

“UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO”



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA
“PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS”



ÁREA TEMÁTICA DE BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

“EXPRESIÓN DEL GEN DE LOS RECEPTORES T1R2 Y T1R3 Y NÚMERO DE
CORPÚSCULOS GUSTATIVOS EN LA PAPILA CALICIFORME DE RATAS CON DME
TRATADAS CON L-TRIPTÓFANO”

TESIS QUE PRESENTA:

C.D. PEDRO ROSALES GARCÍA

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR DE TESIS

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS ROSALÍO MERCADO
CAMARGO

MORELIA, MICHOACÁN, ABRIL DE 2015

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE NEUROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO. Trabajo parcialmente apoyado por: CIC-UMSNH. 26.12 (2015), ANUIES-ECOS NORD-CONACyT NORD M12S01, Becario CONACyT 286212. CECTI (2014)

AGRADECIMIENTOS

Al D.C. Rosalio Mercado Camargo, por abrirme las puertas al mundo de la investigación y permitirme seguir creciendo.

A mis sinodales:

D.C. Joel E. López Meza

D.C. Héctor E. Martínez Flores

D.C. Alejandra Ochoa Zarzosa

D.C. Daniel Godínez Hernández

Por su tiempo, paciencia y enseñanzas dedicadas a este trabajo de tesis.

A Erick Magaña Ruiz por estar en el lugar y momento correcto, por creer y decidir invertir y construir.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a la M.C. Claudia Susana Bautista, por su apoyo incondicional, conocimiento compartido, consejos, compañía y amistad en todo momento y paso a paso en el desarrollo de la presente investigación.

A mis padres, por ser la raíz de toda una ideología, un modelo.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT.....	X
I. ANTECEDENTES.....	1
I.1. Sistema gustativo	1
I.1.2. Papilas gustativas	2
I.1.3. Corpúsculos gustativos	3
I.1.4. Células gustativas	4
I.1.4.1 Células gustativas tipo I	5
I.1.4.2. Células gustativas tipo II	5
I.1.4.3. Células gustativas tipo III o presinápticas	6
I. 1.4.4. Células gustativas tipo IV o basales	6
I.1.5. Neuroanatomía del sistema gustativo	6
I.1.6. Transducción de señales	8
I.1.6.1. Mecanismo molecular para la transducción del sabor dulce.....	8
I.2 Serotonina y sistema gustativo	12
I.2.1. Biosíntesis de serotonina	13
I.3 Diabetes mellitus	16
I.3.1. Diabetes mellitus tipo I o autoinmune	17
I.3.2 Diabetes mellitus tipo II	18
I.3.3. Otros tipos de diabetes mellitus	20
I.3.4 Diabetes mellitus gestacional	21
I.3.5. Prevalencia mundial de la diabetes mellitus	22
I.3.6. Prevalencia en México de la diabetes mellitus.....	23
I.3.7. Proyecciones del número de personas con DM 2013-2035	25
I.3.8. Complicaciones de la DM	26
I.3.8.1. Enfermedades cardiovasculares	26
I.3.8.2 Enfermedades renales	27
I.3.8.3 Retinopatía	28
I.3.8.4 Neuropatía diabética.....	28
I.4 Alteraciones gustativas	28
II. JUSTIFICACIÓN	30
III. HIPÓTESIS.....	31
IV. OBJETIVO GENERAL	32

IV.1	Objetivos específicos	32
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
V.1.	Animales	33
V.2.	Inducción de Diabetes Mellitus Experimental (DME)	33
V.3.	Administración del L-tryptophan	33
V.4.	Determinación de la percepción del sabor dulce	33
V.5	Obtención de tejidos.....	33
V.6.	Determinación de la expresión de receptores T1R2/T1R3.....	34
V.7	Cortes histológicos y conteo de corpúsculos.....	37
V.8	Pruebas bioquímicas.....	37
V.9	Análisis estadístico.....	38
VI.	RESULTADOS	39
VI.1.	Inducción de la DME	39
VI.2.	Evaluación de la percepción gustativa.....	47
VI.3	Expresión de mRNA del gen β -actina en papila caliciforme, Ctz, y Crb	48
VI.4	Expresión de mRNA del gen β -actina, T1R2 y T1R3 en papila C	49
VI.5.	Expresión del gen del receptor, T1R2 en etapa aguda	50
VI.6	Expresión del gen del receptor, T1R3 en etapa aguda	51
VI.7	Expresión del gen del receptor, T1R2 en etapa aguda y crónica	52
VI.8	Expresión del gen del receptor, T1R3 en etapa aguda y crónica	53
VI.9	Número de corpúsculos gustativos.....	54
VI.10	Número de corpúsculos gustativos en etapa aguda.	55
VI.11	Número de corpúsculos gustativos en etapa aguda y crónica.....	56
VI.12	Micrografías de las papilas caliciformes.	57
VII.	DISCUSIÓN.....	62
VIII	CONCLUSIÓN.....	66
IX.	BIBLIOGRAFÍA	67

ÍNDICE DE FIGURAS

No. Figura	Título	Página
1	Distribución de las papilas gustativas en la lengua.	2
2	Representación de un corpúsculo gustativo y sus tipos celulares.	3
3	Organización del sistema gustativo humano.	8
4	Estructura del receptor para el sabor dulce.	11
5	Vía de señalización en las células receptoras.	12
6	Comunicación celular entre célula tipo II y la tipo III y liberación de 5-HT.	13
7	Síntesis de serotonina a partir de L-triptófano.	15
8	Clasificación de DM.	18
9	Otros tipos específicos de DM.	22
10	Prevalencia mundial de DM por región.	24
11	Prevalencia en México de la DM.	25
12	Proyecciones mundiales del número de personas con DM por región.	26
13	Complicaciones de la Diabetes Mellitus.	28
14	Nivel de glucemia en plasma de los grupos experimentales.	40
15 a y b	Consumo de agua de los grupos experimentales a la 4ta y 8va semana de inducción de DME.	41
16 a y b	Consumo de alimento de los grupos experimentales a la 4ta y 8va semana de inducción de DME.	42
17 ay b	Peso corporal de los grupos experimentales a la 4ta y 8va semana de inducción de DME.	43

18	Nivel de colesterol en plasma de los grupos experimentales.	44
19	Nivel de triglicéridos en plasma de los grupos experimentales.	44
20	Nivel de HDL en plasma de los grupos experimentales.	45
21	Nivel de LDL en plasma de los grupos experimentales	45
22	Nivel de lípidos totales en plasma de los grupos experimentales.	46
23	Hemoglobina glucosilada de los grupos experimentales.	47
24 a y b	Consumo de solución de sacarosa al 10% de los grupos experimentales a la 4ta y 8va semana de inducción de DME.	48
25 a y b	Producto de amplificación y expresión relativa del gen de la β -actina en papila caliciforme, corteza cerebral y cerebelo de rata.	49
26 a y b	Producto de amplificación y expresión relativa del gen de la β -actina, T1R2 y T1R3 en papila caliciforme de rata	50
27 a y b	Producto de amplificación y expresión relativa del gen T1R2 en etapa aguda en papila caliciforme de rata.	51
28 a y b	Producto de amplificación y expresión relativa del gen T1R3 en etapa aguda en papila caliciforme de rata.	52
29 a y b	Producto de amplificación y expresión relativa del gen T1R2 en papila caliciforme de rata en etapa aguda y crónica.	53
30 a y b	Producto de amplificación y expresión relativa del gen T1R3 en papila caliciforme de rata en etapa aguda y crónica.	54
31	Número de corpúsculos gustativos en la papila caliciforme de ratas bajo un esquema de DME etapa aguda.	55
32	Número de corpúsculos gustativos en la papila caliciforme de ratas bajo un esquema de DME etapa aguda y crónica.	56
33	Secuencia de cortes histológicos utilizados en el conteo del número de corpúsculos gustativos en la papila caliciforme de	57

	ratas control.	
34	Micrografía de papila caliciforme de rata control.	58
35	Micrografía de papila caliciforme de rata control con tratamiento solo en etapa aguda de L-Trp.	58
36	Micrografía de papila caliciforme de rata control con tratamiento en etapa agudo y crónico de L-Trp.	59
37	Micrografía de papila caliciforme de rata control con tratamiento solo en etapa crónica de L-Trp.	59
38	Micrografía de papila caliciforme de rata diabética.	60
39	Micrografía de papila caliciforme de rata diabética con tratamiento solo en etapa aguda de L-Trp.	60
40	Micrografía de papila caliciforme de rata diabética con tratamiento en etapa aguda y crónica de L-Trp.	61
41	Micrografía de papila caliciforme de rata diabética con tratamiento solo en etapa crónica de L-Trp.	61

ÍNDICE DE TABLAS

No. Tabla	Título	Página
1	Condiciones de reacción para la técnica de RT.	36
2	Condiciones de reacción para la técnica de PCR	37
3	Secuencias de los oligonucleótidos específicos empleados para la PCR.	37

LISTA DE ABREVIATURAS.

5-HT	- Serotonina.
°C	- Grados centígrados.
ARNm	- Ácido ribonucleico mensajero.
ATP	- Adenosín tri-fosfato.
ACH	- Acetilcolina.
BHE	- Barrera hematoencefálica.
cAMP	- Adenosín monofosfato cíclico.
C tx. a+c	- Control tratamiento agudo más crónico.
D tx. a+c	- Diabético tratamiento agudo más crónico.
D tx.c	- Diabético tratamiento crónico.
DM	- Diabetes Mellitus.
DM1	- Diabetes Mellitus tipo 1.
DM2	- Diabetes Mellitus tipo 2.
DME	- Diabetes Mellitus Experimental.
DMG	- Diabetes Mellitus Gestacional.
g	- Gramos.
GABA	- Ácido gamma-aminobutírico.
GDP	- Guanosín difosfato.
GTP	- Guanosín trifosfato.
GPRS	- Receptores acoplados a proteína G.
h	- Horas.

HLDL	- Lipoproteína de alta densidad.
i.p.	- Intraperitoneal.
IP3	- Inositol trifosfato.
IP3R3	- Receptor en retículo endoplásmico para IP3.
kg	- Kilogramos.
LDLD	- Lipoproteína de baja densidad.
L-trp.	- L-triptófano.
mg	- Miligramos.
PKA	- Proteína quinasa.
PLC β 2	- Fosfoinosítido fosfolipasa C beta 2.
RT-PCR	- Transcriptasa Reversa – Reacción en Cadena de Polimerasa.
SNAP	- Proteína asociada al sinaptosoma 25.
TPH	- Triptófano hidroxilasa.

RESUMEN

En las papilas gustativas se ha demostrado la presencia de la serotonina (5-HT) y de los receptores T1R2 y T1R3 que están localizados en las células tipo III que sintetizan 5-HT, éstos participan en la transmisión de las modalidades gustativas del sabor dulce. La síntesis de 5-HT se efectúa a partir del aminoácido esencial L-Triptófano (L-Trp) mediante la participación de la enzima triptófano 5-hidroxilasa (TPH). Experimentalmente se puede inducir un incremento de la síntesis de 5-HT con la administración de su precursor (L-Trp). Existen reportes de una disminución en la expresión de receptores del gusto azucarado en pacientes con diabetes mellitus (DM) así como una reducción en el número de corpúsculos gustativos, también se ha observado que existe una reducción en la síntesis de serotonina en ratas con DM experimental (DME). No es conocido si al estimular con L-Trp. la síntesis de serotonina se modifique la expresión de receptores T1R2/T1R3 y el número de corpúsculos en la papila caliciforme de la rata, y por lo tanto cambie la percepción gustativa para el sabor dulce. Por lo cual en el presente trabajo se implementó un modelo de DME en ratas a las que se les analizó la percepción del sabor dulce, la expresión de los receptores T1R2/T1R3, el número de corpúsculos y el perfil de lípidos después de un tratamiento con L-Trp. Se observó un aumento en el consumo de solución de sacarosa y una disminución en la expresión de los receptores T1R2/T1R3; el tratamiento con L-trp. revirtió este efecto pero sin alcanzar los valores de los grupos controles, así como se aumentó el número de corpúsculos gustativos alcanzando valores de los grupos controles respectivos. Los resultados sugieren que la serotonina a través de su función como factor trófico modula la expresión de los receptores T1R2/T1R3 y el número de corpúsculos gustativos en la papila caliciforme de la rata.

Palabras Clave: serotonina, receptores, sistema gustativo, diabetes mellitus.

ABSTRACT

In taste buds it has been demonstrated the presence of serotonin (5-HT) and T1R2 and T1R3 receptors, which are located in cells of type III, which synthesize 5-HT and are involved in the transmission of taste modalities of sweet taste. It has been proposed that the 5-HT may have trophic role participation. The synthesis of 5-HT is made from the essential amino acid L-tryptophan (L-Trp) through participation of tryptophan 5-hydroxylase (TPH). Experimentally, we can induce an increase in 5-HT synthesis by administering its precursor L-Trp. There are reports of decreased expression of sweet taste receptors and reduction of taste buds and also it has been suggested that there is a reduction of serotonin synthesis in rats with experimental diabetes mellitus (EDM). It is unknown if the administration of L-trp, which increase serotonin levels changes the expression of T1R2 and T1R3 receptors and the taste buds number in the circumvallate papillae and therefore the perception for the sweet taste will be modify. So, the aim of the present work was to explore if the L-trp. Administration to rats with experimental diabetes mellitus increased the T1R2/T1R3 expression, the taste buds number and the gustative perception of de sweet taste. An Increase in the consumption of sucrose solution and decreased expression of T1R2 / T1R3 receptor was observed; treatment with L-trp reverses this effect without reaching the values of the control groups, the number of taste buds were increased without reached values of the control groups. These results suggest us that the effects observed in the present work could be relateded with the 5-HT trophic role.

Keywords: serotonin, receptors, gustatory system, diabetes mellitus.

I. ANTECEDENTES

I.1 SISTEMA GUSTATIVO

El sabor, corresponde al ensamblaje de las sensaciones percibidas durante la ingesta de alimentos y engloba la percepción de olores y estímulos gustativos (salado, dulce, amargo, ácido y umami) producidos durante la masticación, además de las sensaciones producidas por la textura, temperatura y la astringencia de los alimentos. A nivel neurofisiológico, la percepción del sabor resulta de la combinación de tres sistemas sensoriales: el olfato, el gusto y el tacto, que permite tener una representación del alimento a ingerir (Mattes y Cowart, 1994).

El sistema gustativo es el órgano con el que se perciben las sustancias químicas disueltas, como las de los alimentos. También es definido como el sistema con la capacidad para detectar productos químicos a través de receptores gustativos (Fuentes et al., 2010). La detección de moléculas sápidas se lleva a cabo gracias a las células gustativas donde la estimulación de éstas pone en juego los circuitos neuronales que se extienden desde la lengua, la faringe y el paladar hasta zonas específicas de la corteza cerebral (Purves, 2001).

El sistema gustativo es regulado por diversos factores tróficos, se compone de un tipo celular especializado, denominado células gustativas las cuales se encuentran localizadas en grupos de entre 50 a 100 células, formando estructuras denominadas papilas gustativas (Chaudhari et al., 2010). Anatómicamente el sistema gustativo se ha dividido en una región central y una región periférica.

I.1.2 PAPILAS GUSTATIVAS

De manera periférica el punto de contacto del sistema gustativo con los alimentos es la lengua y el primer elemento de transmisión son las células especializadas llamadas células gustativas, que se agrupan en corpúsculos gustativos y forman las papilas gustativas (Buck, 2000).

Las papilas gustativas, se dividen en cuatro clases diferentes de acuerdo a su morfología: 1) fungiforme, en forma de hongo, 2) caliciforme, en forma de botón, 3) foliada, en forma de crestas y 4) filiforme, en forma de filamento y cada una de ellas está constituida de un número distinto y variable de corpúsculos gustativos (Figura 1).

Las papilas fungiformes se localizan en las dos terceras partes anteriores de la lengua y en el paladar, a pesar de ser las más numerosas, ellas constituyen solo el 18% del total de los corpúsculos gustativos. Por otro lado, las papilas foliadas se localizan en los lados de la tercera parte posterior de la lengua. Sólo existen dos papilas de este tipo, las cuales contienen el 34% de los corpúsculos gustativos presentes en la lengua.

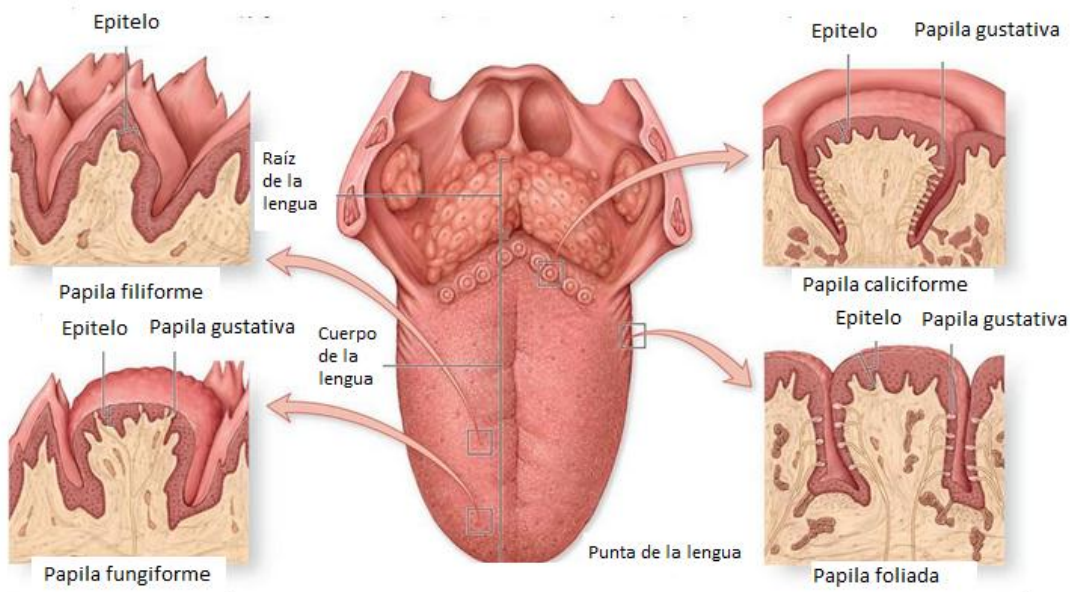


Figura 1. Distribución de las papilas gustativas en la lengua.

Tomada de Fuentes *et al*, 2010.

Las papilas caliciformes o circunvaladas se encuentran en la tercera parte posterior de la lengua, el número de este tipo de papilas es de 7-9 en humanos y sólo una en el caso de los murinos; aunque son en número las más reducidas, estas integran el 48% del total de corpúsculos gustativos (Buck, 2000).

I.1.3 CORPÚSCULOS GUSTATIVOS

Los corpúsculos o botones gustativos son una agrupación de aproximadamente 30 a 100 células gustativas (Figura 2) que forman una estructura individual en forma de roseta, los cuales se encuentran inmersos en el epitelio de las papilas gustativas, también han sido localizados en la mucosa del paladar, faringe, laringe y epiglotis. Aproximadamente 5,000 corpúsculos cubren la superficie lingual y dependiendo del tipo de papila gustativa, su número y ubicación son distintos.

En las papilas circunvaladas existen miles de corpúsculos distribuidos en sus paredes laterales, mientras que las fungiformes presentan uno o pocos corpúsculos en su superficie apical, las foliadas contienen cientos de botones ubicados en sus zonas laterales.

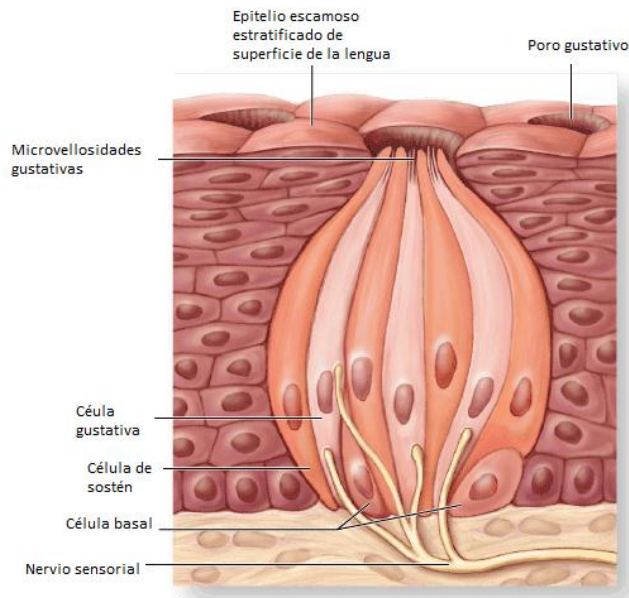


Figura 2. Representación de un corpúsculo gustativo y sus tipos celulares.

Tomada de Bigiani 2001.

En el velo del paladar, la faringe y parte superior de la laringe también se encuentran botones gustativos que no están localizados en papilas gustativas sino distribuidas en el epitelio. Al parecer éstos están relacionados con los mecanismos de la deglución y de respuestas reflejas.

Los botones o corpúsculos gustativos contienen células neuroepiteliales especializadas que transmiten la información del gusto (Fuentes et al., 2010).

I.1.4 CÉLULAS GUSTATIVAS

Cada botón gustativo contiene de 40 a 60 células receptoras para el gusto que se extienden desde la lámina basal hasta la superficie del epitelio. Estas son células con micro vellosidades que se extienden hacia un pequeño orificio llamado poro gustativo; el poro forma una especie de bolsillo que permite el contacto entre las microvellosidades y el medio externo (Bigiani 2001).

Las células gustativas tienen características tanto de las células epiteliales y de las neuronas, ya que en gran medida estas células son un epitelio de renovación y, al mismo tiempo, son receptores sensoriales excitables que se comunican sinápticamente con las neuronas.

Al igual que otras células epiteliales, las células de las papilas gustativas tienen un tiempo de vida media de 10 días y son parte de una constante renovación poblacional. A lo largo de la vida, las células gustativas son continuamente reemplazadas a través de la proliferación celular a lo largo de la membrana basal del epitelio. Esto sugiere que las células nacen en el epitelio basal adyacente a las papilas gustativas y migran para reemplazar, dando lugar tanto a papilas gustativas como al epitelio sensorial que las rodea (Perea et al., 2013).

Al interior de los corpúsculos gustativos se distinguen cuatro tipos morfológicamente diferentes de células gustativas que son: las células basales o tipo IV, las de tipo I, las de tipo II y las de tipo III.

Las células basales o tipo IV son pequeñas células esféricas localizadas en la base del corpúsculo a partir de las cuales son generadas todas las células gustativas (Buck, 2000). Las de tipo I, II y III se caracterizan por tener una forma bipolar. Estas células presentan prolongaciones hacia la cavidad bucal donde interaccionan directamente con las moléculas sápidas presentes en los alimentos y hacia la base del corpúsculo gustativo en donde establecen los contactos sinápticos con las fibras nerviosas aferentes (Buck, 2000; Lindemann, 2001).

I.1.4.1 CÉLULAS GUSTATIVAS TIPO I

Las células gustativas de tipo I poseen propiedades similares a las células gliales, sirven de sostén al corpúsculo gustativo y regulan la concentración extracelular de iones al interior del corpúsculo (Bigiani, 2001). Las células de tipo I, representan la mayor proporción de células que se encuentran en los corpúsculos gustativos, son células alargadas que aparecen oscuras en micrografías electrónicas debido al citoplasma denso en electrones (Galindo et al., 2012).

I.1.4.2 CÉLULAS GUSTATIVAS TIPO II

Las células de tipo II expresan la maquinaria necesaria para la detección y transducción de las señales gustativas (Boughter, 1997; Adler *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000a y 2000b; Yee *et al.*, 2001).

Las células tipo II o células receptores son también llamadas células claras por observarse luz de electrones en el citoplasma en micrografías electrónicas; expresan las proteínas para la transducción del sabor dulce, umami y amargo. Los receptores acoplados a proteína G (GPRS) como la familia Tas1rs y Tas2rs se expresan exclusivamente en estas células tipo II (Galindo et al., 2012). Sin embargo, estas no forman sinapsis estructuralmente definida con las fibras aferentes primarias ni cuentan con una maquinaria de liberación de neurotransmisores (Clapp *et al.*, 2004).

I.1.4.3 CÉLULAS GUSTATIVAS TIPO III O CÉLULAS PRESINÁPTICAS

Las células tipo III tienen características ultraestructurales intermedias entre las células tipo I y las células receptor (tipo II). Las células tipo III son las únicas que establecen sinapsis clásica con nervios gustativos aferentes (Murray, 1986; Yang *et al.*, 2000b; Yang *et al.*, 2004). Paradójicamente, las proteínas necesarias para la transducción gustativa son expresadas, en las células de tipo II.

Las células tipo III liberan serotonina, norepinefrina y GABA. Las células tipo III contienen proteínas asociadas con la expresión de la transmisión sináptica, incluyendo SNAP 25, canales de Ca²⁺, enzimas para la biosíntesis de serotonina y GABA, y los transportadores de captación de aminas biógenas. Las células presinápticas están involucradas en la transducción de los estímulos dulces, amargos y umami. A pesar de que no poseen receptores para estos compuestos, reciben e integran las señales provenientes de las células tipo II. La explicación es la comunicación célula-célula.

I.1.4.4 CÉLULAS GUSTATIVAS TIPO IV O BASALES

Las células basales son pequeñas células esféricas localizadas en la base del corpúsculo gustativo a partir de las cuales son generadas todas las células gustativas, consisten en células basales no diferenciadas, no polarizadas, que no tienen ningún contacto con la cavidad oral (Buck, 2000).

I.1.5 NEUROANATOMÍA DEL SISTEMA GUSTATIVO

Desde de un punto de vista de sistema nervioso central, la inervación del sistema gustativo se organiza de la manera siguiente, las fibras nerviosas que vienen de los dos tercios anteriores de la lengua viajan por el nervio cuerda del tímpano, el cual es rama del VII par craneal, también llamado nervio facial, otra rama de este es el nervio petroso superficial mayor, que inerva los corpúsculos gustativos ubicados en el paladar. La rama lingual del IX par craneal o nervio glossofaríngeo lleva la información proveniente del tercio posterior de la lengua (Galindo *et al.*,

2012). El X par craneal o nervio vago también se relaciona con el gusto, transportando las señales gustativas desde el tercio superior del esófago y la epiglotis (Figura 3).

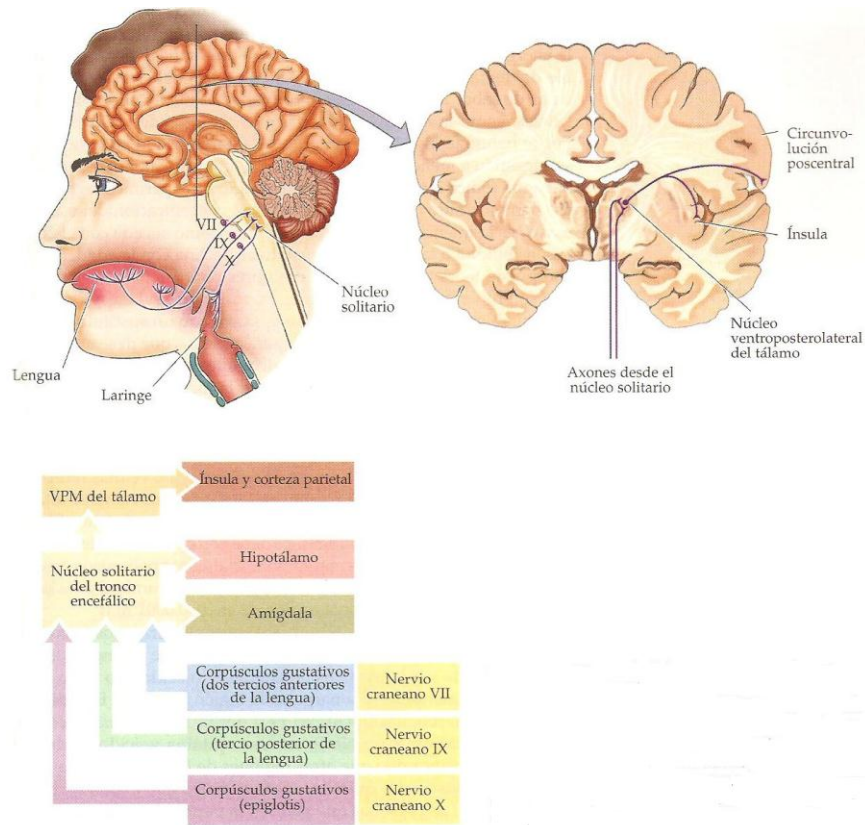


Figura 3. Organización del sistema gustativo humano
Tomada de Purves, 2001.

Todas las fibras gustativas se agrupan en el bulbo para terminar en la parte rostral del núcleo del tracto solitario, zona llamada “núcleo gustativo.” Los axones de las neuronas de este núcleo ascienden exclusivamente en forma ipsilateral y hacen sinapsis en la división parvo celular del núcleo ventroposteromedial del tálamo, luego de este relevo talámico, las fibras se proyectan a la corteza gustatoria primaria, ubicada en el extremo inferior de la circunvolución postcentral de la corteza parietal y en la ínsula anterior en el lóbulo frontal. Las células de estas estructuras se proyectan anteriormente hacia la parte caudal-lateral de la corteza orbitofrontal, conocida como corteza gustativa secundaria (Fuentes et al., 2010).

I.1.6 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

A nivel molecular la detección de los sabores se realiza por receptores localizados en la superficie de las microvellosidades de la membrana apical de las células gustativas y en función de la naturaleza del sabor el receptor pertenecerá a la familia de los receptores canal o a los acoplados a proteínas G.

Los estímulos gustativos interactúan con la porción apical de la membrana y los receptores gustativos o canales apicales producen una despolarización de las células receptoras, la cual puede ser directa o indirecta. El cambio de potencial conduce a la activación de canales iónicos dentro de la célula o libera algún neurotransmisor hacia las fibras nerviosas aferentes gustativas. Los canales de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje subyacen la generación de potenciales de acción; alrededor del 75% de las células receptoras presentes en las papilas fungiformes y caliciformes, son capaces de generar potenciales de acción, los cuales codifican a estímulos de intensidad o producen la despolarización necesaria para activar los canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje en la membrana basolateral (Chen et al., 2011).

I.1.6.1 MECANISMO MOLECULAR PARA LA TRANSDUCCIÓN DEL SABOR DULCE

Se cree que el sabor dulce ayuda en la detección de alimentos ricos en carbohidratos, por lo tanto garantiza los niveles adecuados de consumo de energía. Las sustancias de naturaleza dulce se unen a receptores específicos acoplados a proteínas G; la familia de los receptores T1R que comprenden a los miembros T1R1, T1R2 y T1R3, funciona como un heterodímero con la asociación del T1R2 y T1R3 formando un complejo macromolecular capaz de detectar compuestos dulces como sacarina, sacarosa, aminoácidos y algunas proteínas dulces (Sugita, 2006).

La estructura de los receptores dulces se puede separar en tres partes: el dominio heptahelicoidal, la región rica en cisteína, y el dominio N-terminal con un motivo llamado venus atrapamoscas. El dominio Venus atrapamoscas consta de dos subdominios globulares, el lóbulo superior N-terminal y el lóbulo inferior, que están conectados por una bisagra flexible de tres cadenas de cierre en donde las sustancias se unen en el interior (Figura 4). Existen una gran diversidad de estructuras y productos químicos que provocan el sabor dulce y activan los receptores, tales como mono- y disacáridos, aminoácidos, glucoproteínas, metabolitos secundarios de las plantas, diversos compuestos sintéticos, y ácido guanidin acético; lo que sugiere que interactúan con diferentes dominios del receptor. De hecho, el receptor dulce interactúa con las moléculas dulces utilizando las regiones extracelulares N-terminal, así como la región rica en cisteína y los dominios heptahelicoidales.

Las proteínas G están compuestas de tres subunidades α , β y γ localizadas en la cara citoplasmática de la membrana plasmática. La activación de una proteína G provoca la liberación del GDP (guanosín difosfato) y la unión de GTP (guanosín trifosfato) a la subunidad α , así como la disociación de las subunidades β / γ . Las subunidades β y γ pueden desencadenar diferentes cascadas de señalización para transmitir el estímulo (Galindo et al., 2012).

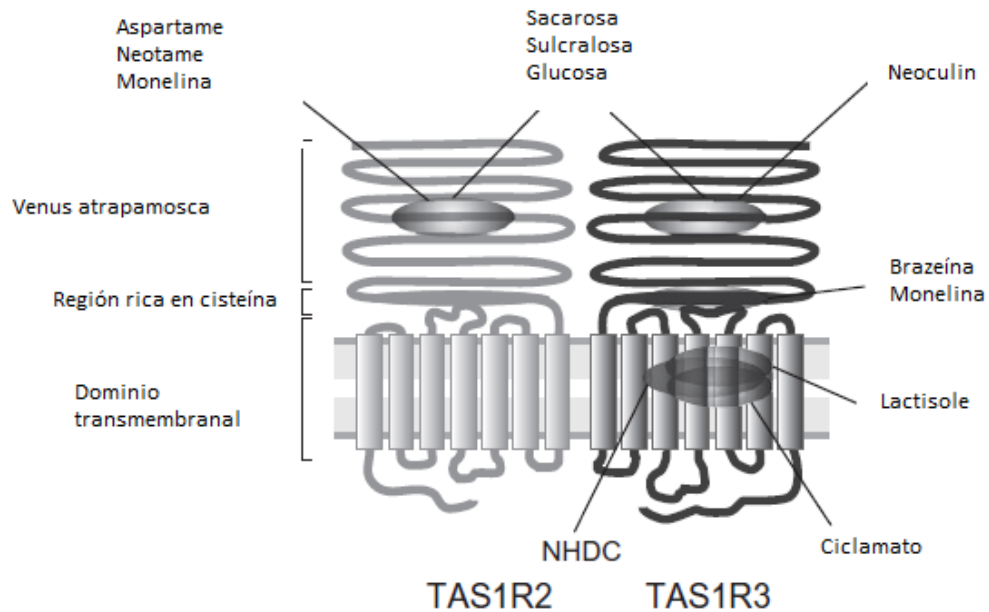


Figura 4. Estructura de los receptores para el sabor dulce.
Tomada de Galindo et al., 2012.

La activación de la subunidad α reduce los niveles intracelulares de cAMP, manteniendo la actividad de cAMP dependiente de la proteína quinasa A (PKA), así como del IP3R3 (inositol trifosfato) en el retículo endoplásmico, este estado sensible, permite la liberación eficiente de Ca^{2+} desde los almacenes internos (Figura 5).

Otra parte principal de la vía de transducción de sabor implica a la subunidad β , que activa a la PLC β 2 y genera IP3, que se une al IP3R3, lo que resulta en la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico al citosol. Esto, a su vez, abre el canal catiónico no selectivo TRPM5, llevando a la afluencia de Na^{+} y despolarizando la membrana plasmática de la célula. La elevación intracelular de los niveles de Ca^{2+} resulta en la apertura de canales y la liberación de ATP. El ATP no sólo transmite la señal de las células receptoras a los nervios aferentes,

sino que también da una retroalimentación autocrina activando las células presinápticas tipo III a través de receptores P2Y para estimular la secreción de los neurotransmisores serotonina (5-HT) y norepinefrina.

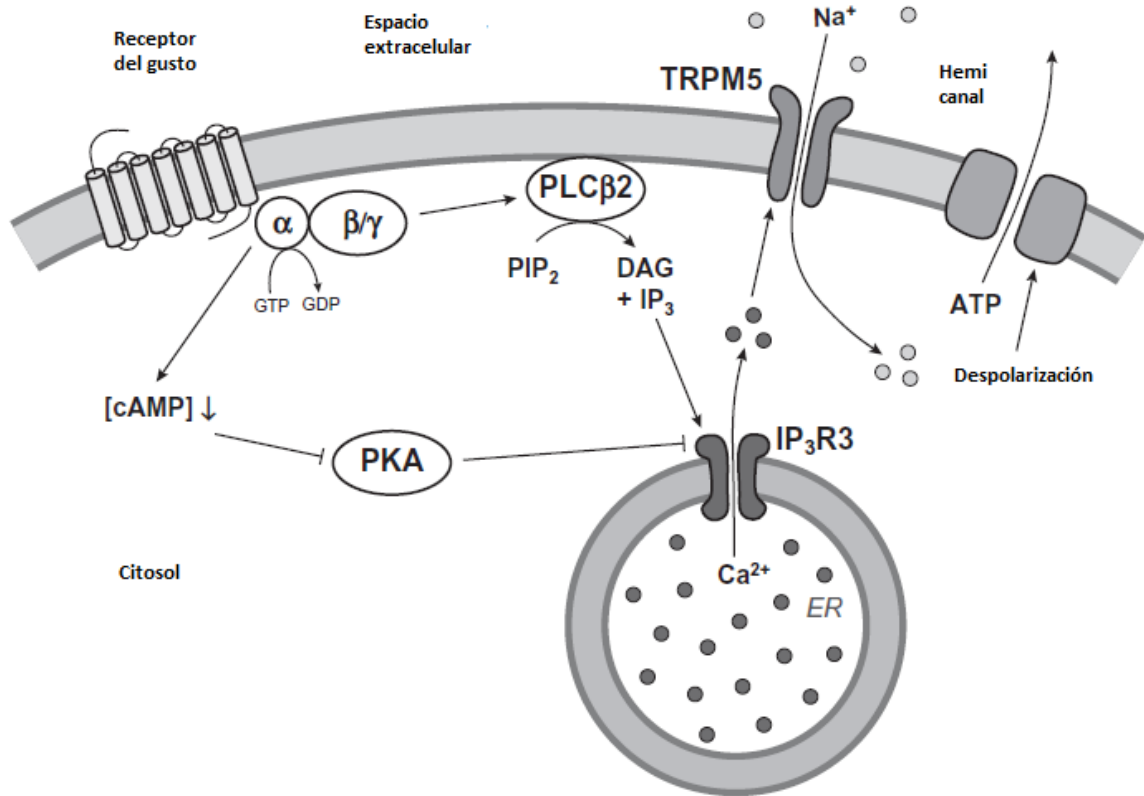


Figura 5. Vía de señalización para la transducción del sabor dulce.
Tomada de Galindo et al., 2012.

Dentro de las células, como unidades de procesamiento se pueden compartir señales eléctricas y/o segundos mensajeros tales como IP3 a través de la cercanía de poros. Por otro lado la secreción paracrina de norepinefrina, glutamato, colecistoquinina (CCK) y serotonina como neurotransmisores dentro de los botones gustativos, son otra vía de señalización celular, donde las células gustativas se comunican estrechamente entre sí y con las fibras aferentes sensoriales y proponen nuevos mecanismos que no implican sinapsis convencionales (Roper, 2006).

I.2 SEROTONINA Y SISTEMA GUSTATIVO

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) se localiza y sintetiza en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal y en las neuronas serotoninérgicas del sistema nervioso central (Filip y Bader, 2009).

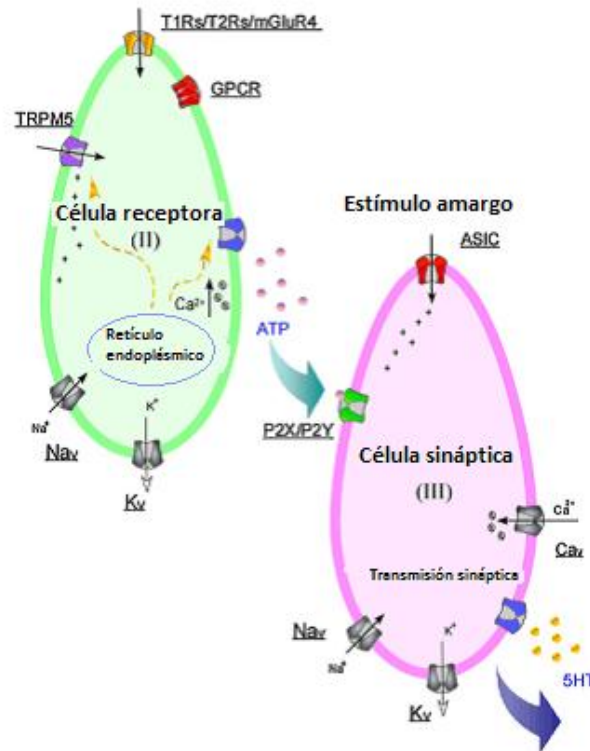


Figura 6. Comunicación célula-célula, tipo II a tipo III y liberación de 5-HT. Tomada de Chen et al., 2011.

La serotonina está involucrada en numerosas funciones en el cuerpo humano, tales como el control del apetito (Chernoff et al., 2012), el estado de sueño y la vigilia (Nakamaru et al., 2012), la memoria y el aprendizaje (Lihong et al., 2009), la regulación de la temperatura (Saadat et al., 2005), el humor, el comportamiento (Bravo et al., 2013), la función cardiovascular, la contracción muscular (Ljungvall et al., 2013), la regulación endocrina (Zheng et al., 2011) y la depresión (Prabhakar et al., 2015). A nivel periférico, la serotonina regula la función cardiovascular, la

motilidad intestinal y la agregación plaquetaria durante la coagulación (Scharinger et al., 2014).

El papel que desempeña la serotonina dentro de los trastornos de la alimentación como la bulimia y la anorexia nerviosa es de gran interés, ya que se ha puesto de manifiesto su papel regulador sobre el apetito por dos vías principales: por una parte la regulación motora y por otro la regulación del estado de ánimo y comportamientos compulsivos. Finalmente un papel que se le ha atribuido a la serotonina es su función como factor trófico. El aumento de la función serotoninérgica se relaciona con efectos anorexigénicos, latencia para la alimentación y volumen de alimento a ingerir, tanto en humanos como animales, efectos observados bajo administración de recapturadores selectivos de serotonina (Chernoff et al., 2012).

La serotonina es un transmisor liberado por las células gustativas presinápticas (Tipo III) en respuesta a: (a) estimulación ácida; o (b) la despolarización de la membrana celular (Galindo et al., 2012). Estudios cuantitativos en roedores documentan que las papilas gustativas contienen alrededor de un 14% de células serotoninérgicas, es decir, un botón gustativo de 50 a 100 células contiene de 7 a 13 células serotoninérgicas. El papel principal de la serotonina, en las papilas gustativas de los mamíferos es modular las señales del sabor, esto lo hace mediante la liberación de ATP como neurotransmisor y la expresión de los receptores 5HT1A en las células gustativas tipo II (Jaber et al., 2014).

1.2.1 BIOSÍNTESIS DE SEROTONINA (5-HT)

La serotonina tiene como precursor al aminoácido L-Triptófano (L-Trp.), el cual es un aminoácido esencial en el organismo, se encuentra en el plasma en dos fracciones, el 90% unido a la albumina y el otro 10% se encuentra en forma libre. La relación que guardan estas dos fracciones es la que determina que la fracción libre ingrese al cerebro a través de la BHE, para estimular o disminuir la síntesis de serotonina (Nada y Hirata, 1975; Fujimoto et al., 1987; Kim y Roper, 1995; Yee et al., 2001; Nagai et al., 1998; Zancanaro et al., 1995).

En los mamíferos la 5-HT es sintetizada a nivel periférico en las células enterocromafines del intestino en un 90% y en el sistema nervioso central en las neuronas serotoninérgicas del núcleo de Rafe en un 10%. El precursor inicial de la serotonina es el aminoácido L-triptófano; la 5-HT es sintetizada en dos etapas: 1) la hidroxilación del L-triptófano a 5-hidroxitriptófano por la triptófano-5-hidroxilasa (TPH) y 2) la descarboxilación del 5-hidroxitriptófano para generar la 5-hidroxitriptamina o serotonina a través de la descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos (Figura 7, Walther et al., 2003).

Síntesis de 5-HT

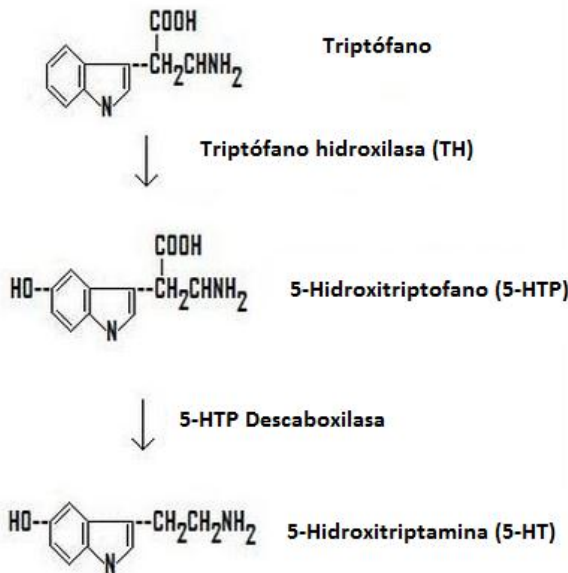


Figura 7. Síntesis de la serotonina a partir de L-triptófano.
Tomada de Walther et al., 2003.

Los modelos experimentales más empleados para elevar los niveles de serotonina sérica incluyen la manipulación con la administración de L-triptófano, en una presentación inyectable u oral. El triptófano es un aminoácido clasificado como “esencial” ya que no puede ser sintetizado por los organismos humanos y debe ser ingerido con la dieta. Una pequeña fracción de éste aminoácido

permanece libre, mientras que el resto (80-90%) se transporta de manera unida a albúmina a través de la sangre y hacia el cerebro; este transporte puede ser alterado por competencia de otros aminoácidos de alto peso molecular de cadena ramificada que incluyen a la valina, leucina, isoleucina así como la fenilalanina que se unen a los mismos transportadores. El consumo de L-triptófano como agente farmacológico está relacionado con la organización de ciclos circadianos, el sueño, el sistema inmunológicos entre otros, dada su capacidad para aumentar los niveles de serotonina circulante (Mateos et al., 2009).

Por otro lado, en los últimos 15 años ha aumentado el uso de la técnica de depleción (disminución de la concentración) de triptófano como herramienta para el estudio de los sistemas serotoninérgicos cerebrales. La depleción aguda de triptófano (ATD) es una técnica que produce una disminución en los niveles de serotonina *in vivo*. La síntesis cerebral de serotonina depende de la disponibilidad del triptófano plasmático. Es posible producir una rápida disminución de la disponibilidad de triptófano sustituyendo una dieta normal por un preparado de aminoácidos carente de triptófano. Esta situación produce una disminución en las concentraciones plasmáticas de triptófano e inhibe el transporte a través de la barrera hematoencefálica, y consecuentemente la síntesis y liberación cerebral de serotonina disminuye. La ATD es una técnica que consiste en la administración de un preparado de aminoácidos en el que no hay triptófano y que incluye otros aminoácidos neutros de cadena larga (LNAA) que compiten con el triptófano en la recaptación cerebral; cuando éste preparado se administra los niveles plasmáticos de triptófano disminuyen sustancialmente (60-80%) durante un período de unas 5 h. La reducción de los niveles de triptófano cerebral (y serotonina) es consecuencia de un descenso en la recaptación del triptófano cerebral (Díaz et al., 2006).

I.3 DIABETES MELLITUS

La Diabetes Mellitus (DM), es actualmente un problema de salud pública, que en México se encuentra entre los primeros lugares en muertes y es una de las principales causas de morbilidad relacionadas con retinopatía, nefropatía, enfermedades cardiovasculares, amputaciones y neuropatía periférica (ENSANUT, 2006). A nivel mundial se prevé que del 2.8% de la población que tenía esta enfermedad en el año 2000 aumente a 4.4% para el 2030. Se espera que el número total de personas con esta enfermedad en el mundo, aumente de 171 millones en el año 2000 a 366 millones en el 2030 (Wild, 2004).

La DM es una enfermedad caracterizada por hiperglucemia resultante de la acción deficiente de la insulina, que puede deberse a una inadecuada secreción de insulina y/o a una respuesta disminuida de los tejidos a la insulina. Uno de los mecanismos patogénicos en el desarrollo de la diabetes consiste en la destrucción autoinmune de las células beta del páncreas y la resistencia a la insulina en los tejidos resultando en una alteración del metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas (American Diabetes Association, 2003).

La diabetes se puede clasificar en cuatro categorías clínicas (Figura 8):

- Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1), debido a la destrucción de las células β pancreáticas, este tipo usualmente conduce a la deficiencia absoluta de insulina.
- Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), se debe a un defecto progresivo en la secreción de insulina, este tipo conduce a la resistencia a la insulina.
- Diabetes Mellitus gestacional (DMG), es toda diabetes diagnosticada durante el embarazo (American Diabetes Association, 2014).
- Otros tipos específicos de DM es debido a otras causas, por ejemplo, defectos genéticos en las funciones de las células β pancreáticas, defectos genéticos en la acción de la insulina, las enfermedades del páncreas (tales como la fibrosis

quística), y drogas (como en el tratamiento del VIH/SIDA inducido por productos químicos o después de un trasplante de órganos).

ETAPAS	Normo-glucemia		Hiperglucemia		
	Regulación normal de la glucosa	Glucemia alterada de ayuno (GAA) o intolerancia a la glucosa (ITG)	Diabetes mellitus		
			No insulino-requiriente (DM-NIR)	Insulino-requiriente para control (DM-IRC)	Insulino-requiriente para sobrevivir (DM-IRS)
TIPO					
DM tipo 1	←-----	-----	-----	-----	-----→
DM tipo 2	←-----	-----	-----	-----→	
Otros tipos	←-----	-----	-----	-----→	
Diabetes gestacional	←-----	-----	-----	-----→	

Figura 8. Clasificación de la Diabetes Mellitus por tipos y etapas. Tomada de ALAD, Asociación Latinoamericana de Diabetes, 2006.

I.3.1 DIABETES MELLITUS TIPO I AUTOINMUNE (DM1)

Antes conocida como diabetes insulino-dependiente o diabetes de comienzo juvenil, es un trastorno autoinmune que implica la destrucción de las células beta del páncreas por macrófagos y células T que se infiltran en los islotes pancreáticos. El inicio de la DM1 generalmente ocurre en la infancia y la edad adulta temprana (<35 años). De etiología genética, los estudios genéticos han demostrado que el gen HLA (antígeno de leucocitos humanos) en el cromosoma 6 se asocia estrechamente con DM1. Existe evidencia que sugiere que ciertos virus pueden ser responsables en el desencadenamiento de DM1 (Kirti et al., 2012.)

En esta forma de diabetes, la tasa de destrucción de las células β es muy variable, siendo rápido en algunos individuos (principalmente los niños) y lento en otros (principalmente adultos). Algunos pacientes, especialmente los niños y adolescentes, pueden presentar cetoacidosis como primera manifestación de la enfermedad. Otros tienen hiperglucemia moderada en ayunas, que puede cambiar rápidamente a la hiperglucemia y/o cetoacidosis grave en presencia de alguna infección o de algún tipo de estrés. Otros, especialmente los adultos, pueden conservar una función residual de las células β suficiente para prevenir

cetoacidosis por muchos años. Estas personas eventualmente se convierten en dependientes de insulina para sobrevivir y están en riesgo de cetoacidosis; en esta última etapa de la enfermedad, hay poca o ninguna secreción de insulina, que se manifiesta por niveles bajos o indetectables de péptido-C en el plasma (American Diabetes Association, 2013).

La destrucción autoinmune de las células β tiene múltiples predisposiciones genéticas y está relacionada con factores ambientales que todavía no están bien definidos. Aunque los pacientes rara vez son obesos cuando se presentan con este tipo de diabetes, la presencia de la obesidad no es incompatible con el diagnóstico. Estos pacientes también son propensos a otros trastornos autoinmunes como la enfermedad de Graves, Tiroiditis de Hashimoto, Vitíligo, enfermedad celiaca de Addison, hepatitis autoinmune, Miastenia gravis, y anemia perniciosa (American Diabetes Association, 2013).

La DM1 suele desarrollarse repentinamente y puede producir síntomas tales como: sed anormal y sequedad de boca, micción frecuente, falta de energía, cansancio extremo, hambre constante, pérdida repentina de peso, heridas de cicatrización lenta, infecciones recurrentes y visión borrosa.

I.3.2 DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DM2)

La DM2 se caracteriza por la síntesis y secreción insuficiente de insulina, secundaria a la resistencia de los tejidos a la insulina. Se diagnostica normalmente después de la cuarta década de la vida, y es responsable de aproximadamente el 90% de toda la diabetes en todo el mundo. La incidencia y la prevalencia de la DM2 aumentan con la edad, ésta se divide en dos subgrupos, la diabetes con obesidad y sin obesidad. Los pacientes con DM2 con obesidad suelen desarrollar resistencia a la insulina endógena debido a alteraciones en los receptores insulínicos (INSR), y esto se asocia con la distribución de la grasa abdominal. (Kirti et al., 2012).

La DM2 representa el 90-95% de las personas con diabetes, abarca a individuos que tienen resistencia a la insulina y por lo general tienen relativa (no absoluta) deficiencia de insulina. Al menos inicialmente, y con frecuencia durante toda su vida, estas personas no necesitan tratamiento con insulina para sobrevivir. Probablemente hay muchas diferentes causas de este tipo de diabetes.

Aunque las etiologías específicas no son conocidas, la destrucción autoinmune de las células β no ocurre en estos casos, y los pacientes no comparten ninguna de las otras causas de la diabetes mencionadas anteriormente.

La mayoría de los pacientes con esta forma de diabetes son obesos, y la obesidad en sí causa un cierto grado de resistencia a la insulina. Los pacientes que no son obesos pueden tener un mayor porcentaje de grasa corporal distribuida predominantemente en la región abdominal. La cetoacidosis rara vez ocurre espontáneamente en este tipo de diabetes; cuando se ve, por lo general surge en asociación con el estrés como en presencia de alguna infección.

Esta forma de diabetes con frecuencia no se diagnostica por muchos años debido a que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente y a menudo no es lo suficientemente grave como para que el paciente pueda notar alguno de los síntomas clásicos de la diabetes. Sin embargo, estos pacientes presentan mayor riesgo de desarrollar complicaciones macrovasculares y microvasculares.

Considerando que los pacientes con esta forma de la DM pueden tener los niveles de insulina normales insulina ya que la función de sus células β es normal, pero mayor serán los niveles de glucosa en sangre. La resistencia a la insulina puede mejorar con la reducción de peso y / o tratamiento farmacológico de la hiperglucemia, pero rara vez es restaurada a la normalidad. El riesgo de desarrollar esta forma de DM aumenta con la edad, la obesidad y la falta de actividad física. Se produce con mayor frecuencia en las mujeres con DMG previa y en individuos con hipertensión o dislipidemia, y su frecuencia varía en diferentes subgrupos raciales / étnicos. A menudo se asocia con una fuerte predisposición genética, más que la DM1 autoinmune. Sin embargo, la genética de esta forma de

diabetes es compleja y no completamente definida (American Diabetes Association, 2013).

Aunque todavía no se conocen las causas del desarrollo de la DM2, hay varios factores de riesgo importantes. Por ejemplo:

- La obesidad.
- La mala alimentación.
- La inactividad física.
- Los antecedentes familiares de diabetes.
- El grupo étnico.
- La alta glucosa en sangre durante el embarazo.

I.3.3 OTROS TIPOS DE DIABETES MELLITUS

Esta variedad comprende un grupo causal heterogéneo (Figura 9), que abarca los casos de diabetes en que las causas se establecen o por lo menos se conocen parcialmente. Estas causas comprenden defectos genéticos conocidos que alteran el funcionamiento de las células beta o la acción de la insulina, trastornos del páncreas exocrino, endocrinopatías, diabetes inducida por medicamentos o químicos, infecciones, formas no comunes de diabetes autoinmune y otros síndromes genéticos asociados con la DM (American Diabetes Association, 2003).

Defectos genéticos de la función de la célula beta	Defectos del cromosoma 20, HNF-4alfa (antes MODY 1), del cromosoma 7, glucoquinasa (antes MODY 2), del cromosoma 12, HNF-1alfa (antes MODY 3), del DNA mitocondrial y otros
Defectos genéticos en la acción de la insulina	Resistencia a la insulina tipo A, leprechaunismo, síndrome de Rabson-Mendenhall, diabetes lipotrófica y otros
Enfermedades del páncreas exocrino	Pancreatitis, trauma del páncreas, pancreatocoma, neoplasia del páncreas, fibrosis quística, hemocromatosis, pancreatopatía fibrocalcúscula y otros
Endocrinopatías	Acromegalia, síndrome de Cushing, glucagonoma, feocromocitoma, hipertiroidismo, somatostatina, aldosteronoma y otros
Inducida por drogas o químicos	Vacor, pentamidina, ácido nicotínico, glucocorticoides, hormonas tiroideas, diazóxido, agonistas betaadrenérgicos, tiazidas, fenitoína, alfa-interferón y otros
Infecciones	Rubéola congénita, citomegalovirus y otros
Formas poco comunes de diabetes mediada inmunológicamente	Síndrome del "hombre rígido" ("stiff-man syndrome"), anticuerpos contra el receptor de la insulina y otros
Otros síndromes genéticos algunas veces asociados con diabetes	Síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, síndrome de Turner, síndrome de Wolfram, ataxia de Friedreich, corea de Huntington, síndrome de Lawrence Moon Beidel, distrofia miotónica, porfiria, síndrome de Prader Willi y otros

Figura 9. Otros tipos específicos de Diabetes Mellitus.
Tomada de ALAD, Asociación Latinoamericana de Diabetes, 2006.

I.3.4 DIABETES MELLITUS GESTACIONAL (DMG)

La DMG se define como una alteración del metabolismo de los hidratos de carbono, de severidad variable, que se inicia o se reconoce por primera vez durante el embarazo. Se aplica independientemente de si se requiere o no insulina, o si la alteración persiste después del embarazo y no excluye la posibilidad de que la alteración metabólica haya estado presente antes de la gestación.

La frecuencia de la DMG es mayor conforme avanza la edad, en las mujeres con sobrepeso y en las razas o etnias de África o Asia. El factor aislado más compatible con una tolerancia oral alterada a la glucosa durante el embarazo es la edad. Las mujeres con DMG tienen mayor riesgo de desarrollar DM2 después del embarazo (American Diabetes Association, 2003).

I.3.5 PREVALENCIA MUNDIAL DE LA DIABETES MELLITUS

La diabetes en todas sus formas impone costos humanos, sociales y económicos inaceptables en países de todos los niveles de ingresos. A continuación se proporcionan pruebas consistentes del continuo crecimiento de las tasas de incidencia y prevalencia de la diabetes en todo el mundo. A pesar de la gran variedad de herramientas a nuestra disposición para hacer frente a la enfermedad como tratamientos farmacológicos eficaces, tecnología avanzada, estrategias educativas y preventivas que cada vez son mejores, se está perdiendo la batalla de proteger a las personas frente a la diabetes y sus complicaciones que producen discapacidad y riesgo para la vida (FID, 2013).

Los cálculos más recientes de la FID indican que el 8,3% de los adultos, es decir 382 millones de personas tienen diabetes, y el número de personas con la enfermedad se incrementará en más de 592 millones en menos de 25 años. Sin embargo, son 175 millones de casos no diagnosticados actualmente, una gran cantidad de personas con diabetes van a desarrollar progresivamente complicaciones de las que no son conscientes. Por otra parte, el 80% del número total de afectados viven en países de ingresos medios y bajos, donde la epidemia se está acelerando a un ritmo alarmante.

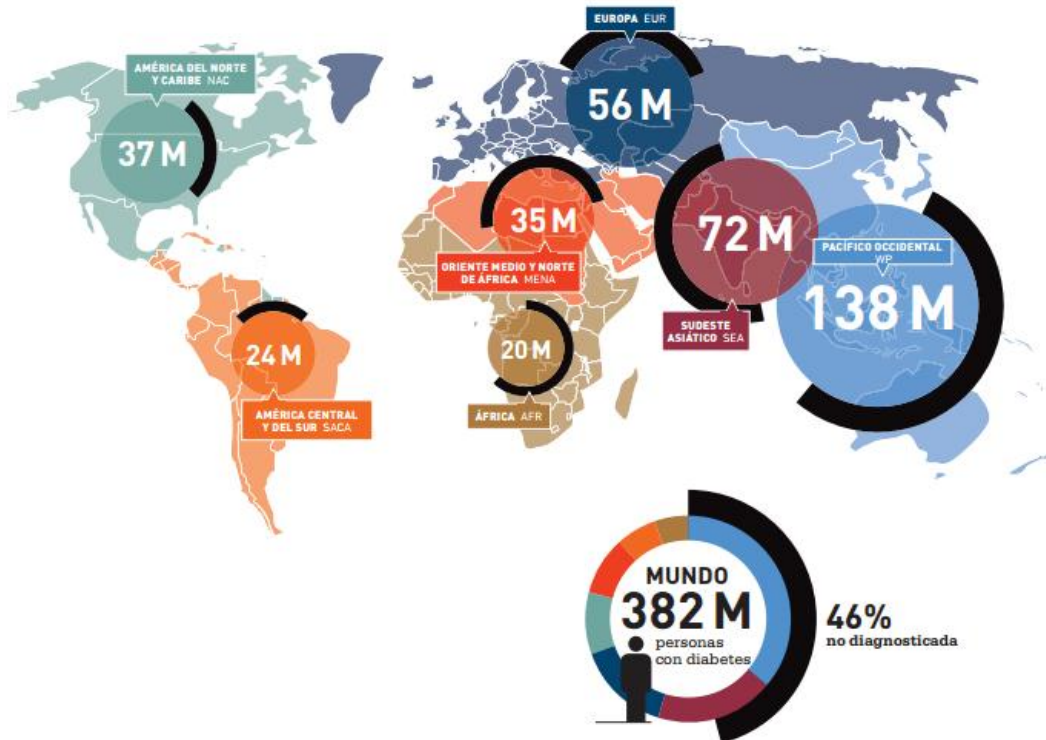


Figura 10. Número de personas con Diabetes Mellitus por región. Tomada de FID, 2013.

I.3.6 PREVALENCIA EN MÉXICO DE LA DIABETES MELLITUS

La prevalencia global de la DM está aumentando rápidamente como resultado del envejecimiento de la población, la urbanización y los cambios asociados al estilo de vida. Permanece como una causa importante de morbilidad y mortalidad prematura en todo el mundo, respecto al comportamiento de esta enfermedad en México, de 1998 al 2012 se ha observado una tendencia hacia el incremento en un 4.7%, pasando de una tasa de morbilidad de 342.1 a 358.2 casos por cada 100 mil habitantes. Específicamente en el año 2012 se reportaron 418,797 pacientes diagnosticados con diabetes (lo cual representa el 0.4% de la población mexicana), el 59% de los casos fueron del sexo femenino, siendo el grupo etario de 50-59 años de edad el más afectado, con una tasa de morbilidad de 1,237.90 casos por cada 100 mil habitantes. Cabe señalar que el comportamiento que presenta esta patología es hacia el incremento, si la tendencia permanece igual se

espera que para el año 2030 haya un aumento del 37.8% en el número de casos y 23.9% en la tasa de morbilidad.

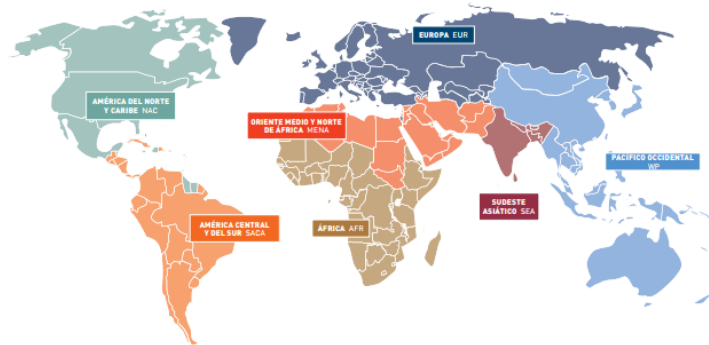
La prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo en personas de 20 años o más en Michoacán fue de 7.6%, mayor a la reportada en la ENSANUT 2006 (5.8%). En base a un diagnóstico médico previo, la prevalencia de DM fue ligeramente mayor en mujeres (8.5%) que en hombres (6.6%), con una razón mujer:hombre de 1.3:1. Tanto en hombres como en mujeres, se observó un incremento en la prevalencia de DM a partir del grupo de 40 a 59 años de edad (6.7 y 15.6%, respectivamente), la cual aumentó marcadamente en hombres de 60 años o más (20.5%) y ligeramente en mujeres de la misma edad (18.2%) (ENSANUT., 2012).



Figura 11. Porcentaje de población diagnosticada con DM. Tomada de ENSANUT, 2012.

I.3.7 PROYECCIONES A NIVEL MUNDIAL DE NÚMERO DE PERSONAS CON DIABETES MELLITUS 2013-2035

Las diferentes regiones están siendo afectadas en diferentes grados. Con más de 138 millones de personas afectadas, el Pacífico Occidental tiene más personas con diabetes que cualquier otra región. En el otro extremo del ranking regional de la diabetes, la población con diabetes de África es actualmente la más pequeña entre todas las regiones. Sin embargo, en el año 2035 será el doble, lo que resulta una complicación más para la capacidad de desarrollo del continente Africano. El panorama es igualmente preocupante en América Central y del Sur, donde se prevé que la población con diabetes aumente en un 60% en el año 2035. El rápido desarrollo ha conducido a una epidemia de la diabetes de rápido crecimiento en el Sudeste Asiático, lo que representa cerca de una quinta parte del total de casos en todo el mundo. Del mismo modo, la riqueza y el desarrollo en Oriente Medio y Norte de África han conducido a una gran proporción de diabetes, y uno de cada diez adultos de la región tiene la enfermedad.



REGIÓN DE LA FID	2013 MILLIONES	2035 MILLIONES	AUMENTO %
● África	19,8	41,4	109%
● Oriente Medio y Norte de África	34,6	67,9	96%
● Sudeste Asiático	72,1	123	71%
● América Central y del Sur	24,1	38,5	60%
● Pacífico Occidental	138,2	201,8	46%
● América del Norte y Caribe	36,7	50,4	37%
● Europa	56,3	68,9	22%
Mundo	381,8	591,9	55%

Figura 12. Proyecciones del número de personas con DM por regiones Tomada de FID, 2013.

I.3.8 COMPLICACIONES DE LA DIABETES MELLITUS

Las personas con diabetes corren el riesgo de desarrollar una serie de problemas de salud que pueden provocar discapacidad o la muerte (Figura 13). Los altos niveles de glucosa constantes en sangre pueden conducir a enfermedades graves que afectan al corazón y a los vasos sanguíneos, ojos, riñones y nervios. Las personas con diabetes también tienen un mayor riesgo de desarrollar infecciones. En casi todos los países desarrollados, la diabetes es la principal causa de las enfermedades cardiovasculares, la ceguera, la insuficiencia renal y la amputación de miembros inferiores; y a medida que la prevalencia de la diabetes tipo 2 crece en países subdesarrollados y no desarrollados, también lo hace el impacto de estas costosas complicaciones, tanto en términos humanos como económicos. El mantenimiento de los niveles normales de glucosa en sangre, presión arterial y colesterol puede ayudar a retrasar o prevenir las complicaciones de la diabetes (DIABETES CARE, 2013).

I.3.8.1 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

La enfermedad cardiovascular es la causa más común de muerte y discapacidad entre las personas con diabetes. Algunas de las enfermedades cardiovasculares que acompañan a la diabetes son la angina de pecho, el infarto de miocardio (ataque al corazón), la enfermedad arterial periférica y la insuficiencia cardíaca congestiva. En las personas con diabetes, la presión arterial alta, el colesterol alto, la alta glucosa en sangre y otros factores de riesgo contribuyen al aumento del riesgo de complicaciones cardiovasculares (FID, 2013).

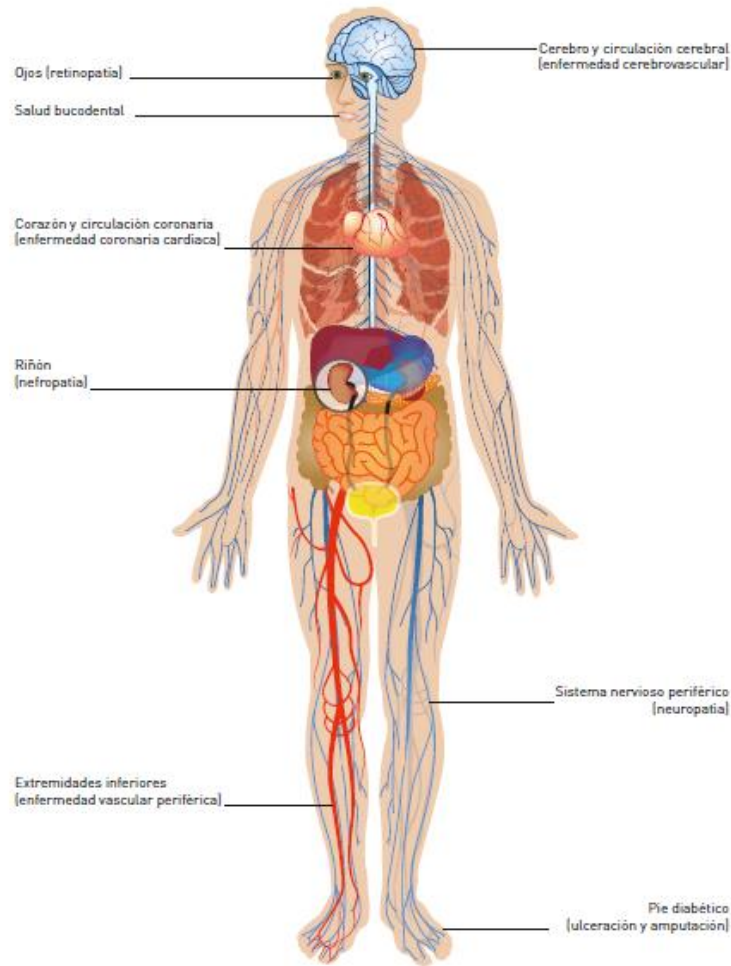


Figura 13. Complicaciones de la Diabetes Mellitus
Tomada del Atlas de Diabetes de FID, 2013.

I.3.8.2 ENFERMEDADES RENALES

La enfermedad renal (nefropatía) es mucho más común en personas con diabetes que en las personas sin ella; y la diabetes es una de las principales causas de enfermedad renal crónica. Esta enfermedad es causada por el daño a los pequeños vasos sanguíneos, que puede provocar que los riñones sean menos eficientes, o que fallen por completo. El mantenimiento de niveles normales de glucosa en sangre y presión arterial puede reducir en gran medida el riesgo de nefropatía (ADA, 2009).

I.3.8.3 RETINOPATÍA

Muchas personas con diabetes desarrollan algún tipo de enfermedad de los ojos (retinopatía), que puede dañar la visión o provocar ceguera. La persistencia de altos niveles de glucosa en sangre, junto con la presión arterial alta y el colesterol alto, son la principal causa de retinopatía. La red de vasos sanguíneos que irrigan la retina puede bloquearse y dañarse, lo que lleva a la pérdida permanente de la visión. La retinopatía se puede tratar a través de controles regulares de los ojos y manteniendo uno niveles normales de glucosa (FID, 2013).

I.3.8.4 NEUROPATÍA DIABÉTICA

En la DM existe una neuropatía que causa diversas alteraciones del sistema nervioso, las cuales se manifiestan de diversas maneras. Cuando la glucosa en sangre y la presión arterial son demasiado elevadas, la diabetes puede provocar daño en el sistema nervioso de todo el cuerpo (neuropatía). Pueden producirse problemas con la digestión, la orina y disfunción eréctil, además de otras funciones, pero las zonas más comúnmente afectadas son las extremidades, particularmente los pies. Los daños en los nervios de estas zonas representan la neuropatía periférica, y puede conducir dolor, hormigueo y pérdida de sensibilidad. La pérdida de sensibilidad de los miembros distales es particularmente importante, ya que puede permitir que las lesiones pasen desapercibidas, dando lugar a infecciones graves y úlceras, enfermedad del pie diabético y amputaciones mayores (ADA, 2003).

I.4 ALTERACIONES GUSTATIVAS

Se ha encontrado que durante el curso de la DM se encuentra una disminución de la percepción gustativa, en pacientes con diagnóstico de diabetes tipo I y II que puede deberse a la neuropatía (Mau-Hui, 2006), sin embargo, se desconocen los

mecanismos por los cuales la DM causa estos cambios en la percepción gustativa.

La pérdida de la sensibilidad gustativa (ageusia), alteraciones en la percepción gustativa (disgeusia), y/o olfativa (anosmia), se asocian con la disminución de peso, desnutrición, desórdenes inmunitarios así como a la degradación del estado de salud general de personas mayores (Mattes y Cowart, 1994; Winkler et al., 1999). Por otro lado, las personas que sufren de hipertensión arterial muestran un umbral elevado para las sustancias saladas pudiendo explicar, de esta manera, el sobreconsumo de sal en estos individuos. En el área nutricional, se observa una correlación negativa entre la severidad de la pérdida de la sensibilidad gustativa (disgeusia) y los aportes calóricos (Kettaneh et al., 2002). Por otro lado, ciertas formas de obesidad, debido a un consumo anárquico de alimentos con alto contenido energético, al parecer se asocian a una disfunción de la percepción gustativa (Stolbova et al., 1999). También existe una asociación entre los desórdenes del gusto y la depresión, por una parte, los pacientes depresivos señalan frecuentemente sensaciones gustativas desagradables (Miller et al., 1989) y, por otra, un estado depresivo es frecuente en los pacientes disgeúsicos (Deems et al., 1991). Además, ciertas patologías son acompañadas de ageusia y de anosmia en particular la esquizofrenia, la enfermedad de Alzheimer y la anorexia, donde la disgeusia se vincula a una carencia de zinc que afecta el gusto (Casper et al., 1980). De la misma manera, se ha encontrado una elevación del umbral gustativo en pacientes con diagnóstico de diabetes de tipo I y II (Le Floch et al., 1989, 1990; Stolbova et al., 1999).

II. JUSTIFICACIÓN

Dentro de las manifestaciones de la DM se ha reportado que existe pérdida de sensibilidad a los estímulos gustativos, en los pacientes con DM el umbral de percepción gustativa para soluciones dulces se encuentra elevado, por lo cual estos pacientes consumen una mayor cantidad de azúcar para lograr el estímulo al sabor dulce, éste hecho está correlacionado con la severidad de la neuropatía periférica aumentando la degeneración de las fibras gustativas y tiene como consecuencias una disminución en la expresión de los receptores del gusto azucarado y una disminución en el número de corpúsculos gustativos en la papila caliciforme, siendo esto parte del mecanismo por el cual se altera la percepción gustativa. Existen reportes de nuestro laboratorio que indican una disminución en la expresión de los receptores implicados en la percepción dulce así como una reducción en el número de corpúsculos gustativos en la papila caliciforme de ratas con DME, por otro lado existen reportes en los que se muestra una disminución de la síntesis de serotonina en ratas con DME, no se conoce si la estimulación de la síntesis de serotonina mediante la administración de su precursor el L-Trp modifica la expresión de los receptores de la percepción del sabor dulce (T1R2/T1R3) y el número de corpúsculos gustativos en la papila caliciforme de ratas con DME por lo que en el presente trabajo planteamos la siguiente hipótesis:

III. HIPÓTESIS:

La administración de L-Trp incrementa la expresión del RNAm de los receptores T1R2/T1R3 y el número de corpúsculos en la papila caliciforme de ratas con DME.

IV. OBJETIVO GENERAL

-Determinar si la estimulación de sistema serotoninérgico a través de la administración de L-Trp. produce cambios en la expresión de los receptores T1R2 y T1R3 y en el número de corpúsculos gustativos en la papila caliciforme de ratas con Diabetes Mellitus Experimental.

IV.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Determinar los cambios en la percepción gustativa para el sabor dulce en ratas con DME tratada con L-Trp.
- 2.- Determinar los cambios en la expresión del RNAm de los receptores T1R2/T1R3 en la papila caliciforme de ratas con DME tratadas con L-Trp.
- 3.- Determinar el efecto del L-Trp sobre el número de corpúsculos gustativo en la papila caliciforme de ratas con DME.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1 ANIMALES

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar Porton de 200g \pm 20g de peso corporal; mantenidas bajo condiciones ambientales controladas de ciclos de luz-oscuridad de 12 hrs. cada uno, humedad relativa del 80% y temperatura de 20-25°C y con régimen nutricional *ad libitum* tanto de agua como de alimento purina Chow.

V. 2 INDUCCION DE LA DME:

Las ratas fueron administradas con 55 mg/kg de peso corporal de estreptozotocina, para inducir la DME, previo a la administración se determinó la concentración de glucosa sanguínea y a las 48 hs se les determinó nuevamente la glucosa para corroborar el efecto de la estreptozotocina.

V.3 ADMINISTRACIÓN DEL L-Trp:

A las ratas se les estimuló la síntesis de serotonina a través de la administración de 100 mg/kg de peso del aminoácido L-Trp. vía intraperitoneal durante 5 días en dos etapas de la inducción de la DME, la tercera y séptima semana de inducción de la DME, así como un tercer grupo fue administrado tanto en la tercera y la séptima semana posterior a la administración de la estreptozotocina.

V.4 DETERMINACIÓN DE LA PERCEPCIÓN DEL SABOR DULCE:

Se proporcionó a cada grupo una solución de sacarosa al 10% y agua potable en un volumen de 400 ml cada uno por envase y se realizó la medición de la ingesta en un periodo de 24 horas una vez cada semana.

V.5 OBTENCIÓN DE TEJIDOS

Al final de la cuarta y octava semana de inducción de la DME, 24 h después de la última administración de L-Trp, se sacrificaron a los animales de los grupos, mediante fractura cervical. Las ratas se decapitaron y de inmediato se les extrajo

la lengua, para obtener por micro-disección la papila caliciforme, para ser depositadas en tubos Eppendorf libre de RNasas y DNasas que contenían TRIZOL[®], en una proporción de 100 mg de tejido por 1 ml, y posteriormente se homogeneizaron con el empleo de un mini polytron para los tejidos que se utilizaron para la determinación de los niveles de expresión; las lenguas que fueron utilizadas para realizar los cortes histológicos fueron sumergidas en solución de paraformaldehído al 4% en un Buffer Salino de Fosfatos, PAF/PBS para su fijación y conservadas a 4° para su posterior procesamiento.

V. 6 DETERMINACION DE LA EXPRESION DE RECEPTORES T1R2/T1R3:

Una vez homogeneizadas las papilas, se dejaron reposar por 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Posteriormente se agregaron 200 µl de cloroformo por cada ml de TRIZOL[®], se agitó vigorosamente y se dejó reposar por 15 minutos a TA y se centrifugó a 12, 000 rpm durante 15 min a 4°C, el ARN se recuperó de la fase acuosa, la cual se depositó en un tubo Eppendorf libre de RNasas y DNasas, para enseguida agregar 500 µl de isopropanol por cada ml de TRIZOL[®], se agitó y se dejó reposar por 10 min a TA y se centrifugó a 12 000 rcf por 10 min a 4°C. Transcurrido el tiempo el sobrenadante fue decantado y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó a 12 000 rcf durante 2 min a 4°C. Se eliminó el etanol y se dejó secar durante 10 min a TA.

El ARN fue resuspendido en 20 µl de agua libre de nucleasas para las papilas. El ARN obtenido fue tratado con DNasa I (Sigma) para remover la contaminación por ADN, empleando 1 unidad de DNasa por 1 µg de ARN, durante 20 min a 37°C. La concentración de ARN fue determinada por espectrofotometría a 260 y 280 nm en una dilución 1:50 con agua libre de nucleasas.

Para la síntesis de ADNc se utilizaron 5 µg de ARN total usando la enzima transcriptasa reversa (Sigma). La reacción fue llevada en un volumen total de 20 µl siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada reacción se corrió un control,

en el cual la enzima fue sustituida por agua, dicho control se identificó como RT negativo. En la tabla 1 se muestran las condiciones de la reacción.

Tabla 1. Condiciones de reacción para la RT (Sigma).

Componente	Control positivo	Control negativo
Agua libre de nucleasas	c.b.p. 10 μ l	c.b.p. 11 μ l
dNTP's (10mM)	1 μ l	1 μ l
Oligo dT	1 μ l	1 μ l
ARN total	5 μ g	5 μ g
	Calentar a 70°C por 10 min	Calentar a 70°C por 10 min
Buffer 10X	2 μ l	2 μ l
Enzima RT	1 u	--
	Calentar a 37°C por 60 min	Calentar a 37°C por 60 min
Volumen final	20 μ l	20 μ l

Para la determinación de los niveles de expresión de los receptores T1R2/T1R3 mediante la PCR, se utilizaron 2 μ l del producto de la reacción de la RT. La amplificación se realizó en una mezcla para PCR constituida por 2 μ l de buffer 10X PCR, 1.6 μ l de Mg²⁺ 25 mM, 0.8 μ l de dNTP's (5mM), 0.8 μ l de oligonucleótidos, 2.5 U de Taq ADN polimerasa (0.5 μ l), para un volumen final de 20 μ l. Las condiciones de reacción de PCR para los receptores se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones para PCR

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
DESNATURALIZACIÓN	95 °C	5 minutos	1
DESNATURALIZACIÓN	95 °C	45 segundos	
ALINEAMIENTO			
β-ACTINA	59 °C	45 segundos	30
T1R2	56 °C	45 segundos	38
T1R3	53 °C	45 segundos	38
EXTENSIÓN	72 °C	1 minuto	
INACTIVACIÓN	72 °C	7 minutos	1

En la tabla 3 se muestran los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos específicos de los receptores para la percepción dulce así como de la β-actina.

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos específicos empleados para la PCR

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño de Fragmento (pb)
β- actina (sentido)	5´- CCGTAAAGACCTCTATGCCA -3´	298
β-actina (anti sentido)	5´- AAGAAAGGGTGTAAAACGCA -3´	
T1R2 (sentido)	5´- GAGCTGCCAGCCAGGGCAAA -3´	200
T1R2 (anti sentido)	5´- CTTCGTGCCACTCCAGGAAGGT -3´	
T1R3 (sentido)	5´- CACGCTCTGCCAGCTGCCTT -3´	200
T1R3 (anti sentido)	5´- TGCAGCCTCCACAAGAGTGGC - 3´	

V.7 CORTES HISTOLÓGICOS Y CONTEO DE CORPÚSCULOS GUSTATIVOS.

Para poder valorar los efectos de la DME y el tratamiento con L-triptófano en el número de corpúsculos gustativos de la papila caliciforme, se realizaron cortes histológicos utilizando un criostato perteneciente al laboratorio de Eco-Fisiología animal del INIRENA. Los cortes fueron realizados con un espesor de 16 μm , posteriormente los cortes fueron teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina. Los cortes elegidos para la evaluación del número de corpúsculos, se seleccionaron en función del número total de cortes por papila, y contando a triple ciego por triplicado. Los corpúsculos gustativos fueron contados por triplicado en corte secuencial usando el método modificado de Bradley et al, (1980), revisando cada papila en corte secuencial, en todos los grupos de estudio.

V.8 PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

Posterior al sacrificio de los animales se realizó una incisión media torácica exponiendo el corazón para la obtención de la muestra sanguínea para las pruebas bioquímicas de lípidos, glucosa y hemoglobina glicosilada entre otros y posteriormente la perfusión en el ventrículo izquierdo con solución salina isotónica fría al 0.9%, para remover la sangre de los tejidos. Se realizó la medición de los niveles de glucosa periférica con un glucómetro (One Touch Ultra), esta medición se realizó a todos los grupos. La medición final de glucosa se realizó con la extracción de muestra sanguínea directa del corazón. Se realizó la medición de los niveles de colesterol, triglicéridos, lípidos totales, colesterol de baja densidad (LDL), colesterol de alta densidad (HDL), colesterol de muy baja densidad (VLDL) en la sangre obtenida del corazón al momento de sacrificio de los animales de los respectivos grupos.

V.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el análisis de los datos obtenidos de la densitometría en los geles de agarosa se utilizó el programa "Image J". Para el análisis de los resultados se utilizó el programa Sigma Plot 11.0 para calcular diferencias significativas entre los grupos empleando para ello la prueba de análisis de varianza y comparación de medias por la prueba Tukey-Kramer con $P < 0.05$ en el análisis de varianza.

VI. RESULTADOS.

VI.1 INDUCCIÓN DE DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL.

Para la inducción del modelo experimental se administró a las ratas estreptozotocina, 55 mg/kg de peso corporal para inducir la DME, previo a la administración se determinó la concentración de glucosa sanguínea y a las 48 hs se les determinó nuevamente la glucosa para corroborar el efecto de la estreptozotocina. Como ya están ampliamente establecidos los parámetros característicos de la DM, que son la hiperglicemia, la polidipsia, la polifagia y la pérdida de peso entre otros.

La hiperglucemia es el signo principal en la DM. El monitoreo que se les realizó a los grupos fue antes de la inducción y al comienzo del modelo de DME para corroborar efecto de la estreptozotocina 48 horas después de su administración, en la Fig. 14 se observa que los grupos controles mostraron niveles de glucosa dentro del rango de los valores normales establecidos para las ratas (90-110 mg/dl), mientras que las ratas administradas con estreptozotocina mostraron la presencia de hiperglicemia y ésta permaneció durante las 4 y 8 semanas en las cuales se sacrificaron las ratas respectivamente. La administración de L-Trp, no modificó los niveles de glucosa.

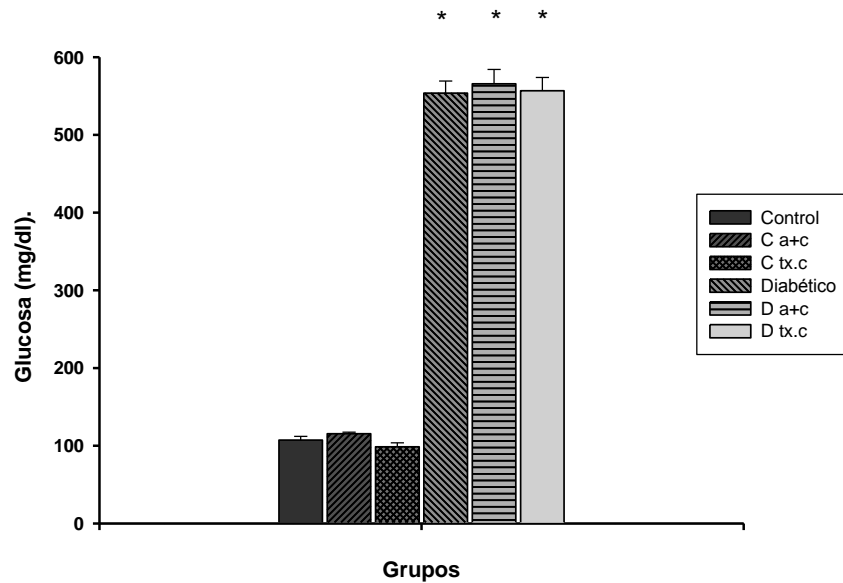


Figura 14. Nivel de glucemia en plasma de los grupos experimentales. Se muestran valores promedio \pm error estándar de 6 ratas por grupo, (ANOVA dos vías & Tukey-Kramer, * $P < 0.05$).

Otra característica de los pacientes con DM es la polidipsia que se caracteriza por una ingesta mayor de líquidos; para la medición del consumo de agua, el resultado se monitoreo en un lapso de 24 horas, en la figura 15 a y b se muestran los valores promedio de consumo de agua para la 4ta y 8va semana respectivamente, en las cuales fue administrado L-Trp, se puede observar que durante las 8 semanas que comprendió el esquema experimental, los animales con DME tomaron mayor cantidad de líquidos respecto a los grupos controles. Dentro de los grupos diabéticos, el grupo D tx. a+c a la 4ta semana presentó menor consumo (Fig. 15a). Así mismo, en la 8va semana los grupos D tx. a+c y D tx. c mostraron un menor consumo de agua (Fig. 15b).

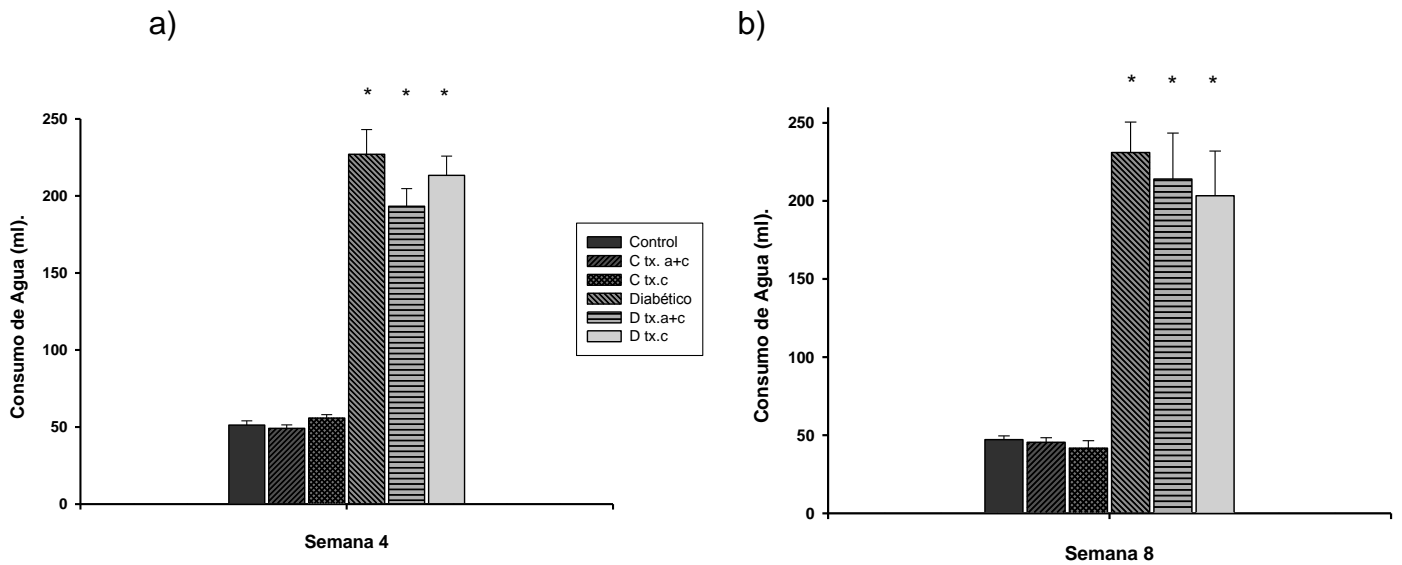


Figura 15a. Consumo de agua de los grupos experimentales a la 4ta semana de inducción de DME. 15b Consumo de agua por los grupos experimentales a la 8va semana de inducción de DME Se muestran valores promedio \pm error estándar de 6 ratas por grupo, (ANOVA dos vías & Tukey-Kramer, * $P < 0.05$).

Como síntoma clínico de la DM la polifagia hace referencia al apetito aumentado que se origina por la pérdida de energía de la glucosa por la orina, si bien éstos individuos presentan hiperglicemias y se alimentan, pero las células no pueden aprovechar este nutriente debido a la resistencia a la insulina por tanto tienden a consumir mayor cantidad de alimento para compensar la pérdida de calorías. Se realizó la medición de la ingesta de alimento (Purina Chow) monitoreando un periodo de tiempo de 24hrs semanalmente. Previo a la inducción de DME los grupos mostraron un promedio de consumo de 23.61g. Posterior a la inducción del modelo, los animales con DME presentaron polifagia durante todo el periodo que comprendió el esquema experimental. La figura 16 a y b muestra los valores promedio de consumo de alimento para la 4ta y 8va semana respectivamente, en las cuales fue administrado el L-Trp., se puede observar que a la 4ta semana el grupo C tx. a+c y el grupo D tx. a+c, presentaron un consumo de alimento menor respecto al resto de los grupos correspondientes (Fig. 16a). Los grupos C tx. a+c,

C tx. c, D tx. a+c y D tx. c, a la 8va semana presentaron también un consumo significativamente menor de alimento (Fig 16b).

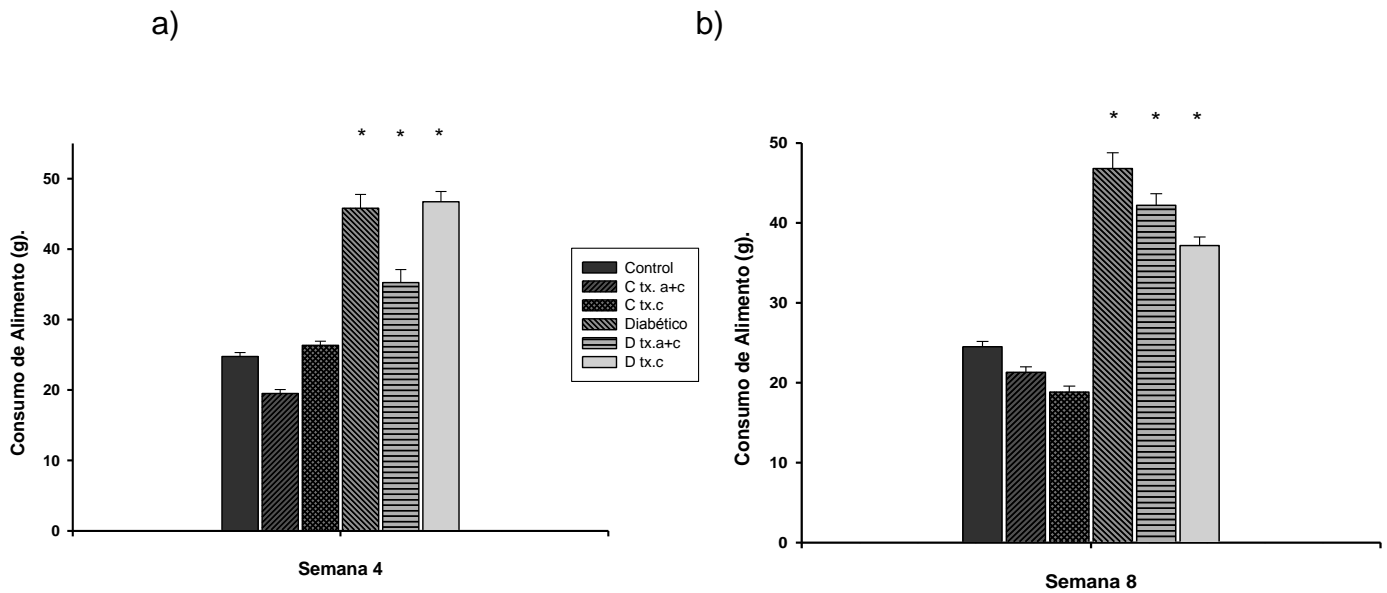


Figura 16a. Consumo de alimento por los grupos experimentales a la 4ta semana de inducción de DME. 16b. Consumo de alimento por los grupos experimentales a la 8va semana de inducción de DME. Se muestran valores promedio \pm error estándar de 6 ratas por grupo, (ANOVA dos vías & Tukey-Kramer, * $P < 0.05$).

La pérdida de peso corporal en sujetos con DM se produce debido a la pérdida de glucosa por orina y por tanto pérdida calórica que ésta aporta, debido a la incapacidad de utilizarla apropiadamente. Por tanto el peso corporal se determinó en los animales. La figura 17 a y b muestra los valores promedio del peso corporal para la 4ta y 8va semana respectivamente, en los grupos en los cuales fue administrado L-Trp, se puede observar que a la 4ta semana los grupos con DME no presentaron pérdida de peso pero tampoco lo incrementaron, mientras que los grupos controles aumentaron de peso, la administración de L-Trp en ésta semana no modificó significativamente estos valores en los grupos correspondientes (Fig. 17a). Para la 8va semana, el grupo Control continuó con el aumento de peso, los grupos C tx. a+c y C tx. c mostraron una disminución en el peso corporal siendo significativamente más notable en el grupo C tx. a+c; los grupos con DME

mantuvieron una tendencia al no aumento de peso corporal sin mostrar diferencias significativas entre ellos (Fig. 17b).

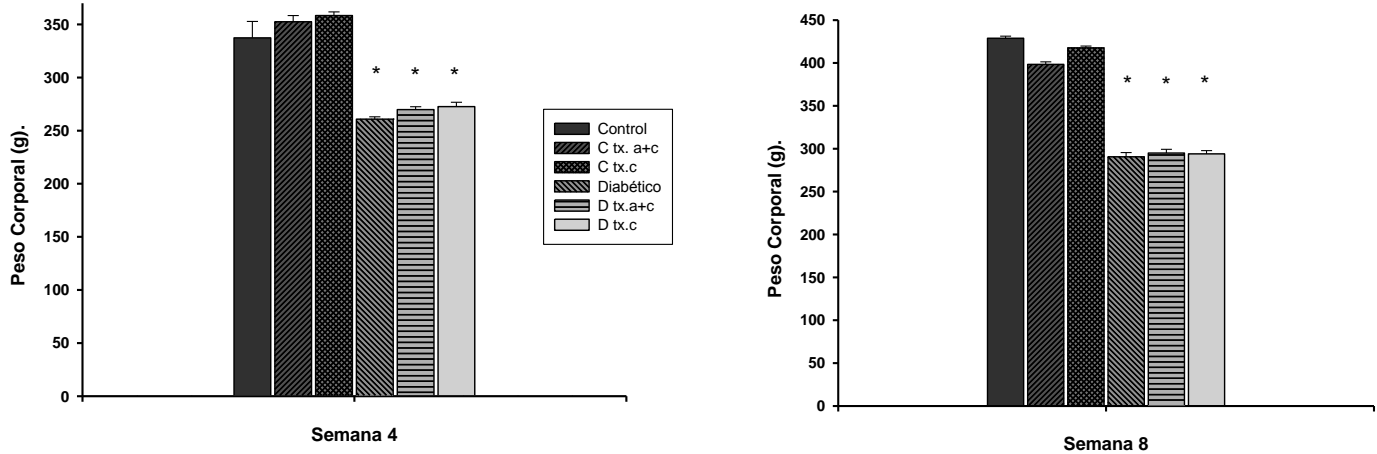


Figura 17a. Peso corporal de los grupos experimentales a la 4ta semana de inducción de DME. 17b. Peso corporal por los grupos experimentales a la 8va semana de inducción de DME.. Se muestran valores promedio \pm error estándar de 6 ratas por grupo, (ANOVA dos vías & Tukey-Kramer, * $P < 0.05$).

La dislipidemia en DM es una agrupación compleja de anomalías lipídicas y lipoprotéicas que se encuentran interrelacionadas metabólicamente con potencial aterogénico. La dislipidemia diabética se asocia a resistencia a la insulina, obesidad visceral e hígado graso. En las figuras 18 a la 22 se muestra los valores sanguíneos del perfil de lípidos realizado a los animales experimentales (colesterol, triglicéridos, colesterol HDL, LDL y Lípidos totales). Los niveles de colesterol se mantuvieron normales en todos los grupos controles, mostrando un incremento significativo en los grupos con DME. Los datos también mostraron que las fracciones de HDL y LDL se mantuvieron con valores favorables en todos los grupos controles, mostrando también que en los grupos con DME tienen un valor mayor respecto a los grupos control. En cuanto a los niveles de triglicéridos los grupos con DME mostraron valores superiores respecto a los grupos control. La administración de L-Trp, no modificó los niveles del perfil lipídico.

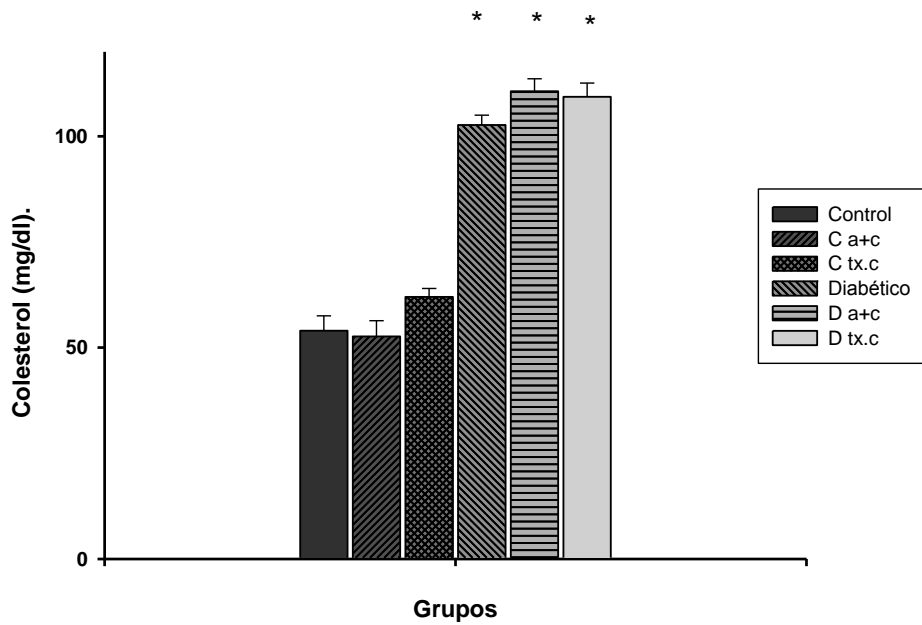


Figura 18. Nivel de colesterol en plasma de los grupos experimentales. Las mediciones del nivel de colesterol se realizaron con ayuno de 6 horas, se muestran valores promedio \pm error estándar de 6 ratas por grupo, (ANOVA de una vía & Tukey-Kramer, * $P < 0.05$).

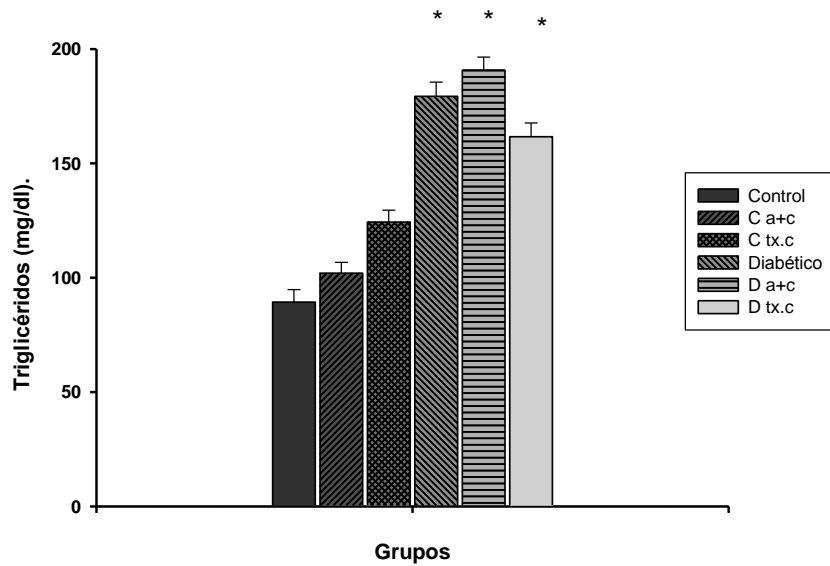


Figura 19. Nivel de triglicéridos en plasma de los grupos experimentales. Las mediciones del nivel de triglicéridos se realizaron con ayuno de 6 horas, se muestran valores promedio \pm error estándar de 6 ratas por grupo, (ANOVA de una vía & Tukey-Kramer, * $P < 0.05$).

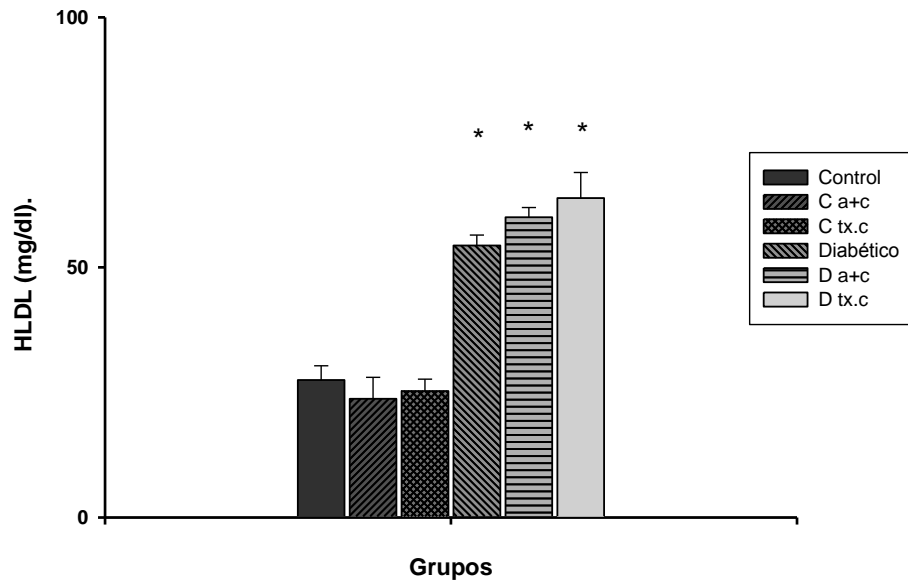


Figura 20. Nivel de HDL en plasma de los grupos experimentales. Las mediciones del nivel de HDL se realizaron con ayuno de 6 horas, se muestran valores promedio \pm error estándar de 6 ratas por grupo, (ANOVA de una vía & Tukey-Kramer, * $P < 0.05$).

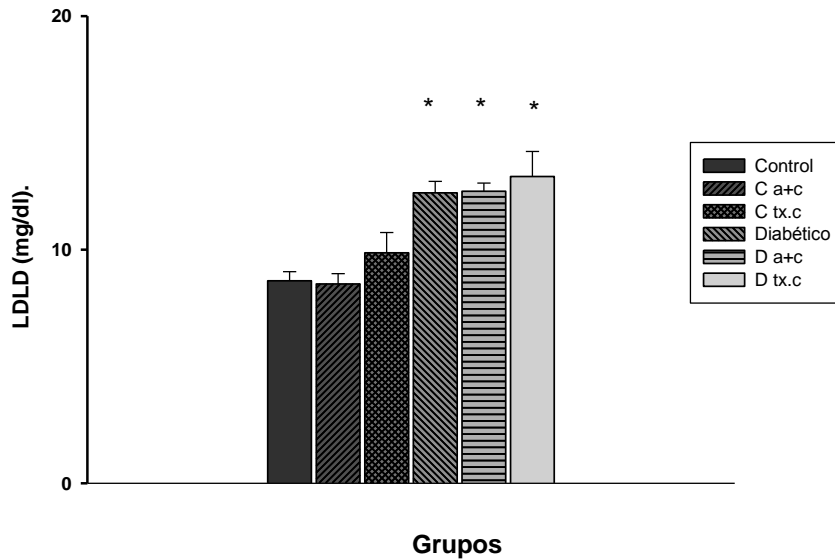


Figura 21. Nivel de LDL en plasma de los grupos experimentales. Las mediciones del nivel de LDL se realizaron con ayuno de 6 horas, se muestran valores promedio \pm error estándar de 6 ratas por grupo, (ANOVA de una vía & Tukey-Kramer, * $P < 0.05$).

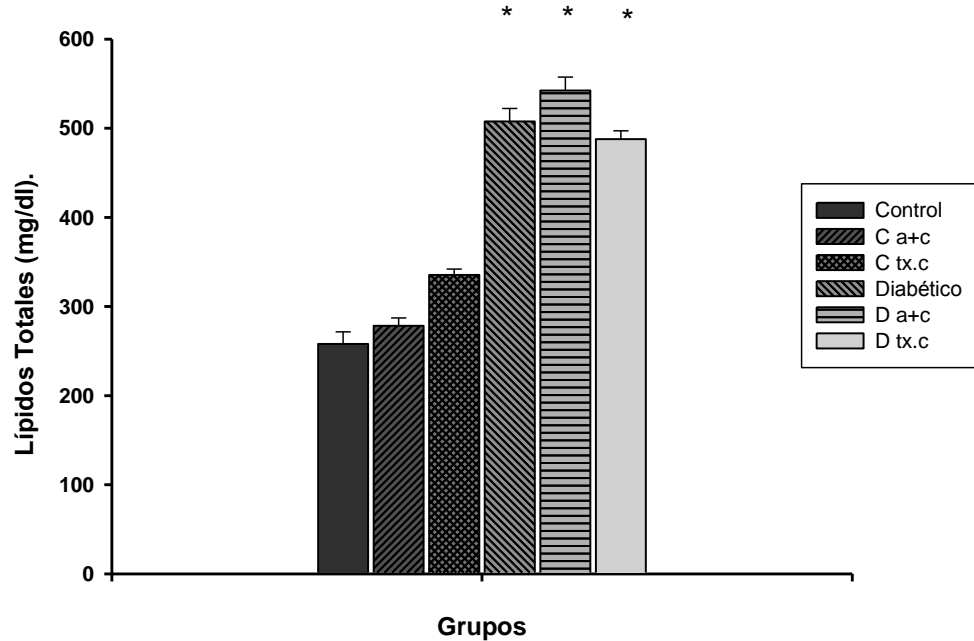


Figura 22. Nivel de lípidos totales en plasma de los grupos experimentales. Los niveles de lípidos totales se realizaron con ayuno de 6 horas, se muestran valores promedio \pm error estándar de 6 ratas por grupo, (ANOVA de una vía & Tukey-Kramer, * $P < 0.05$).

La hemoglobina glicosilada o HbA1c, es una heteroproteína que resulta de la unión de la hemoglobina con glúcidos. Éste otro parámetro bioquímico es utilizado para medir el nivel promedio de glucosa en sangre en un individuo, dando una referencia acerca del control metabólico de la persona. Los animales control, se mostraron dentro de los valores normales, sin embargo, en los animales con DME se presentó un incremento en este valor respecto a los mostrados por los animales control (Fig. 23). La administración de L-Trp, no modificó los niveles de hemoglobina glicosilada.

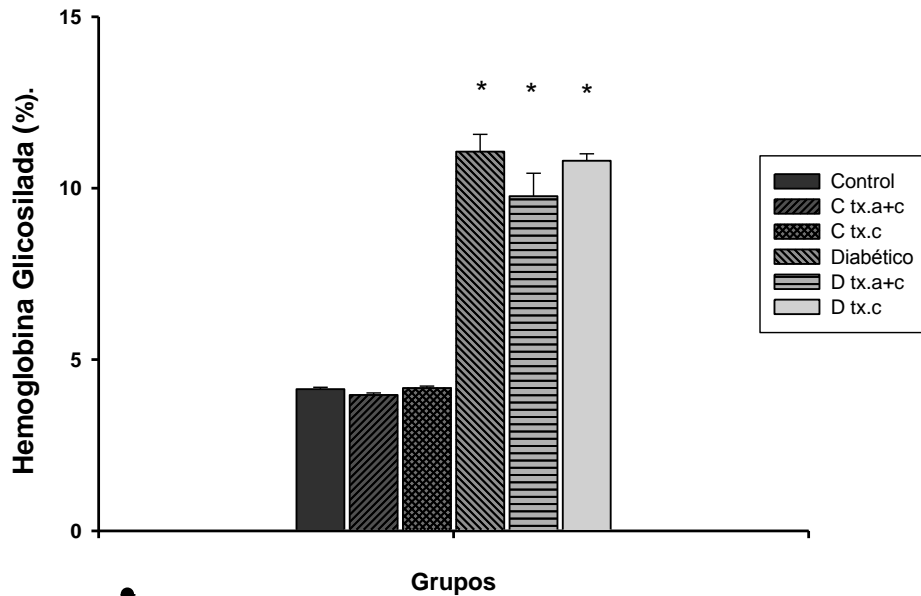


Figura 23. Hemoglobina Glicosilada de los grupos experimentales. Las mediciones del porcentaje de hemoglobina glucosilada se realizaron con ayuno de 6 horas, se muestran valores promedio \pm error estándar de 6 ratas por grupo (ANOVA de una vía & Tukey-Kramer, * $P < 0.05$).

VI.2 EVALUACIÓN DE LA PERCEPCIÓN GUSTATIVA.

La DM causa alteraciones en la sensibilidad gustativa como dato característico de la neuropatía periférica; en presencia de hiperglucemia el paciente diabético muestra una disminución de la agudeza gustativa, en éste caso selectiva para el sabor dulce de manera directamente proporcional. La evaluación de la percepción gustativa se realizó colocando dos tipos de bebidas, una solución de sacarosa al 10% y la otra agua potable, para observar la preferencia de los animales sobre una u otra. Los animales con DME tuvieron una preferencia mayor hacia la solución de sacarosa que al agua potable, pero su consumo también es alto, respecto a los animales control que también mostraron un consumo de solución de sacarosa al 10% ligeramente mayor respecto al agua potable, ambos durante las 8 semanas que comprendió el esquema, lo que muestra que los animales con DME tomaron mayor cantidad de líquidos en presencia de las dos soluciones (Fig.

24a y b). Se observa a la 8va semana que el grupo D tx.a+c presenta un menor consumo respecto al grupo Diabético, sin diferencias significativas respecto al grupo D tx.c.). La administración de L-Trp, modificó el consumo de sacarosa al 10% en la 8va semana para el grupo que recibió dos administraciones del mismo.

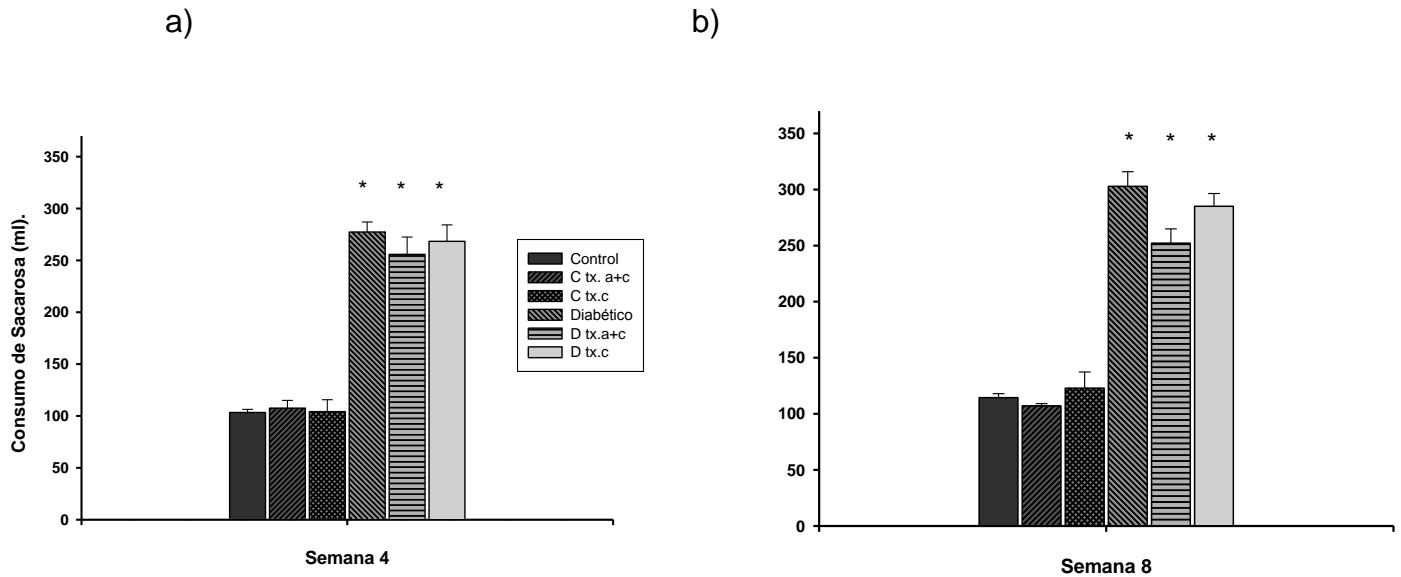


Figura 24a. Consumo de solución de sacarosa al 10% por los grupos experimentales a la 4ta semana de inducción de DME. 24b Consumo de solución de sacarosa al 10% por los grupos experimentales a la 8va semana de inducción de DME El tiempo de consumo es de 24 horas, se muestran valores promedio \pm E.E. de 6 ratas por grupo, (ANOVA dos vías & Tukey-Kramer, * $P < 0.05$).

VI. 3 EXPRESIÓN DE mRNA DEL GEN DE LA β -ACTINA EN PAPILA CALICIFORME, CORTEZA CEREBRAL Y CEREBELO DE RATAS.

Para el análisis de expresión del gen de la β -actina como control de expresión interna, se realizaron las PCR's correspondientes por triplicado y las imágenes de los geles se analizaron para determinar las diferencias en la densitometría de las muestras controles en tejidos de papila caliciforme, corteza cerebral y cerebelo, encontrándose diferencias en los niveles de expresión de éste gen constitutivo en los tejidos utilizados según lo esperado (Fig. 25).

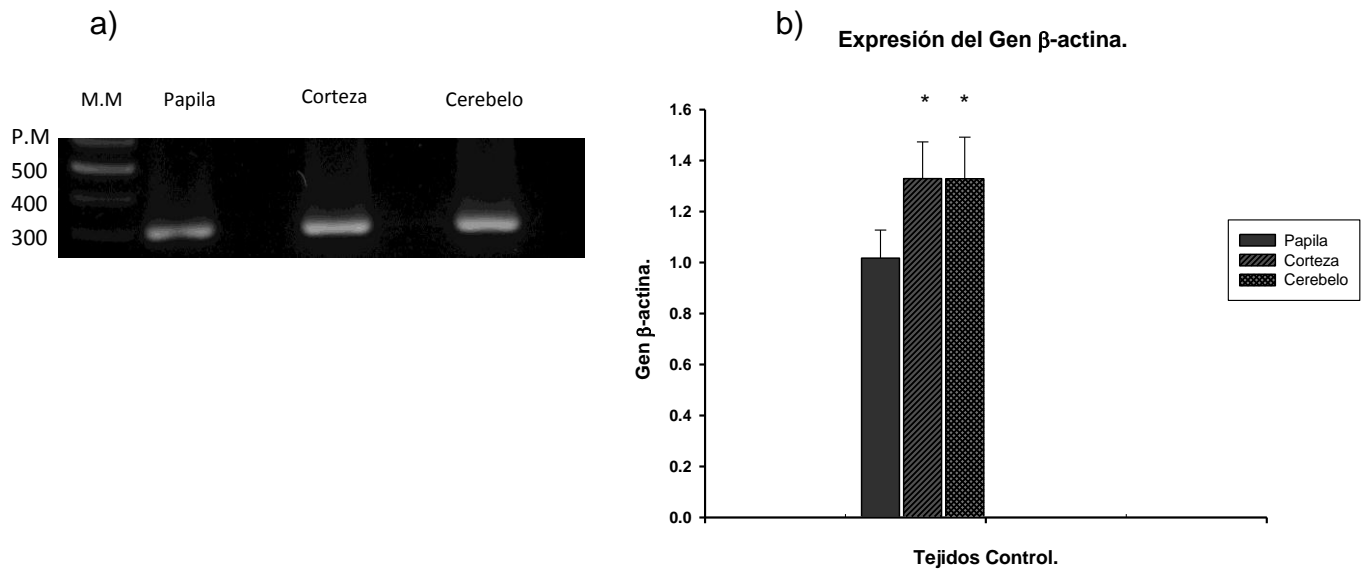


Figura 25. a) producto de amplificación del gen de la β -actina en papila caliciforme, corteza cerebral y cerebelo de rata. $X \pm E.E.$ de 3 experimentos independientes realizados por triplicado; b) Expresión Relativa del gen β -actina en papila caliciforme, corteza cerebral y cerebelo de rata. ANOVA de una vía & Tukey-Kramer, * $P < 0.05$.

VI. 4 EXPRESIÓN DE mRNA DEL GEN β -ACTINA, T1R2 Y T1R3 EN PAPILA CALICIFORME.

Se ha reportado la expresión de los receptores T1R2 y T1R3 en diversos tejidos corporales, donde juegan un papel en el metabolismo de los mismos; se expresan ampliamente en las células gustativas tipo II de las papilas gustativas, donde su función permite la detección de las moléculas dulces. Para el análisis de expresión de los receptores del sabor dulce se realizaron las PCR's correspondientes por triplicado y los geles se analizaron con el programa "Image J". Se muestran los productos de amplificación de la reacción de PCR, correspondiendo a la expresión de los genes de β -actina, T1R2 y T1R3 en la papila caliciforme de la rata con la talla esperada para estos genes (Fig. 26).

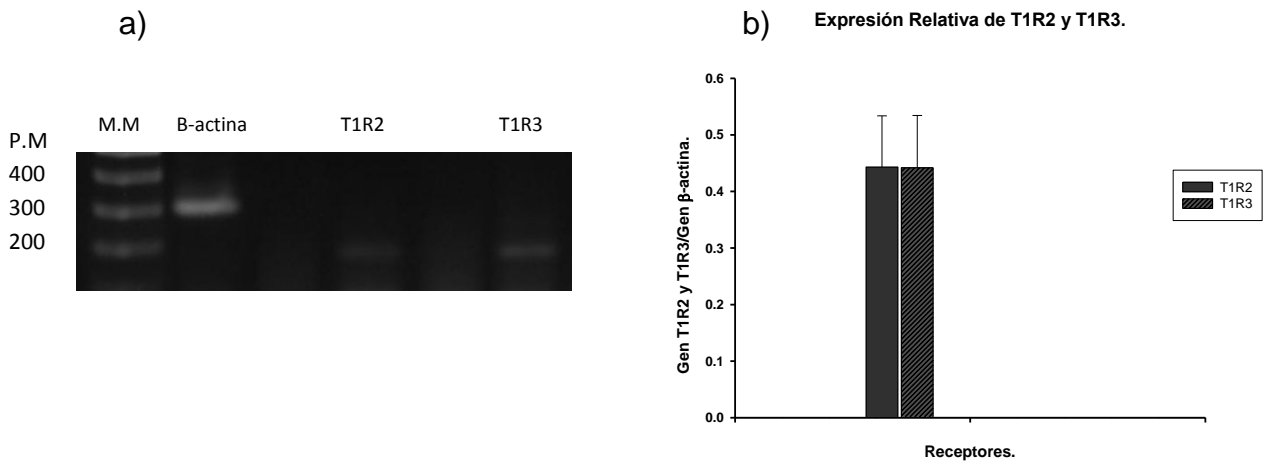


Figura 26. a) producto de amplificación del gen T1R2 y T1R3/ β -actina, en papila caliciforme de rata. $X \pm E.E.$ de 3 experimentos independientes realizados por triplicado; b) Expresión Relativa del gen β -actina, T1R2 y T1R3 papila caliciforme de ratas. ANOVA de una vía & Tukey-Kramer,

VI. 5 EXPRESIÓN DEL GEN DEL RECEPTOR T1R2 EN ETAPA AGUDA.

En la figura 27a se muestra el producto de amplificación del gen de β -actina y del receptor T1R2 en papila caliciforme de rata a la 4ta semana de inducción de DME (etapa aguda de administración de L-Trp), se muestra en la figura 27b el resultado del análisis de la expresión relativa del receptor T1R2 en etapa aguda, donde la expresión de este receptor se encuentra disminuida en los grupos con DME, con respecto a los grupos control. Los valores del grupo control normalizados a 1, originaron los siguientes resultados: C tx.a=0.917, Diabético= 0.5124 y D tx.a= 0.5927. La administración de L-Trp. incremento el nivel del expresión del receptor T1R2 en el grupo D tx.a.

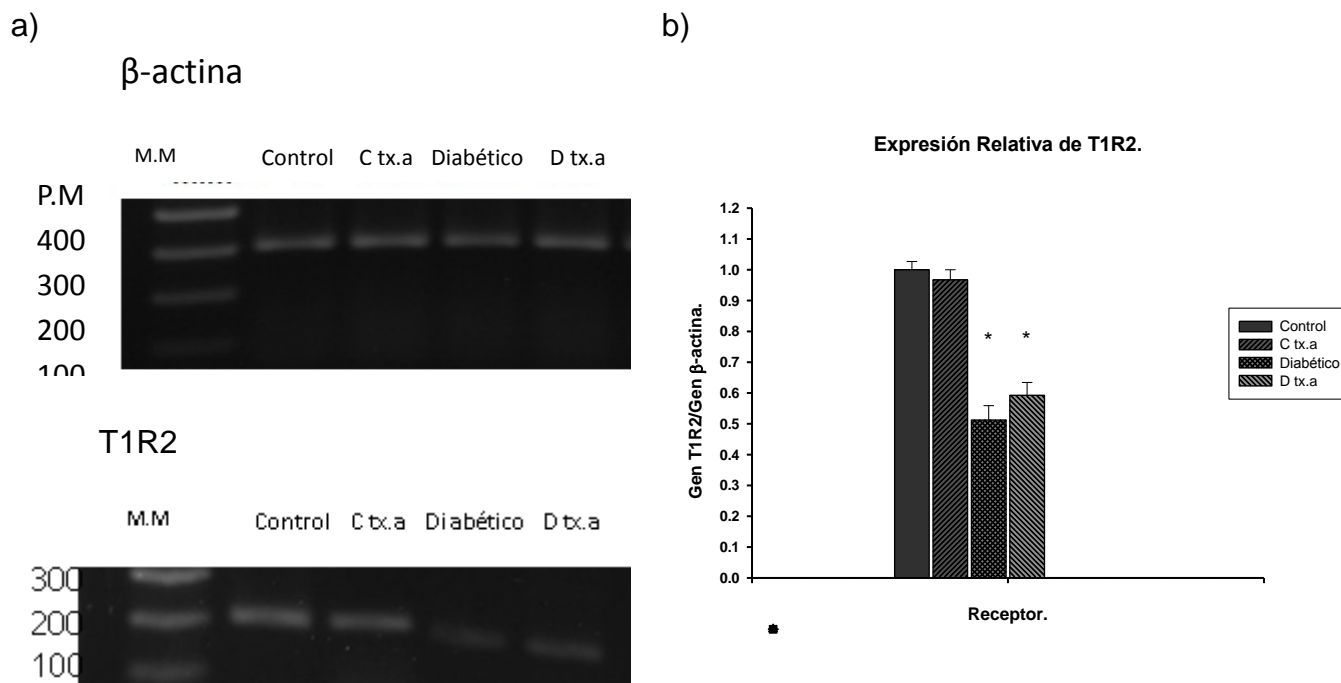


Figura 27. a) Producto de amplificación del gen de β -actina y del receptor T1R2 en etapa aguda en papila caliciforme de rata. $X \pm E.E.$ de 3 experimentos independientes realizados por triplicado; b) Expresión Relativa del gen, T1R2 en etapa aguda en papila caliciforme de ratas. (ANOVA de una vía & Tukey-Kramer, * $P < 0.05$).

VI. 6 EXPRESIÓN DEL GEN DEL RECEPTOR T1R3 EN ETAPA AGUDA.

En la figura 28a se muestra el producto de amplificación del gen de β -actina y del receptor T1R3 en papila caliciforme de rata a la 4ta semana de inducción de DME (etapa aguda de administración de L-Trp), se muestra en la figura 28b el resultado del análisis de la expresión relativa del receptor T1R3 en etapa aguda, donde la expresión de este receptor se encuentra disminuida en los grupos con DME con respecto a los grupos control. Los valores del grupo control normalizados a 1, arrojaron los siguientes resultados: C tx.a=0.9805, Diabético= 0.6320 y D tx.a= 0.6680. La administración de L-Trp, produjo un incremento en el nivel de la expresión del receptor T1R3 en el grupo D tx.a.

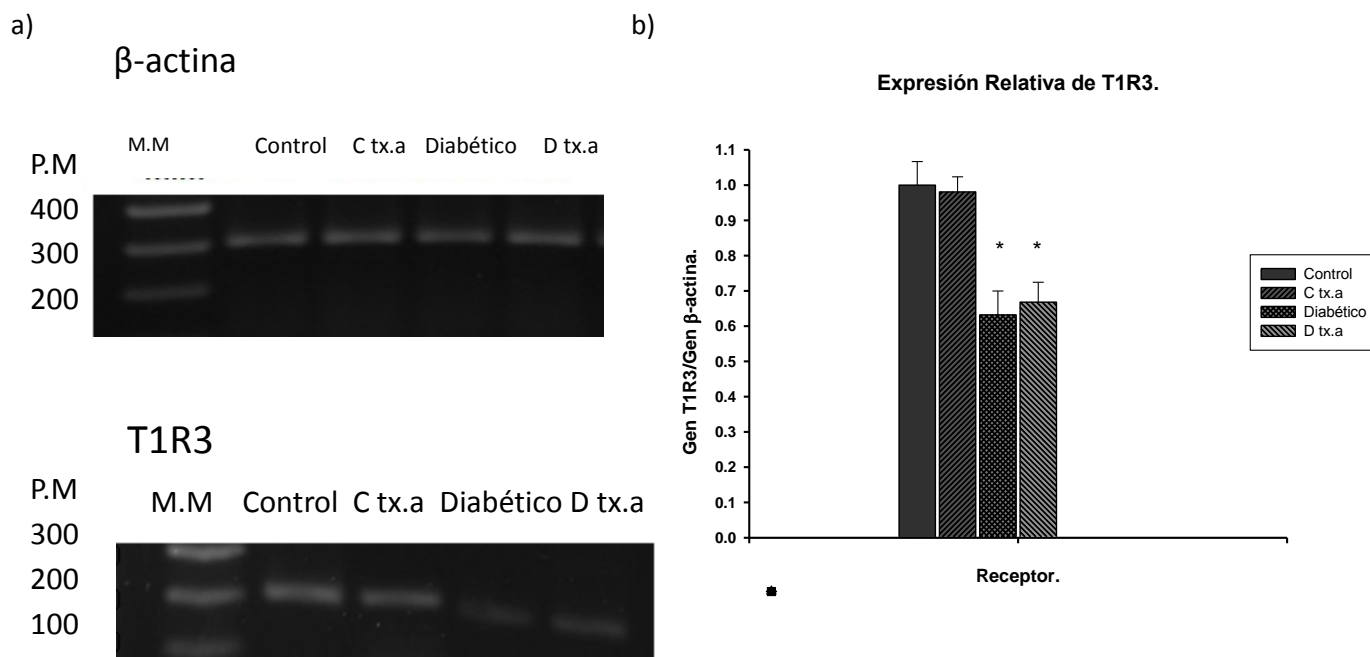


Figura 28. a) producto de amplificación del gen T1R3 en etapa aguda en papila caliciforme de rata. $X \pm E.E.$ de 3 experimentos independientes realizados por triplicado; b) Expresión Relativa del gen, T1R3 en etapa aguda en papila caliciforme de ratas (ANOVA de una vía & Tukey-Kramer, * $P < 0.05$).

VI. 7 EXPRESIÓN DEL GEN DEL RECEPTOR T1R2 EN ETAPA AGUDA Y CRÓNICA.

En la figura 29a se muestra el producto de amplificación del gen de β -actina y del receptor T1R2 en papila caliciforme de rata a la 4ta y 8va semana de inducción de DME (etapa aguda más crónica de administración de L-Trp); se muestra en la figura 29b el resultado del análisis de la expresión relativa del receptor T1R2 en etapa aguda más crónica, donde la expresión de este receptor se encuentra disminuida en los grupos con DME. Los valores del grupo control normalizados a 1, originaron los siguientes resultados: C tx.a+c=0.9706, C tx.c= 0.9755 Diabético= 0.6876, D tx.a+c= 0.7218 y D tx.c= 0.6915. La administración de L-Trp, produjo un incremento en el nivel del expresión del receptor T1R2 en el grupo D tx.a+c.

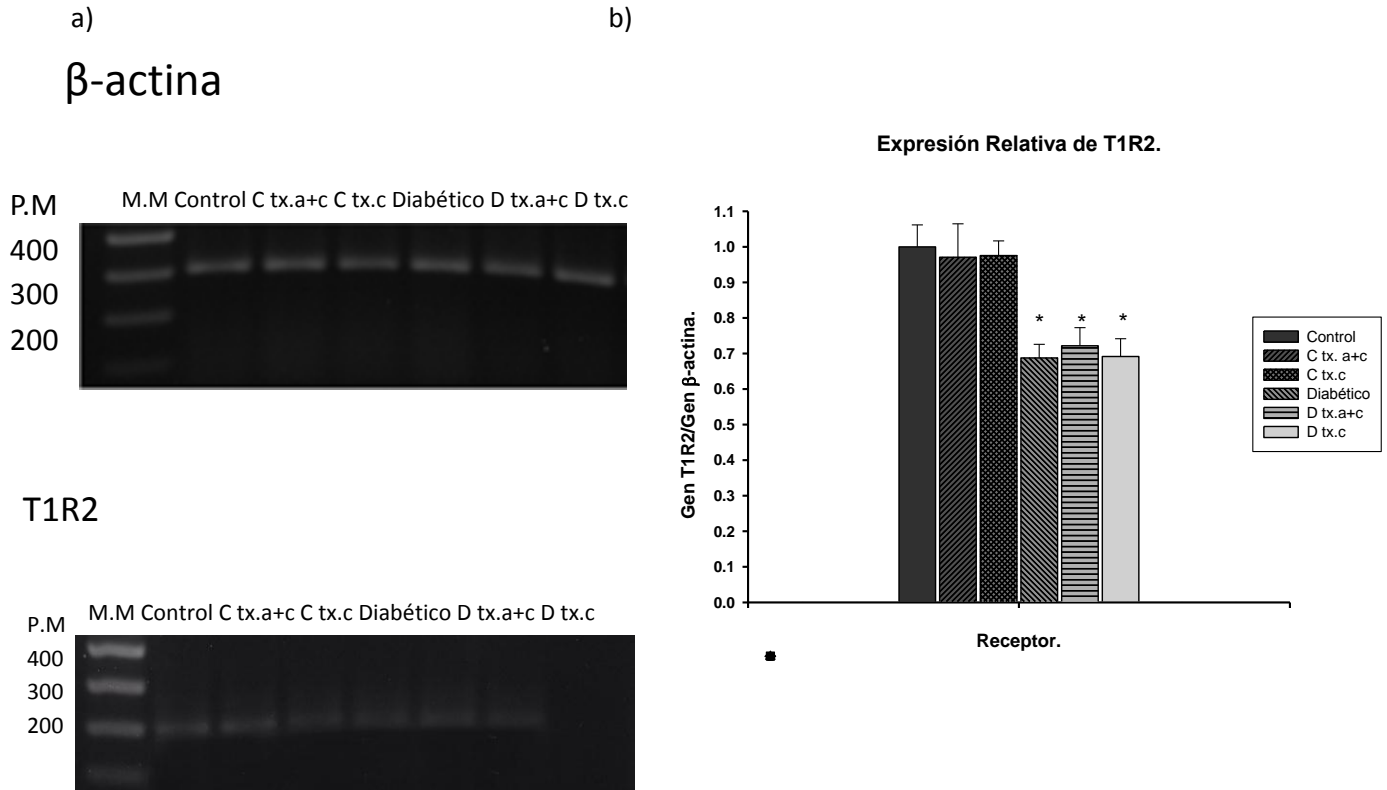


Figura 29. a) producto de amplificación del gen β -actina y del receptor T1R2 en etapa aguda y crónica en papila caliciforme de rata. $X \pm E.E.$ de 3 experimentos independientes realizados por triplicado.; b) Expresión Relativa del gen del receptor T1R2 en papila caliciforme de ratas (ANOVA de una vía & Tukey-Kramer, * $P < 0.05$).

VI. 8 EXPRESIÓN DEL GEN DEL RECEPTOR T1R3 EN ETAPA AGUDA Y CRÓNICA.

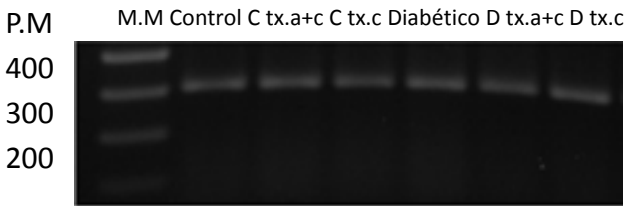
En la figura 30a se muestra el producto de amplificación del gen de β -actina y del receptor T1R3 en papila caliciforme de rata a la 4ta y 8va semana de inducción de DME (etapa aguda más crónica de administración de L-Trp); se muestra en la figura 30b el resultado del análisis de la expresión relativa del receptor T1R3 en etapa aguda más crónica, donde la expresión de este receptor se encuentra disminuida en los grupos con DME con respecto al grupo control. Los valores del grupo control normalizados a 1, originaron los siguientes resultados: C

tx.a+c=0.9876, C tx.c= 0.9705 Diabético= 0.7541, D tx.a+c= 0.7237 y D tx.c= 0.7163. La administración de L-Trp, incremento la expresión del receptor T1R3 en el grupo D tx.a+c.

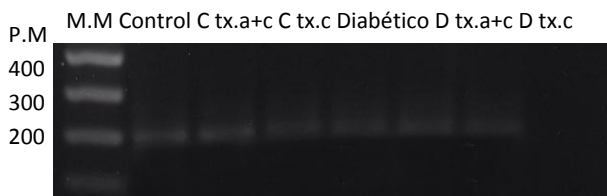
a)

b)

β -actina



T1R3



Expresión Relativa de T1R3.

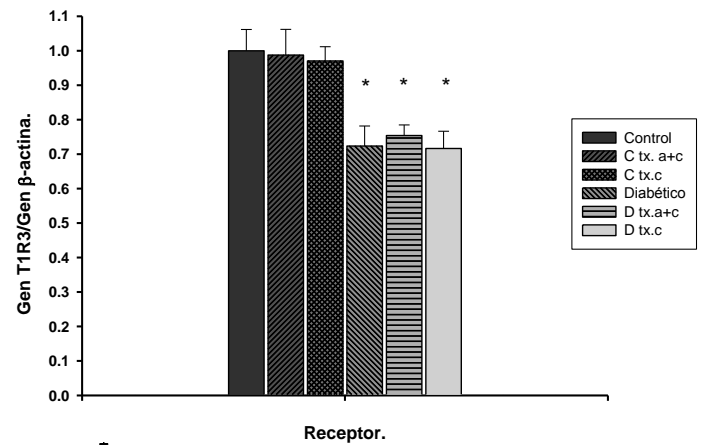


Figura 30. a) producto de amplificación del gen β -actina y del receptor T1R3 en etapa aguda y crónica en papila caliciforme de rata. $X \pm E.E.$ de 3 experimentos independientes realizados por triplicado.; b) Expresión Relativa del gen del receptor T1R3 en papila caliciforme de ratas (ANOVA de una vía & Tukey-Kramer, * $P < 0.05$).

VI. 9 NÚMERO DE CORPÚSCULOS GUSTATIVOS.

En el presente trabajo se realizó el conteo de los corpúsculos gustativos en la papila caliciforme de las ratas para evaluar el efecto de la administración de L-triptófano sobre el número de corpúsculos. Se observó disminución de los

corpúsculos gustativos de manera evidente en los grupos con DME como se describe enseguida.

VI. 9.1.1 NÚMERO DE CORPÚSCULOS GUSTATIVOS EN ETAPA AGUDA.

La Figura 31 corresponde al número de corpúsculos gustativos presentes en la papila caliciforme de ratas correspondientes a los grupos Control, C tx.a, Diabético y D tx.a, donde se puede observar disminución del número de corpúsculos en el grupo Diabético respecto al número de corpúsculos del grupo Control. Se encontró además un aumento en el número de corpúsculos gustativos en los grupos C tx.a con un incremento del 18.63% respecto al grupo control así mismo el grupo D tx.a mostró un incremento del 22.77% respecto al grupo Diabético, el cual presentaba un decremento del 25.64% respecto al grupo Control. La administración de L-Trp, modifico el número de corpúsculos gustativos en los grupos C tx.a y D tx.a.

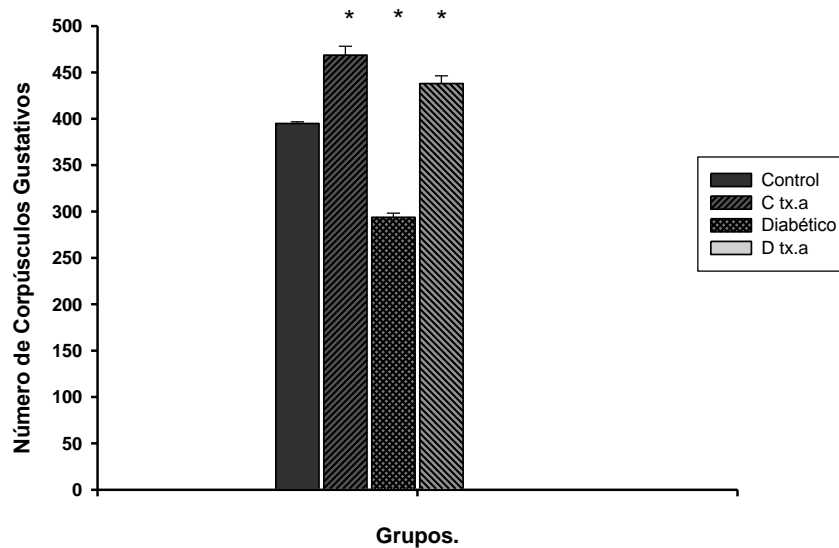


Figura 31. Número de corpúsculos gustativos en la papila caliciforme de rata bajo un esquema de DME etapa aguda. Los valores de la gráfica corresponden a tres experimentos independientes. Datos promedio \pm error estándar. $n=3$ (ANOVA de una vía & Tukey-Kramer, $*P<0.05$).

VI. 9.1.2 NÚMERO DE CORPÚSCULOS GUSTATIVOS EN ETAPA AGUDA Y CRÓNICA.

La Figura 32 presenta el número de corpúsculos gustativos presentes en la papila caliciforme de ratas correspondientes a los grupos Control, C tx.a+c, C tx.c Diabético, D tx.a+c y D tx.c. Los resultados obtenidos reflejan la disminución del número de corpúsculos en el grupo diabético con un decremento del 27.58%, también se observa un incremento en el grupo control que es administrado en las dos etapas (C tx.a+c) con un incremento del 29.28% y un incremento del 12.91% en el grupo control administrado solo en etapa crónica, respecto al grupo control; a la par se encontró un incremento del 36.92% del grupo diabético con administración en las dos etapas y un 25.66% en el grupo con administración solo en etapa crónica, ambos respecto al grupo diabético. La administración de L-Trp, modifica el número de corpúsculos gustativos en los grupos C tx.a+c, C tx.c y D tx.a+c, y D tx.c.

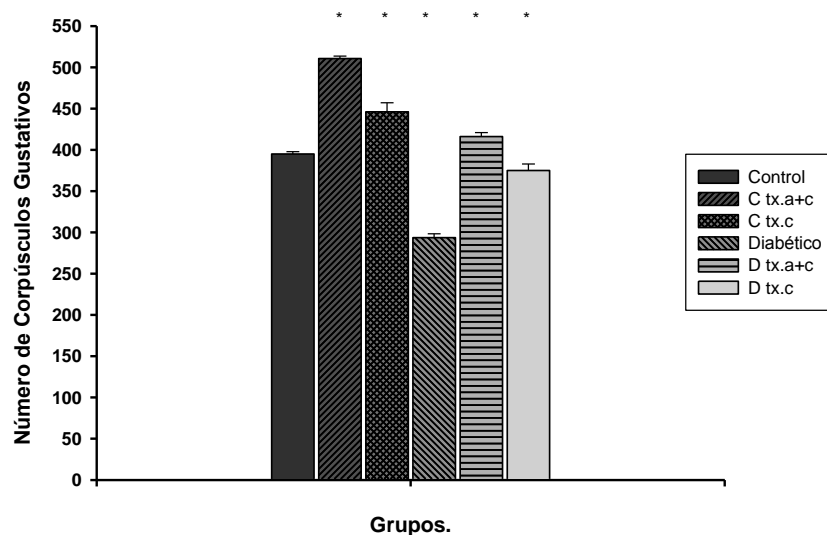


Figura 32. Número de corpúsculos gustativos en la papila caliciforme de ratas bajo un esquema de DME etapa aguda y crónica. Los valores de la gráfica corresponden a tres experimentos independientes. Datos promedio \pm error estándar. n=3 (ANOVA de una vía & Tukey-Kramer, *P<0.05).

VI. 9.2 MICROGRAFÍAS DE LAS PAPILAS CALICIFORMES.

El conteo de los corpúsculos gustativos se realizó utilizando el programa Motic Images Plus 2.0, mediante un microscopio digital, el cual, fue calibrado antes de su utilización. Lo anterior se realizó con las muestras provenientes de los grupos control, control etapa aguda, control etapa aguda más crónica, control etapa crónica, diabético, diabético etapa aguda, diabético etapa aguda más crónica y diabético etapa crónica. Obteniéndose micrografías secuenciales de cortes correspondientes a cada grupo (Fig. 33-41).

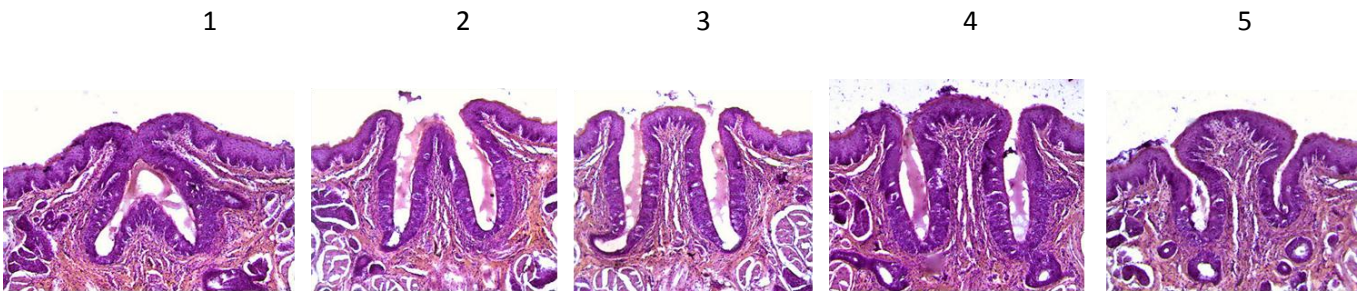


Fig. 33. Secuencia de cortes histológicos utilizados en el conteo del número de corpúsculos gustativos en la papila caliciforme de ratas control.

a) Papila caliciforme Control.



Fig. 34. Micrografía de papila caliciforme de rata control. Corte histológico de 16 μ m de espesor con tinción de hematoxilina y eosina. Las flechas color de amarillo señalan la ubicación de los corpúsculos gustativos.

b) Papila caliciforme del grupo Control tx. Agudo.

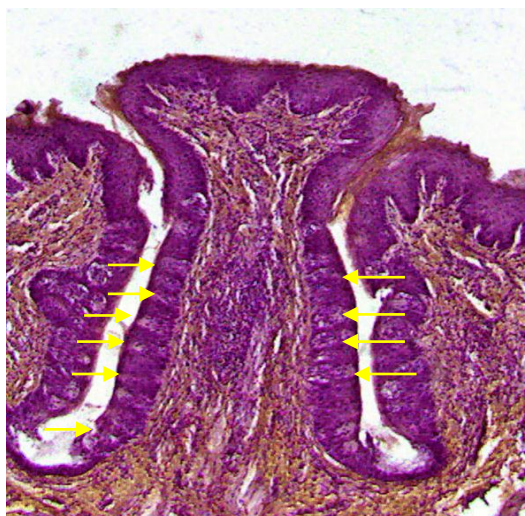


Fig. 35. Micrografía de papila caliciforme de rata control con tratamiento solo en etapa aguda de L-Trp. Corte histológico de 16 μ m de espesor con tinción de hematoxilina y eosina. Las flechas color de amarillo señalan la ubicación de los corpúsculos gustativos.

c) Papila caliciforme del grupo Control tx. Agudo más Crónico.

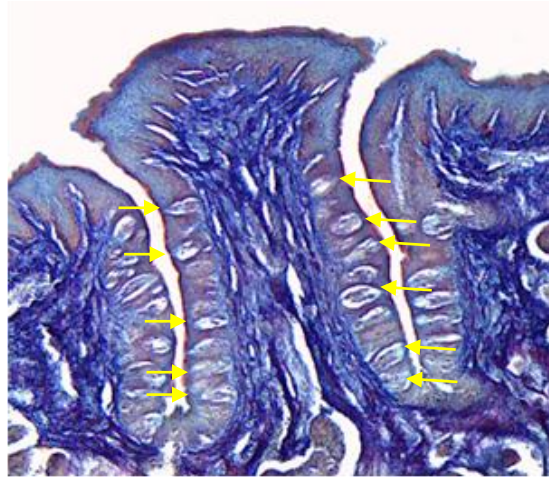


Fig. 36. Micrografía de papila caliciforme de rata control con tratamiento en etapas agudo y crónico de L-Trp. Corte histológico de 16 μ m de espesor con tinción tricrómica de Masson. Las flechas color de amarillo señalan la ubicación de los corpúsculos gustativos.

d) Papila caliciforme del grupo Control tx. Crónico.



Fig. 37. Micrografía de papila caliciforme de rata control con tratamiento solo en etapa crónica de L-Trp. Corte histológico de 16 μ m de espesor con tinción de hematoxilina y eosina. Las flechas color de amarillo señalan la ubicación de los corpúsculos gustativos.

e) Papila caliciforme del grupo con DME.



Fig. 38. Micrografía de papila caliciforme de rata diabética. Corte histológico de 16 μ m de espesor con tinción de hematoxilina y eosina. Las flechas color de amarillo señalan la ubicación de los corpúsculos gustativos.

f) Papila caliciforme del grupo Diabética tx. Agudo.

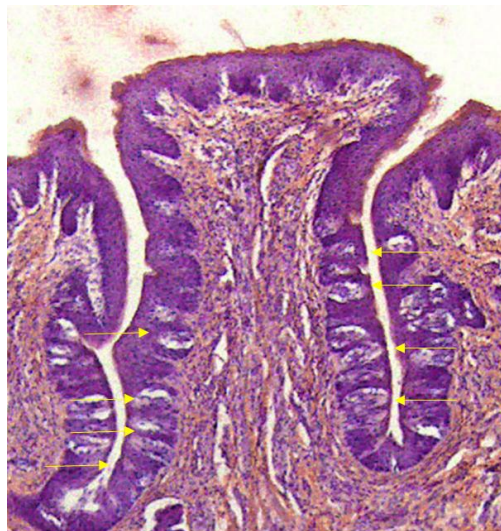


Fig. 39. Micrografía de papila caliciforme de rata diabética con tratamiento solo en etapa aguda de L-Trp. Corte histológico de 16 μ m de espesor con tinción de hematoxilina y eosina. Las flechas color de amarillo señalan la ubicación de los corpúsculos gustativos.

g) Papila caliciforme del grupo Diabética tx. Agudo más Crónico.

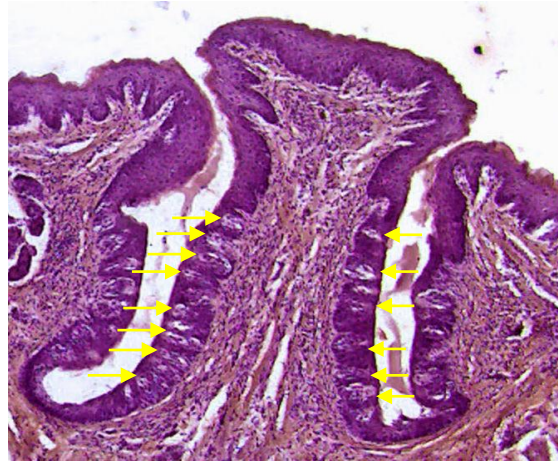


Fig. 40. Micrografía de papila caliciforme de rata diabética con tratamiento en etapa aguda y crónica de L-Trp. Corte histológico de 16 μ m de espesor con tinción de hematoxilina y eosina. Las flechas color de amarillo señalan la ubicación de los corpúsculos gustativos.

c) Papila caliciforme del grupo Diabética tx. Crónico.



Fig. 41. Micrografía de papila caliciforme de rata diabética con tratamiento solo en etapa crónica de L-Trp. Corte histológico de 16 μ m de espesor con tinción de hematoxilina y eosina. Las flechas color de amarillo señalan la ubicación de los corpúsculos gustativos.

VII. DISCUSIÓN

La diabetes mellitus afecta de manera desproporcionada a los países de ingresos medios y bajos en términos de prevalencia, mortalidad y morbilidad. Hasta el 80% de las personas con diabetes viven en países en vías de desarrollo, donde los cambios rápidos del estilo de vida, el envejecimiento de la población y la transformación del entorno contribuyen al creciente ritmo de la epidemia. La mayoría de las personas con diabetes en países de ingresos medios y bajos son menores de 60 años que se encuentran en la cúspide de sus años productivos (FID., 2013).

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica y compleja que requiere atención médica continua por medio de estrategias de reducción de los riesgos multifactoriales más allá del solo control de la glucemia. La puesta en marcha de la educación para el autocuidado del paciente es fundamental para evitar complicaciones agudas y reducir el riesgo de complicaciones a largo plazo. Existe evidencia significativa de que la Diabetes Mellitus es compatible con una amplia gama de intervenciones para mejorar su fisiopatología (ADA., 2014).

La estreptozotocina es un agente diabetogénico relativamente selectivo para células β del páncreas, en diversas especies causa diabetes de manera permanente. Su fijación a la membrana es el primer evento patológico; las evidencias indican que su toxicidad esta mediada por el reconocimiento específico de los receptores de la célula β pancreática (Ramos y Domingo., 2004).

Los animales empleados en los esquemas de la presente investigación, presentaron hiperglucemia a las 48 horas de administrada la estreptozotocina; además, presentaron los síntomas característicos de la Diabetes Mellitus como: poliuria (emisión excesiva de orina), polidipsia (aumento en la ingesta de líquidos), polifagia (aumento anormal en el consumo de alimento), pérdida de peso,

concordando con lo encontrado por Ramos y Domingo (2004), en cuanto a la implementación de un modelo diabético experimental por estreptozotocina.

Respecto al consumo de agua por los animales experimentales, se encontró que la administración de L-Trp, resulta en un consumo menor del líquido por los grupos que fueron administrados, en etapa aguda más crónica y solo etapa crónica. Por otro lado respecto al consumo de alimento también se encontró que los grupos C tx.a+c, C tx.c, D tx.a+c y D tx.c, consumieron menor cantidad en los periodos de administración del tratamiento, esto sugiere que la estimulación del sistema serotoninérgico tiene un efecto anorexigénico, concordando con lo encontrado por Munn-Chernoff *et al.*, (2012), respecto al rol que juega la serotonina sobre los desórdenes alimenticios.

La dislipidemia diabética es una agrupación compleja de anomalías lipídicas y lipoproteicas potencialmente aterogénicas, que comporta cambios tanto cuantitativos como cualitativos. Sus principales componentes son los siguientes: aumento de los triglicéridos plasmáticos, predominio de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Tal como se ha demostrado recientemente, las anomalías del metabolismo lipídico no son cambios aislados sino que están estrechamente relacionadas entre sí. El metabolismo lipídico en la diabetes es modulado por una serie de factores entre los que se encuentran el grado de control de la glucemia y la presencia de resistencia a la insulina como elementos más destacados. La resistencia a la insulina está en la base de los mecanismos fisiopatológicos de la dislipidemia diabética, y está estrechamente relacionada con la hipertrigliceridemia. Puede observarse una hipertrigliceridemia en un 30-60% de los pacientes con diabetes, y esta alteración se da con frecuencia en el estado prediabético, precediendo en el tiempo a la aparición de la hiperglucemia crónica. Una importante consecuencia de la resistencia a la insulina respecto al metabolismo lipídico es la pérdida del efecto supresor de la insulina sobre la movilización de la grasa del tejido adiposo (Carmena., 2008). Los hallazgos encontrados en las pruebas bioquímicas realizadas a los animales experimentales

fueron concordantes con los reportes encontrados a cerca de las alteraciones del metabolismo lipídico en presencia de DM haciendo notar que la administración de L-Trp no tiene ningún efecto sobre estos parámetros.

Con relación a la evaluación de la agudeza sensorial a la estimulación dulce con la ingesta de solución de sacarosa al 10%. Se encontró que los grupos diabéticos presentaron un aumento en el consumo de ésta solución, respecto a los grupos controles, haciendo notar que aún los grupos controles marcaron una preferencia de consumo de solución de sacarosa al 10% respecto a al agua potable, mismos resultados encontrados por Prado y Mercado (2010). Los grupos diabéticos con tratamiento, agudo más crónico y crónico a la 8va semana, mostraron diferencias significativas en la tendencia a reducir el consumo de la solución, siendo más significativas en el grupo con DME que recibió dos administraciones de L-Trp (D tx.a+c), estos datos correlacionaron con los niveles de expresión de los receptores para la modalidad gustativa dulce, T1R2 y T1R3.

Los receptores del sabor dulce T1R2/T1R3 se han identificado en diversos órganos, principalmente en la cavidad oral. Resultados previos en el laboratorio de neurobiología de la Facultad de Químico-Farmacobiología, en cuanto a la expresión de los receptores para el sabor dulce en papila caliciforme de rata, muestran que los valores se encuentran disminuidos en los grupos diabéticos respecto a los controles, de la misma manera se encuentra el número de corpúsculos gustativos para cada grupo correspondiente.

En cuanto a la expresión de los receptores para el sabor dulce en animales bajo un modelo experimental de DM, con administración L-triptófano en una etapa aguda, los grupos controles y diabéticos administrados no mostraron cambios significativos.

Los resultados del análisis de la expresión relativa del receptor T1R2/T1R3 con administración L-triptófano en una etapa aguda y crónica, indican que la expresión de estos receptores se encuentra disminuida en todos los grupos diabéticos no

así en los grupos control. Por otro lado el grupo D tx.a+c que presenta administración a las cuatro y ocho semanas de inducción de DME se observa un incremento en el nivel de expresión del heterodímero T1R2/T1R3 sin alcanzar valores controles. Lo que indica que la administración de L-Trp no muestra cambios sobre la expresión en una etapa aguda en los grupos diabéticos; esto puede deberse a las implicaciones microvasculares propias de la Diabetes Mellitus, como el remodelado o encogimiento arterial o estados vasculares inflamatorios que imposibilitan el adecuado transporte de nutrientes a los tejidos.

Concerniente al número de corpúsculos gustativos, se observó en los grupos con administración solo aguda una considerable reducción en el número de ellos en el grupo diabético, respecto al control, cabe notar que el grupo C tx.a, incrementó el número de corpúsculos respecto al grupo Control. De igual manera el grupo D tx.a incrementó el número de corpúsculos respecto al grupo Diabético pero sin alcanzar valores control. Respecto al número de corpúsculos gustativos, en los grupos con administración aguda y crónica, se encontró una considerable reducción en el número de ellos en el grupo diabético, respecto al control; también se observó que el grupo C tx.a+c, incrementó el número de corpúsculos respecto al grupo Control; el grupo C tx.c, incrementó el número de corpúsculos respecto al grupo Control pero sin alcanzar valores del grupo C tx.A+C; de igual manera el grupo D tx.a+c incrementó el número de corpúsculos respecto al grupo Diabético, alcanzando valores control y por último el grupo D txc, incrementó el número de corpúsculos respecto al grupo Diabético pero sin alcanzar valores del grupo Control y D tx.a+c. Esto sugiere que la serotonina interviene en la regeneración de las células gustativas presentes en las papilas gustativas, hecho relacionado con el consumo de sacarosa al 10% y con los niveles de expresión de los receptores T1R2 y T1R3 para los grupos que recibieron dos administraciones.

VIII. CONCLUSIÓN.

La administración de L-Trp en ratas con diabetes mellitus experimental modula la expresión de los genes de los receptores T1R2 Y T1R3 y el número de corpúsculos gustativos en la papila caliciforme de la rata.

IX. BIBLIOGRAFÍA

*Adler, E., Hoon, M.A., Mueller, K.L., Chandrashekar, J., Ryba, N.J., Zuker, C.S. 2000. A novel family of mammalian taste receptors. *Cell*. 100:693-702.

*American Diabetes Association. 2003. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 26:s5-s20.

*American Diabetes Association. 2014. Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*. Volume 37, Supplement 1. DOI: 10.2337/dc14-S014.

*ATLAS de la DIABETES de la FID. 2013. Versión online del Atlas de la Diabetes de la FID: www.idf.org/diabetesatlas. ISBN: 2-930229-80-2.

*Bigiani, A. 2001. Mouse taste cells with glia-like membrane properties. *J. Neurophysiol.* 85:1552-1560.

* Bradley, R.M., Cheal M. L. and Kim Y. H. (1980) Quantitative analysis of development in gepiglottal taste buds in sheep. *J. Anat.*, 130: 25-32.

* Bravo, R., Matito, S., Cubero, J., Paredes, S., Franco, L., Rivero, M., & ... Barriga, C. (2013). Tryptophan-enriched cereal intake improves nocturnal sleep, melatonin, serotonin, and total antioxidant capacity levels and mood in elderly humans. *Age*, 35(4), 1277-1285. doi:10.1007/s11357-012-9419-5.

*Buck, L.B. 2000. Smell and Taste: The Chemical senses. En: Kandel, E.R., Schwatz, J.H., Jessell, T.M. *Principles of Neural Sciences*. McGraw Hill, pp. 625-647.

*Carmena, R. 2008. Riesgo elevado de disfunción lipoproteica en diabetes mellitus. *Rev Esp Cardiol Supl*;8:19C-26C

*Casper, R.C., Kirschner, B., Sandstead, H.H., Jacob, R.A., and Davis, J.M. 1980. An evaluation of trace metals, vitamins and taste function in anorexia nerviosa. *Am. J. Clin. Nutr.* 33:1801-1808.

*Chaudhari N., Roper S.D. (2010). The cell biology of taste. *The journal of cell biology*. Vol. 190, No. 3.285-296.

* Chen, Peihua. Zhang, Chen, Peng. Zhou, Ziyu. Hu, Junsong and Wang, Ping. 2011. A serotonin-sensitive sensor for investigation of taste cell-to-cell communication. *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2011) 3054–3058.

*Clapp, T.R., Yang, R., Stoick, C.L., Kinnamon, S.C., and Kinnamon, J.C. 2004. Morphologic characterization of rat taste receptor cells that express components of the phospholipase C signaling pathway. *J. Comp. Neurobiol.* 468:311-321.

*Deems, D.A., Doty, R.L., Settle, R.G., Moore-Gillon, V., Shaman, P., Mester, A.F., Kimmelman, C.P., Brighman, V.J., Snow, J.B Jr. 1991. Smell and taste disorders, a study of 750 patients from the University Pennsylvania Smell and Taste Center. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 117: 519-528.

* Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 2013. *DIABETES CARE*, VOLUME 36, SUPPLEMENT 1. DOI: 10.2337/dc13-S067.

* Díaz-Marsá, M., Lozano, C., Herranz, A. S., Asensio-Vegas, M. J., Martín, O., Revert, L., & ... Carrasco, J. L. (2006). Depleción aguda de triptófano en trastornos de la conducta alimentaria. (Spanish). *Actas Espanolas De Psiquiatria*, 34(6), 397-402.

*Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados nacionales. (2012) 1ª Edición. México.

*Filip, M., and Bader, M. 2009. Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacological Reports*, 61: 761-777.

*Fuentes, A.; Fresno, M. J.; Santander, H.; Valenzuela, S.; Gutiérrez, M. F. & Miralles, R. 2010. Sensopercepcion Gustativa: una Revision. *J. odontostomat.*, 4(2):161-168.

*Fujimoto, S., Ueda, H. and Kagawa, H. 1987. Immunocytochemistry on the localization of 5-HT on monkey and rabbit taste buds. *Acta Anat.* 128, 80-83.

*Galindo, María Mercedes. Schneider, Nanette Yvette. Stähler, Frauke. Töle, Jonas. Meyerhof, Wolfgang. 2012. Taste Preferences. *Progress in Molecular Biology. Elsevier Inc. and Translational Science*, Vol. 108 383 DOI: 10.1016/B978-0-12-398397-8.00015-0.

*Jaber, L., Zhao, F., Kolli, T., & Herness, S. (2014). A Physiologic Role for Serotonergic Transmission in Adult Rat Taste Buds. *Plos ONE*, 9(11), 1-18. doi:10.1371/journal.pone.0112152

*Kettaneh, A., Fain, O., Stirnemann, J., Thomas, M. 2002. Taste disorders. *La Revue de Médecine Interne.* 23:622-631.

*Kirti Kaul, Joanna M. Tarr, Shamim . Ahmad, Eva M. Kohner and Rakesh Chibber. 2012. INTRODUCTION TO DIABETES MELLITUS. *Diabetes: An Old Disease, a New Insight.* Capitulo 1. 1-11.

- *Kim, D.J., and Roper, S.D. 1995. Localization of serotonin in taste buds: a comparative study in four vertebrates. *J. Comput. Neurol.* 353: 364-370.
- *Le Floch, J.P., Le Lievre, G., Sadoun, J., Perlemuter, L., Peynegre, R., Hazard J. 1989. Taste impairment and related factors in type I diabetic patients. *Diabetes Care.* 12:173-178.
- * Lihong, W., Mulette-Gillman, O. A., Gadde, K. M., Kuhn, C. M., McCarthy, G., & Huettel, S. A. (2009). The effect of acute tryptophan depletion on emotional distraction and subsequent memory. *Social Cognitive & Affective Neuroscience*, 4(4), 357-368. doi:10.1093/scan/nsp025.
- * Ljungvall, I., Höglund, K., Lilliehöök, I., Oyama, M., Tidholm, A., Tvedten, H., & Häggström, J. (2013). Serum Serotonin Concentration Is Associated with Severity of Myxomatous Mitral Valve Disease in Dogs. *Journal Of Veterinary Internal Medicine*, 27(5), 1105-1112. doi:10.1111/jvim.12137.
- *Lindemann B. (2001) Receptor and transduction in taste. *Nature*, Vol. 443: 219-225.
- * Mateos, S. S., Sánchez, C. L., Paredes, S. D., Barriga, C., & Rodríguez, A. B. (2009). Circadian Levels of Serotonin in Plasma and Brain after Oral Administration of Tryptophan in Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 104(1), 52-59. doi:10.1111/j.1742-7843.2008.00333.x
- *Mattes, R.D., Cowart, B.J., 1994. Dietary assessment of patients with chemosensory disorders. *J. Am. Diet. Assoc.* 04:50-56.
- *Miller, S.M., Naylor, G.J. 1989. Unpleasant taste-anelgected symptom in depression. *J. Affect. Disord.* 17:291-293.
- *Munn-Chernoff, MA, McQueen, MB, Stetler, GL, Haberstick, BC, Rhee, SH, Sobik, LE, y ... Stallings, MC (2012). Examinación de las asociaciones entre los trastornos alimentarios y los polimorfismos del gen transportador de serotonina. *International Journal of Eating Disorders* , 45 (4), 556-561. doi: 10.1002 / eat.22001
- *Murray, R.G. 1986. The mammalian taste bud type III cell: a critical analysis. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* 95:175-188.
- *Nada, O. and Hirata, K. 1975. The occurrences of the cell type containing a specific monoamine in the taste but of the rabbit's foliate papilla. *Histochemistry.* 43: 237-240.

- *Nagai, T., Delay, R.J., Welton, J., and Roper, S.D. 1998. Uptake and release of neurotransmitter candidates, serotonin, glutamate and gammaaminobutyric acid, in taste buds of the mudpuppy. *Necturus Maculosus*. *J. Comput. Neurol.* 392: 199-208.
- * Nakamaru-Ogiso, E., Miyamoto, H., Hamada, K., Tsukada, K., & Takai, K. (2012). Novel biochemical manipulation of brain serotonin reveals a role of serotonin in the circadian rhythm of sleep-wake cycles. *European Journal Of Neuroscience*, 35(11), 1762-1770. doi:10.1111/j.1460-9568.2012.08077.x
- *Perea Martinez I, Nagai T, Chaudhari. 2013. Functional Cell Types in Taste Buds Have Distinct Longevities. *PLoS ONE* 8(1): e53399. doi:10.1371/journal.pone.0053399.
- * Prabhakar, V., Gupta, D., Kanade, P., & Radhakrishnan, M. (2015). Diabetes-associated depression: The serotonergic system as a novel multifunctional target. *Indian Journal Of Pharmacology*, 47(1), 4-10. doi:10.4103/0253-7613.150305.
- * Prado Rodríguez, L. y Mercado Camargo, R. 2010. Efecto de la DME sobre la expresión de receptores del gusto azucarado en las papilas calciforme y fungiforme de la rata. *Ciencia Nicolaita No. Especial 2010*.
- *Purves, Dale. 2001. Invitación a la Neurociencia. Editorial medica Panamericana. 611 pp.
- *Ramos Rodriguez, Hector Gabriel y Domingo Méndez, José. 2004. Diabetes Mellitus Experimental. *Ciencia Veterinaria*. 357-358 p.
- *Roper, S.D. 2006. Cell Communication in taste buds. *Cell Mol Life Sci.* 63 (13), 1494-1500. doi:10.1007/s00018-006-6112-9.
- * Saadat, K. S., O'Shea, E., Colado, M. I., Elliott, J. M., & Green, A. R. (2005). The role of 5-HT in the impairment of thermoregulation observed in rats administered MDMA ('ecstasy') when housed at high ambient temperature. *Psychopharmacology*, 179(4), 884-890. doi:10.1007/s00213-004-2106-1.
- * Scharinger, C., Rabl, U., Kasess, C. H., Meyer, B. M., Hofmaier, T., Diers, K., & Lanzenberger, R. (2014). Platelet Serotonin Transporter Function Predicts Default-Mode Network Activity. *Plos ONE*, 9(3), 1-10. doi:10.1371/journal.pone.0092543
- *Stolbova, K., Hahn, A., Benes, B., Andel, M., Treslova, L. 1999. Gustometry of diabetes mellitus patients and obese patients. *Int. Tinnitus. J.* 5:135-140.
- *Surgita, M. 2006. Taste perception and coding in the periphery. *Cell. Mol. Life Sci.* 63:2000-2015.

- *Walther, D.J., Peter, J.U., Bashammaks, S., Hortnagl, H., Voits, M., Fink, H. and Bader, M. 2003. Synthesis of a serotonin a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*. 299, 76.
- *Winkler, S., Garg, A.K., Mekayarajjanononth, T., Bakaeen, L.G., Khan, E. 1999. Depressed taste and smell in geriatric patients. *J. Am. Den. Asso.* 130:1759-1765.
- *Yang, R., Crowley, H.H., Rock, M.E., Kinnamon, J.C. 2000b Taste cells with synapses in rat circumvallate papillae display SNAP-25 like immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* 424:205-215.
- *Yang, R., Tabata, S., Crowley, H.H., Margolskee, R.F., Kinnamon, J.C. 2000a. Ultrastructural localization of gustducin immunoreactivity in microvilli of type II taste cell in the rat. *J. Comp. Neurol.* 425:139-151.
- *Yan, W., Sunavala, S., Rosenzweig, S., Dasso, M., Brand, J.G., Spielman, A.I. 2001. Bitter taste transduced by PLC beta2 dependent rise in IP3 and alphasgustducin-dependent fall in cyclic nucleotides. *Am. Psysiol. Cell Psysiol.* 280:c742-c745.
- *Yee, C.L., Yang, R., Bottger, B., Finger, T.E. and Kinnamon, J.C. 2001. Type III cells of rat taste buds: immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific enolase, protein gene product 9.5, and serotonin. *J. Comput. Neurol.* 440: 97-108.
- *Zancanaro, C., Sbarbati, A., Bolner, A., Accordini, C., Piemonte, G., and Osculti, F. 1995. Biogenic amines in the taste organ. *CHEM. Senses* 20: 329-335.
- * Zheng er, J., Bich-Na, S., In-Hye, K., Hyun Joo, L., Jun-Hwan, Y., Min-Jae, L., & Yun-Lyul, L. (2011). Roles of Non-cholinergic Intrapancreatic Nerves, Serotonergic Nerves, on Pancreatic Exocrine Secretion in the Isolated Perfused Rat Pancreas. *Korean Journal Of Physiology & Pharmacology*, 15(5), 307-312. doi:10.4196/kjpp.2011.15.5.307.