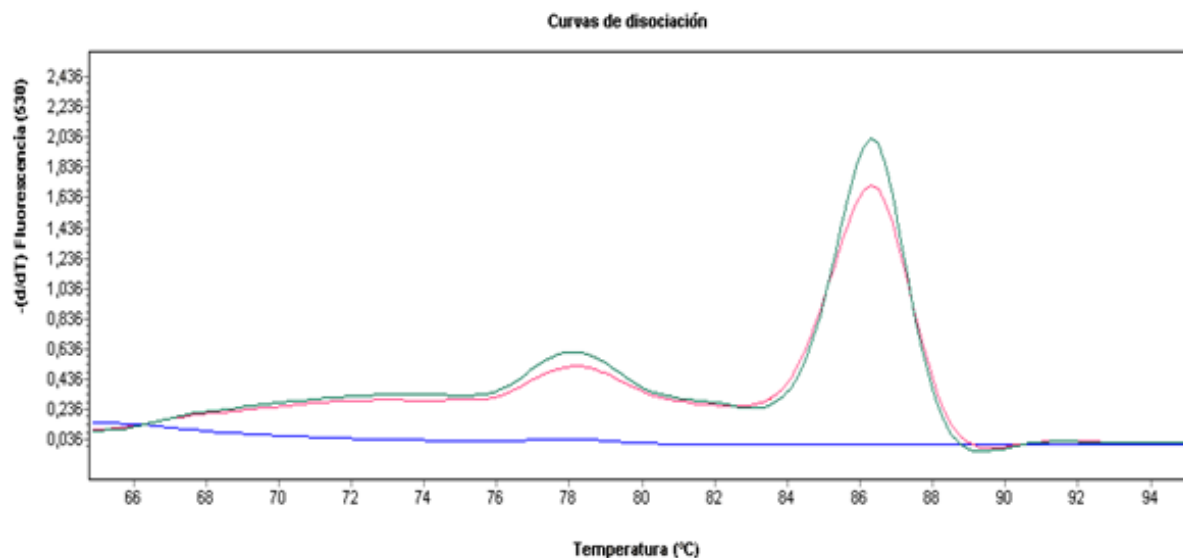


Figura 12. Curva de disociación del producto de amplificación del receptor de serotonina 5-HT 2c mediante PCR en tiempo real.

Con el fin de obtener un producto único se modificó otro parámetro crítico en la reacción de amplificación que es la concentración final $MgCl_2$, probando concentraciones de 1 a 5 mM de $MgCl_2$ en la mezcla de reacción.

En la Figura 13 se muestra la gráfica de disociación de los productos de amplificación con diferentes concentraciones de $MgCl_2$. Se observa que a una concentración final de 4 mM de $MgCl_2$ se promueve la síntesis del producto con temperatura de disociación de 85°C y disminuye la formación de productos inespecíficos

La persistencia del producto de disociación a 78°C nos lleva a la modificación del tiempo de hibridación de los cebadores durante la reacción. El rango promedio de los tiempos de hibridación para los cebadores varía de 10 a 15 segundos. Sin embargo, este parámetro puede variar con base a la longitud y secuencia del cebador diseñado para el producto a amplificar. Por lo tanto, se probaron distintos tiempos de hibridación, desde 10 hasta 16 segundos.

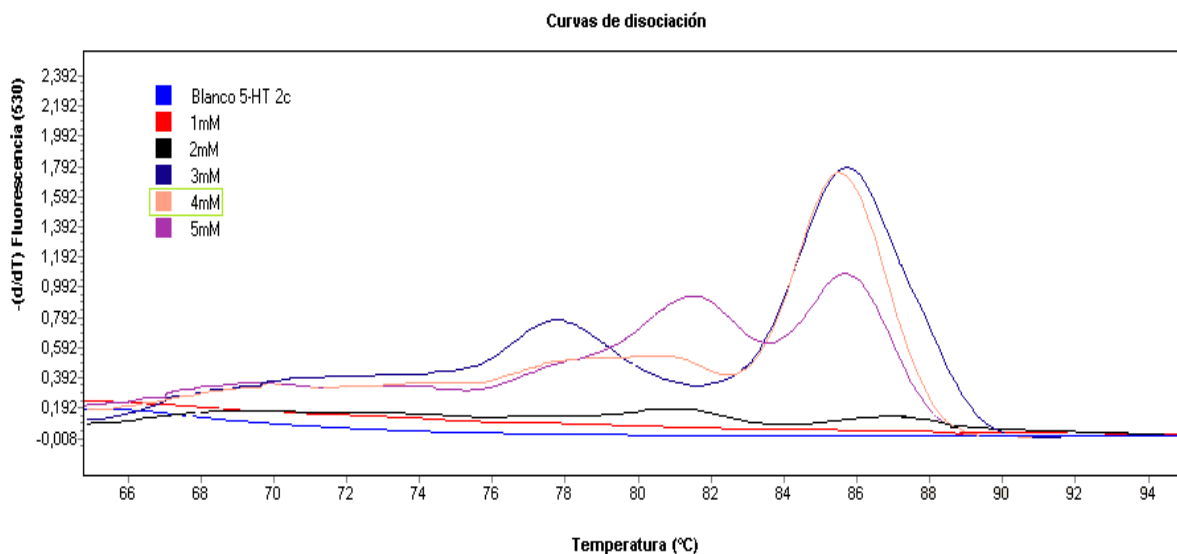


Figura 13. Curva de disociación de los productos de amplificación del ADNc del receptor de serotonina 5-HT 2c a distintas concentraciones finales de $MgCl_2$ en la mezcla de reacción.

En la Figura 14 (incisos del A al D), se presentan las curvas de disociación de los productos de amplificación. En la Figura 14D, se observa que el tiempo de 16 segundos promueve la síntesis de un producto único con una mayor eficiencia.

Mediante la modificación de las temperaturas y de los tiempos de hibridación de los cebadores, así como de la concentración de $MgCl_2$, se logra la amplificación de un producto único para el ADNc del receptor de serotonina 5-HT 2c. Adicionalmente, se intentó aumentar la eficiencia de la reacción modificando la concentración final de cebadores, probando $0.2 \mu M$ y $0.3 \mu M$. Tomando en cuenta que la fluorescencia emitida y cuantificada del SYBR Green es proporcional a la cantidad de ADN amplificado durante la PCR, se analizan las curvas de disociación para las dos concentraciones de cebadores. En la Figura 15B, se observa que a una concentración final de cebadores en la mezcla de reacción de $0.3 \mu M$, el diferencial de fluorescencia genera un aumento de 2 unidades de fluorescencia, lo cual indica una mejor eficiencia de la reacción respecto a las 0.4 unidades de fluorescencia generadas al utilizar una concentración final de cebadores de $0.2 \mu M$ (Figura 15A).

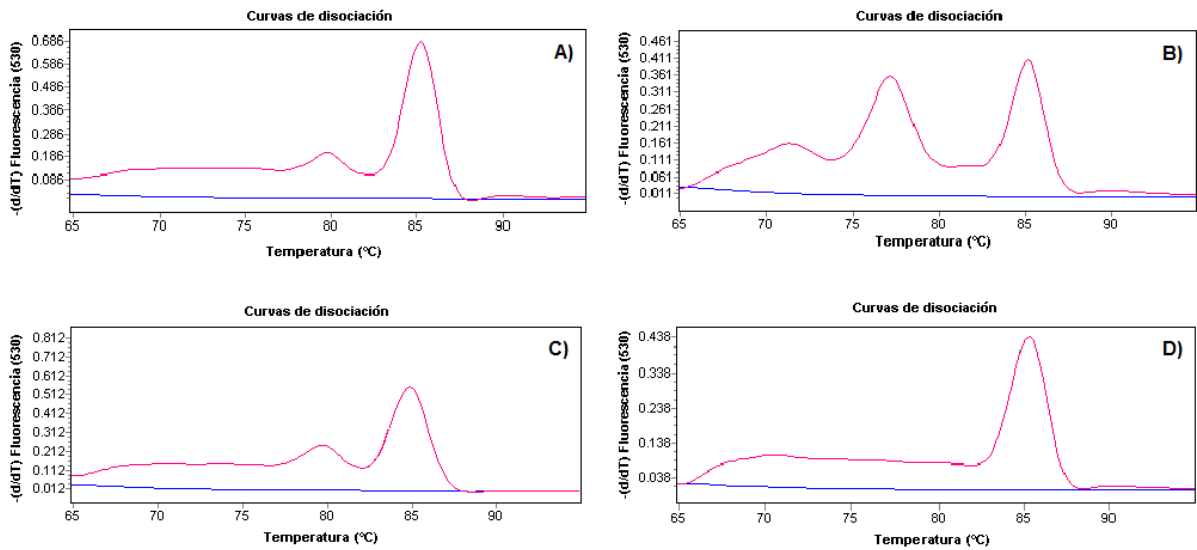


Figura 14. Curvas de disociación de los productos de amplificación con diferentes tiempos de hibridación de los cebadores; A) 10 segundos, B) 14 segundos, C) 15 segundos y D) 16 segundos.

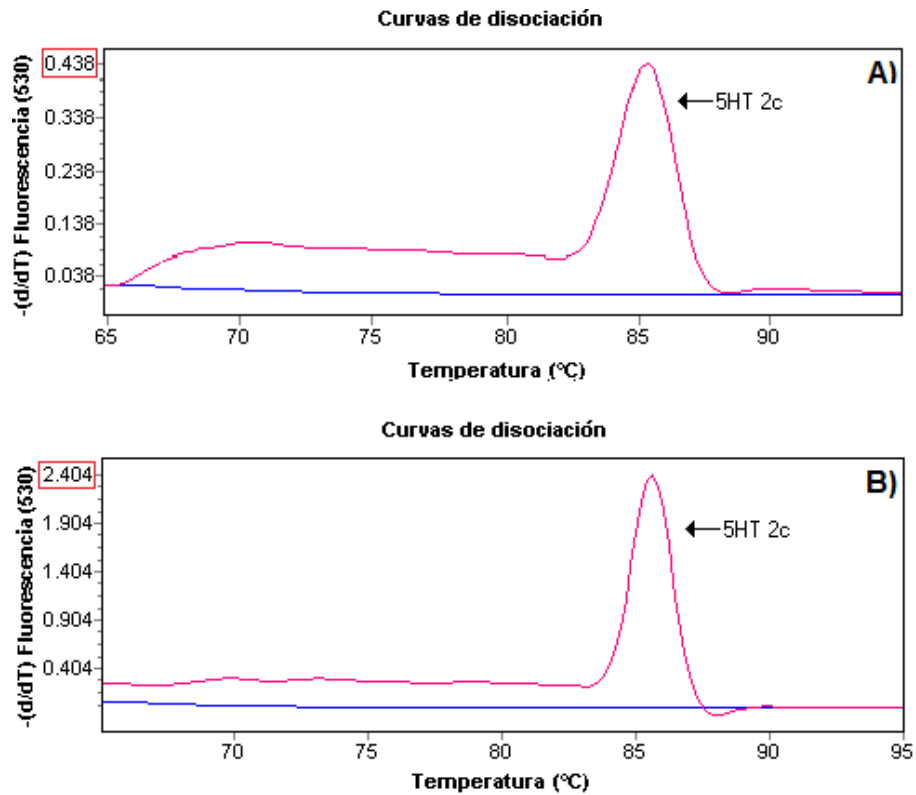


Figura 15. Curvas de disociación de los productos amplificados del receptor de serotonina 5-HT 2c con diferentes concentraciones finales de cebadores en la mezcla de reacción. A) 0.2 μ M; B) 0.3 μ M.

Una vez estandarizadas las variables para la amplificación de un único producto con una mayor eficiencia del receptor de serotonina 5-HT 2c, se procede a verificar la correcta amplificación de la subunidad 18s ribosomal bajo estas condiciones.

En la Figura 16 se observa la curva de disociación de los productos de amplificación del receptor 5-HT 2c con una temperatura de disociación de 85°C y de la subunidad 18s ribosomal con una temperatura de disociación de 86°C. Indicando que la subunidad 18s ribosomal amplifica un único producto bajo las condiciones estandarizadas para el receptor de serotonina 5-HT 2c.

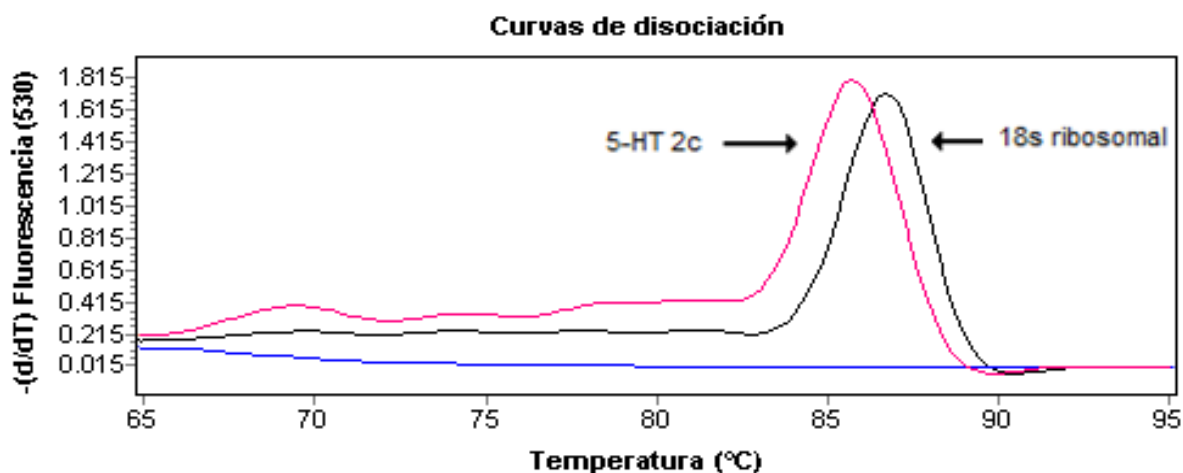


Figura 16. Curvas de disociación de los productos únicos amplificados del receptor de serotonina 5-HT 2c y de la subunidad 18s ribosomal bajo las condiciones estandarizadas.

VI.3 Cuantificación absoluta

Se prepara una curva estándar con diluciones seriadas desde 1×10^{-5} a $1 \times 10^{-8} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se amplifican duplicados de las diluciones mediante PCR en tiempo real para el receptor de serotonina 5-HT 2c y para la subunidad 18s ribosomal. Se graficaron los PC de las diluciones frente al logaritmo de su concentración como se especifica en materiales y métodos. De esta forma se obtienen las ecuaciones de la recta: para el receptor de serotonina 5-HT 2c ($y = -3.6086x - 6.9343$) con una eficiencia de 1.89 y para la subunidad 18s ribosomal ($y = -3.4131x - 2.0742$) con una eficiencia de

1.9. En la Figura 17 se observa la cinética de la reacción de amplificación de las diluciones de la curva estándar externa del receptor de serotonina 5-HT 2c. Se denota la eficiencia de la reacción así como la exactitud de los duplicados de cada dilución de la curva estándar.

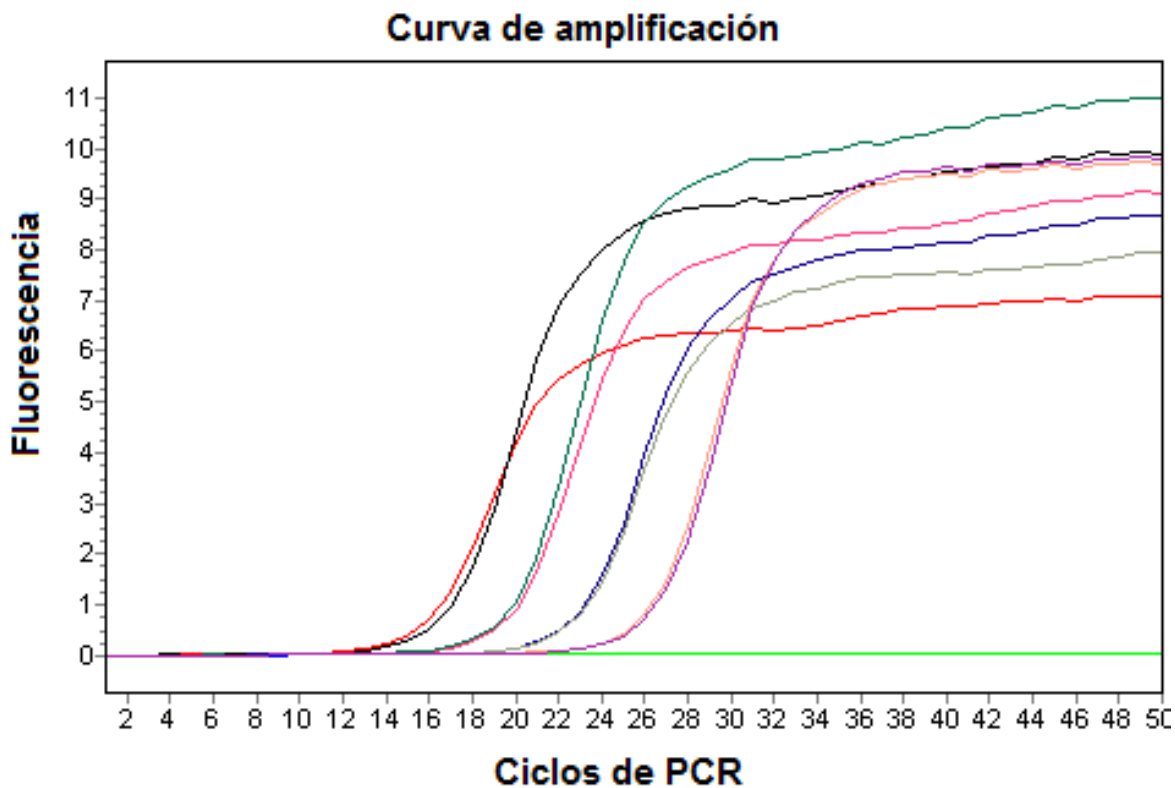


Figura 17. Cinética de la reacción de amplificación de la curva estándar externa del receptor de serotonina 5-HT 2c.

Posteriormente, se amplifican las muestras de ADNc del intestino proximal de adulto (IPA), así como del intestino distal de adulto (IDA), utilizando los cebadores para el receptor de serotonina 5-HT 2c y de la subunidad 18s ribosomal en las condiciones estandarizadas previamente para el receptor de serotonina 5-HT 2c.

Una vez concluidas las amplificaciones, se calculan las concentraciones tanto del receptor de serotonina 5-HT 2c como de la subunidad 18s ribosomal en las distintas muestras, interpolando en la ecuación de la recta del gen correspondiente

los PC conseguidos de cada muestra, obteniendo su concentración expresada en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

En la Figura 18 se representa el promedio de la concentración de las secciones proximal y distal del intestino, de la subunidad 18s ribosomal y del receptor de serotonina 5-HT 2c. Se observa que no hay variación en la expresión del 18s ribosomal, mientras que existe una notable diferencia en la expresión del receptor de serotonina 5-HT 2c.

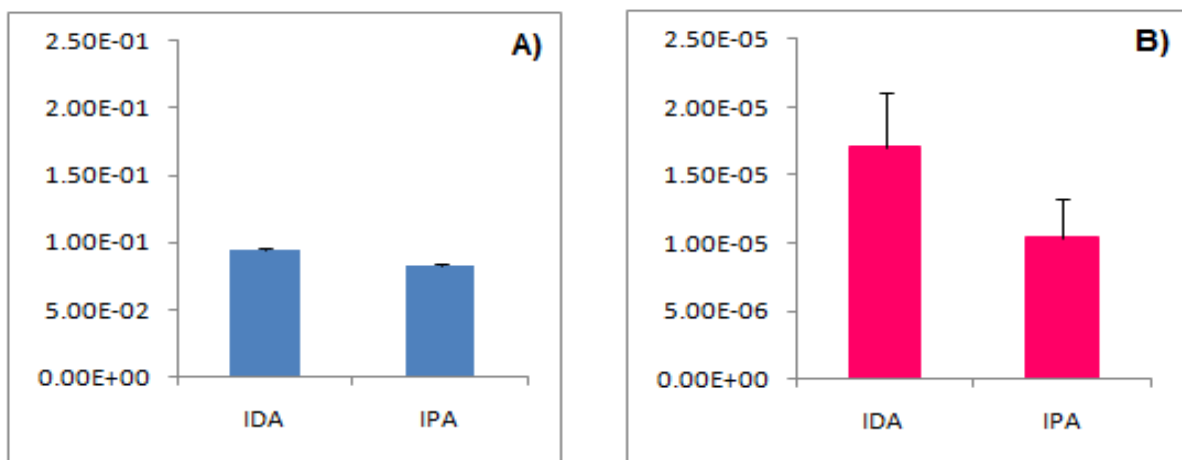


Figura 18. Cuantificación absoluta del ADNc de A) la subunidad 18s ribosomal y B) el receptor de serotonina 5-HT 2c. En las barras se representa la media de la concentración \pm la desviación estándar de, al menos, 2 ratas distintas por cada sección del intestino (proximal y distal), considerando una diferencia significativa con una $p < 0.05$.

VI.4. Cuantificación relativa

La cuantificación relativa se obtiene al normalizar la concentración del receptor de serotonina 5-HT 2c frente a la concentración de la subunidad 18s ribosomal para cada muestra. En la Figura 19 se muestra la normalización para cada sección del intestino. Se observa una tendencia de disminución en la expresión del receptor de serotonina 5-HT 2c en la sección proximal del intestino de rata adulta en comparación con la sección distal.

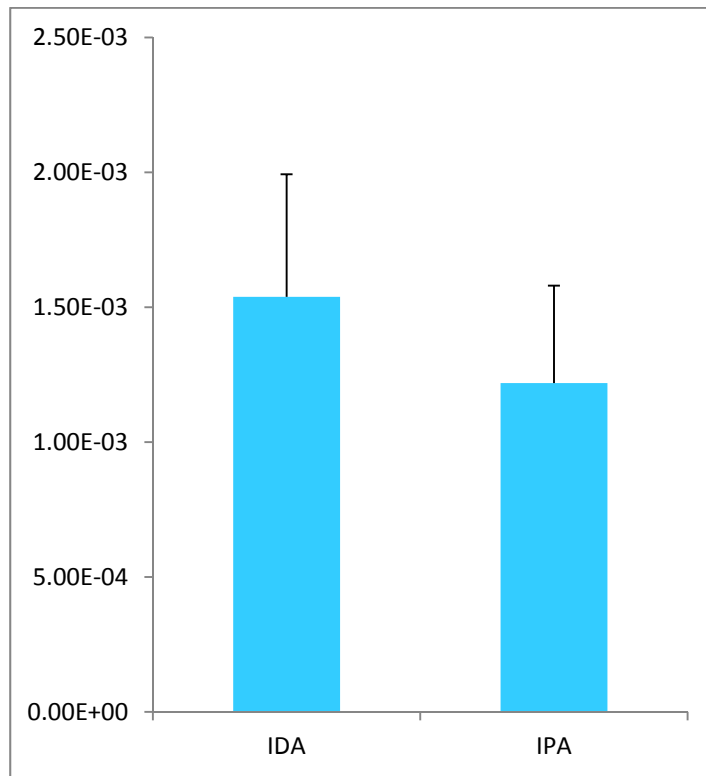


Figura 19. Cuantificación relativa. Gráfica de barras que representa la sección del intestino, IPA e IDA, frente a la normalización del receptor de serotonina 5-HT 2c respecto al gen de referencia que codifica para la subunidad 18s ribosomal.

VI.5 Veces de activación

Con los datos normalizados se calcularon las veces de activación del gen que codifica para el receptor de serotonina 5-HT 2c refiriéndolo a un valor arbitrario.

En este caso el valor que se utilizó como referencia fue el promedio de la concentración de la sección proximal (IPA), al cual se le otorgó el valor de una unidad. Posteriormente se calculó el cociente de la concentración de cada muestra frente al valor del promedio de las concentraciones de IPA. Obteniendo así una tendencia de 1.2 veces de activación del gen del receptor de serotonina 5-HT 2c en la sección distal con respecto a la proximal. Estos resultados se muestran en la Figura 20, donde se observa que existe una mayor expresión del receptor de serotonina 5-HT 2c en la sección distal respecto a la sección proximal.

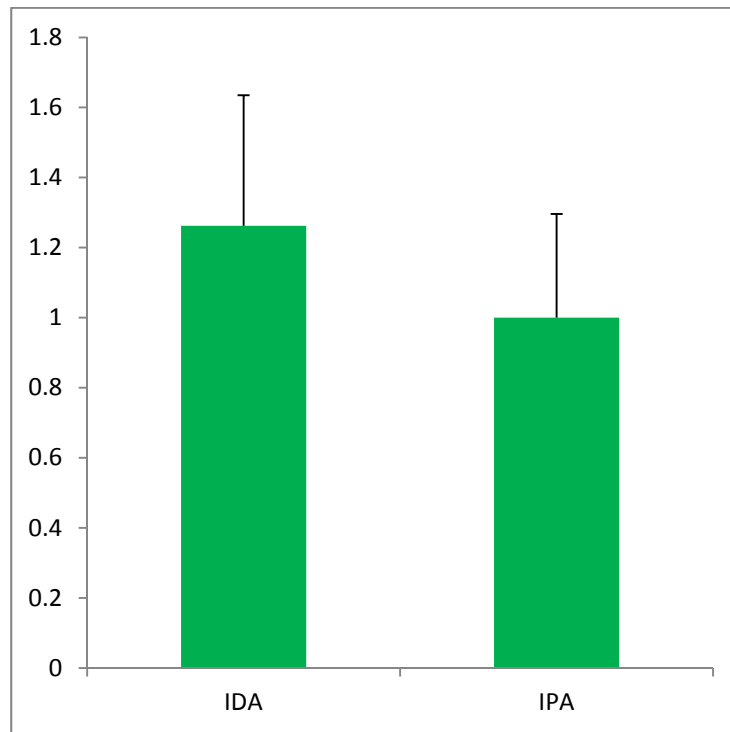


Figura 20. Número de veces de activación del receptor de serotonina 5-HT 2c. Se representan las veces de activación del receptor de serotonina 5-HT 2c en la sección distal del intestino de rata adulta (IDA) frente a la expresión del mismo receptor en la sección proximal del intestino de rata adulta (IPA) \pm la desviación estándar.

VI. DISCUSIÓN

En todas las técnicas analíticas, particularmente en las técnicas cuantitativas, es sumamente importante la estandarización de las variables que inciden de forma significativa en la eficiencia y especificidad del producto a medir, ya que se toma como base un producto que está sujeto a ser influido por las características particulares del modelo de estudio.

Por lo tanto, en este proyecto, la estandarización de las condiciones de amplificación mediante la PCR en tiempo real del ADNc del gen que codifica para el receptor de serotonina 5-HT_{2c}, fue el primer abordaje para una adecuada cuantificación de la expresión endógena de este receptor, a partir del ARNm extraído de las regiones proximal y distal del intestino de ratas adultas.

La verificación de los cebadores mediante una PCR *in silico* en el programa AmplifX, se realiza para comprobar teóricamente que la secuencia de los cebadores es afín a la secuencia diana, para calcular el tamaño del amplicón que será sintetizado, además el análisis de los datos del programa reporta el porcentaje de GC sugiere una temperatura teórica de hibridación de los cebadores.

Con los datos obtenidos en la verificación de los cebadores se diseñaron las condiciones para la amplificación del receptor de serotonina 5-HT_{2c} con la temperatura teórica de hibridación propuesta por el programa AmplifX. Así mismo, se decidió comenzar con 4 mM de MgCl₂ y 0.2 μM de cebadores, dado que en experimentos previos en la amplificación de otros genes, realizados en el laboratorio donde se llevo a cabo este trabajo, coinciden con las concentraciones idóneas más frecuentes independientemente del gen de interés. Una vez realizada la amplificación con las condiciones iniciales, se procedió a analizar las curvas de disociación y se observó la síntesis de varios productos durante la reacción de amplificación.

Se ha descrito que factores como la temperatura y tiempo de hibridación de los cebadores en la fase de amplificación, así como la concentración de $MgCl_2$ y cebadores en la reacción, pueden modificar la especificidad de hibridación de los cebadores con su secuencia complementaria (Moreau, 2009); por lo tanto, se probaron modificaciones de los factores antes mencionados respecto a las condiciones teóricas iniciales.

Al ajustar la temperatura de hibridación de los cebadores se modifica la especificidad, ya que de no ser la temperatura adecuada, los cebadores pueden formar dímeros de cebadores, mismos que al formar una doble cadena, permiten que el SYBR Green se intercale emitiendo una señal de fluorescencia que es captada por el equipo; así mismo, los cebadores pueden unirse a secuencias parcialmente complementarias y dar como resultado la amplificación de productos inespecíficos, los cuales son sitios de doble cadena. Cuando la ADN polimerasa los reconoce inicia la polimerización, generando secuencias cortas que se disocian a bajas temperaturas (Moreau, 2009). Se probó una rampa de temperatura de 57 a 61°C, encontrando con base a las curvas de disociación, que a 69°C se promueve la amplificación de un único producto de amplificación con una alta eficiencia.

Debido a la persistencia en la amplificación de un producto secundario con baja tasa de síntesis, a una temperatura de disociación de 78°C, se decidió modificar otra variable que incide directamente en la eficiencia de la reacción, como es la concentración final de $MgCl_2$. Lo anterior es debido a que la *Taq* polimerasa requiere magnesio libre como catalizador de la unión con la secuencia de ADN. Además, este catión aumenta la estabilidad de la hibridación de los cebadores con la secuencia al disminuir la repulsión electrostática entre las cadenas (Moreau, 2009). Las concentraciones probadas fueron de 1 a 5 mM y, mediante el análisis de la curva de disociación, se observó que la concentración de 4 mM fue la más favorable para la amplificación del receptor de serotonina 5-HT 2c.

La modificación de $MgCl_2$ no restringe la producción a un único amplicón, por lo tanto, se decidió modificar otro factor crítico en la reacción de amplificación, como

es la variación del tiempo de hibridación de los cebadores. El tiempo que mantenemos una temperatura, particularmente el tiempo de hibridación de los cebadores, es decisivo sobre la síntesis del amplicón ya que modula la interacción de estas secuencias con las cadenas desnaturalizadas del ADNc. Por lo tanto, se probó una variación del tiempo de hibridación entre 10 y 16 segundos y, al comparar las curvas de disociación de los diferentes tiempos probados, se encontró que 16 segundos es el tiempo más adecuado para la amplificación del receptor de serotonina 5-HT 2c, ya que se observa un único amplicón.

La concentración de cebadores actúa como reactivo limitante, es decir, al no haber suficientes cebadores puede detenerse la amplificación, ya que no se forma la hibridación con la cadena de ADN, por lo tanto la ADN polimerasa no reconoce el sitio de doble cadena, lo cual es necesario para posicionarse e iniciar la polimerización de la cadena complementaria de ADN; esto limita la actividad de la polimerasa, alcanzando el punto de saturación más rápidamente (Cortazar, 2004). Por otro lado, al haber un exceso de cebadores, estos pueden formar dímeros y disminuir la eficiencia de la amplificación del producto único del receptor de serotonina 5-HT 2c. Con base en esto intentamos aumentar la eficiencia de la amplificación modificando la concentración final de cebadores en la mezcla de reacción, por lo tanto se probaron dos concentraciones finales de cebadores (0.2 y 0.3 μM). Después de analizar las curvas de disociación se observó un aumento en la fluorescencia emitida, pasando de 0.4 unidades de fluorescencia emitidas a una concentración de 0.2 μM a 2.4 unidades, cuando la concentración es de 0.3 μM . Por lo tanto, la concentración final de 0.3 μM de cebadores favoreció un aumento en la eficiencia de la reacción.

Con la modificación de estas variables se logró estandarizar y aumentar la eficiencia de la reacción de amplificación, obteniendo un único producto del receptor de serotonina 5-HT 2c y amplificando adecuadamente la subunidad 18s ribosomal. Así pues se procedió a cuantificar la expresión del receptor de serotonina 5-HT 2c en las secciones proximal y distal del intestino de rata adulta.

El análisis de los datos indica que no hay diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión génica del receptor de serotonina 5-HT 2c entre las secciones proximal y distal del intestino delgado de rata adulta, no obstante observamos una tendencia hacia una menor expresión del receptor de serotonina 5-HT 2c en la región proximal. Estos datos, aunque preliminares, sugieren que la expresión del gen que codifica para el receptor de serotonina 5-HT 2c puede ser dependiente de la región del intestino que sea evaluada.

La cuantificación de receptores de serotonina mediante la PCR en tiempo real se ha reportado en intestino de otras especies como bovinos, en donde se evaluó la diferencia en la variación en los niveles de expresión de los diferentes subtipos de receptores, incluyendo el receptor de serotonina 5-HT 2c, encontrándose una menor expresión del 5-HT 2c respecto al 5-HT 1b y 5-HT 4 (Reist y col. 2003). Por lo que los resultados de esta tesis son el primer reporte en el que se comparan los niveles de expresión del receptor de serotonina 5-HT 2c entre diferentes secciones del intestino de rata.

Los resultados obtenidos indican que no hay una diferencia significativa en la expresión del receptor de serotonina 5-HT 2c dependiendo de la región del intestino en rata adulta. Sin embargo, es de suma importancia confirmar estos datos realizando otras cuantificaciones durante distintas etapas del desarrollo y en distintas secciones del intestino y aumentando el número de muestras, con el fin de aportar más datos que sirvan para el entendimiento de la función de este receptor en el intestino.

VII. CONCLUSIONES

Se establecieron las temperaturas y tiempos de hibridación óptimos de los cebadores utilizados para la amplificación por PCR en tiempo real del ADNc del receptor de serotonina 5-HT 2c de intestino de rata.

Se determinaron las concentraciones de MgCl₂ y cebadores que aumentaban la especificidad y eficiencia de la amplificación del producto de PCR del receptor de serotonina 5-HT 2c de intestino de rata.

Se evaluó la expresión del ARNm de la subunidad 18s ribosomal en las secciones proximal y distal de intestino de rata adulta mediante una cuantificación absoluta.

Se cuantificó la expresión del gen que codifica para el receptor de serotonina 5-HT 2c en las secciones proximal y distal de intestino de rata adulta.

No hay variaciones estadísticamente significativas en los niveles de expresión del gen que codifica para el receptor de serotonina 5-HT 2c entre las secciones proximal y distal de intestino de rata adulta.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Baxter**, G., Kennett, G., Blaney, F., Blackburn, T. **1995**. 5-HT₂ receptor subtypes: a family re-united?. *Trends in Pharmacological Sciences*. Vol. 16: 105-110.
- Bickerdike**, M.J. **2003**. 5-HT_{2C} receptor agonists as potential drugs for the treatment of obesity. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. Vol. 3: 885-897.
- Briejer**, M.R., Mathis, C., Schuurkes, J. **1997**. 5-HT receptor types in the rat ileum longitudinal muscle: focus on 5-HT₂ receptors mediating contraction. *Neurogastroenterology & Motility*, Vol. 9: 231–37.
- Bustin**, S.A., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M.W. **2005**. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*. Vol. 34: 597-601.
- Córdova**, A. **2003**. *Farmacología dinámica*. 1ra edición. Masson Elsevier, Barcelona. 72-73.
- Cortazar**, A., Silva, E. **2004**. *Métodos físico-químicos en biotecnología: PCR*. México. 1-43.
- Dezi**, C. **2007**. Modeling of 5-HT_{2a} and 5-HT_{2c} receptors and of their complexes with actua and potential antipsychotic drugs. Barcelona. Pompeu Fabra University. Tesis para obtener el título de PhD. 15-35.
- Flórez**, J. **1997**. *Farmacología Humana*. 3ra edición. Masson S.A., Barcelona, 31-32.
- Flórez**, J. **2003**. *Farmacología Humana*. 4ta edición. Masson S.A., Barcelona, 34.
- Gaddum**, J.H., Hammed, K.A. **1954**. Drugs wich antagonize 5-hydroxytryptamine. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 9: 240-248.
- Gaddum**, J.H., Picarelli, Z.P. **1957**. Two kinds of tryptamine receptors. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 12: 323-28.
- Gershon**, M.D. **2004**. Serotonin Receptors and Transporters-Roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. Vol. 20: 3-14.
- Hurley**, J.H., Zhang S., Bye, L.S, Marshall, M.S, DePaoli-Roach, A., Guan, K., Fox, A., Yu, L. **2003**. Insulin signaling inhibits the 5-HT_{2C} receptor in choroid plexus via MAP kinase. *BioMed Central Neuroscience*. Vol. 4: 10.

- Katzung**, B.G. **2007**. Basic & Clinical Pharmacology. Décima edición. The McGraw-Hill Companies, Inc. California, 270-73.
- Kursar**, J.D., Nelson, D.L. **1994**. Molecular cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the human 5-hydroxytryptamine_{2B} receptor. *Molecular Pharmacology*. Vol. 46: 227-34.
- McKenna**, D.J., Repke, D.B. **1990**. Differential interactions of indolealkylamines with 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. *Neuropharmacology*. Vol. 29: 193-98.
- Moreau**, V., Voirin, E., Paris, C., Kotera, M., Nothisen, M., Rémy, J., Behr, J., Erbacher, P., Lenne-Samuel, N. **2009**. Zip Nucleic Acids: new high affinity oligonucleotides as potent primers for PCR and reverse transcription. *Nucleic Acids Research*. Vol. 37: 130.
- Moskwa**, A, Boznanska, P. **2007**. Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 141: 1285–1293.
- Pffafli**, M.W. **2001**. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. Vol. 29: 130.
- Pffafli**, M.W. **2004**. www.gene-quantification.de/strategy.html.
- Peroutka**, S.J., Snyder, S.H. **1979**. Multiple serotonin receptors: differential binding of [3H]5-hydroxytryptamine, [3H]lysergic acid diethylamide and [3H]spiroperidol. *Molecular Pharmacology*. Vol. 16: 687-99.
- Roche**, F. **2011**. http://www.roche.es/portal/roche-spain/acerca_de_la_pcr.
- Ruíz**, X. **2010**. Cuantificación del ARNm del transportador 5 de aminoácidos neutros dependiente de sodio (SNAT5) en corteza de rata durante la ontogenia. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Licenciado en Biotecnología. 27.
- Sikander**, A., Vati, RS., Kishor, K. **2009**. Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. *Clinica Chimica Acta*, Vol. 403: 47-55.
- Taleisnik**, S. **2006**. Receptores celulares y la transducción de señales. *Temas de Biología celular*. 1a edición. Encuentro Grupo Editor. Argentina, 2-3.
- Venegas**, G., Cruchet, S., Moraga, F. **2007**. Motilidad Digestiva: ¿Qué es Normal o Anormal? (I) Anatomía y Fisiología del Tubo Digestivo. *Medwave*. Vol. 7.
- Vierstraete**, A. **1999**. <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>.

Vinueza, C. 2009. PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. Revista electrónica de Veterinaria. Vol.10: 1-14.

Wouters, M.M., Farrugia, G., Schemann, M. 2007. 5-HT receptors on interstitial cells of Cajal, smooth muscle and enteric nerves. Neurogastroenterology and Motility. Vol. 2:5-12.

Zhao, R.H., Baig, M.K., Thaler, K.J., Mack, J., Abramson, S., Woodhouse, S., Tamir, H., Wexner, S.D. 2003. Reduced expression of serotonin receptor(s) in the left colon of patients with colonic inertia. Diseases of the Colon and Rectum. Vol. 46: 81-6.