



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLAS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**PARTICIPACIÓN DE LA SEROTONINA EN EL DESARROLLO
DE LAS PAPILAS GUSTATIVAS DE RATÓN**

**TESIS QUE PRESENTA
Q.F.B. OMAR GUZMÁN QUEVEDO**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

DIRECTORES:

**DR. ZURISADDAI HERNÁNDEZ GALLEGOS
DR. ROSALÍO MERCADO CAMARGO**

MORELIA, MICH., DICIEMBRE DE 2007

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS -----	iv
LISTA DE FIGURAS -----	vi
LISTA DE TABLAS -----	viii
RESUMEN -----	ix
ABSTRACT -----	x
I. INTRODUCCION -----	1
I.1 Los mecanismos neurofisiológicos de la percepción del sabor -----	1
I.2 Organización neuro-anatómica y funcional del sistema gustativo -----	3
I.3 Aspectos moleculares de la detección del sabor -----	7
I.3.1 Mecanismos moleculares de la detección de los sabores salados y ácidos -----	8
I.3.2 Mecanismos moleculares de la detección de los sabores dulce y amargo -----	9
I.3.3 Mecanismos moleculares de la detección del sabor umami -----	11
I.4 Codificación e integración de las señales gustativas a nivel periférico y central -----	13
I.5 Sistemas de neurotransmisión y señalización gustativa -----	15
I.5.1 El sistema serotoninérgico -----	16
I.5.2 Otros sistemas de neurotransmisión -----	17
I.6 Desarrollo y plasticidad del sistema gustativo -----	20
I.7 Generalidades del sistema serotoninérgico -----	23
II. JUSTIFICACION -----	28
III. HIPOTESIS -----	29
IV. OBJETIVO GENERAL -----	30
V. OBJETIVOS ESPECIFICOS -----	30
VI. MATERIALES Y METODOS -----	31
VI.1 Animales -----	31
VI.2 Obtención de las muestras -----	31
VI.2.1 Biología molecular -----	31
VI.2.2 Inmunohistoquímica -----	32
VI.2.3 Tinción de hematoxilina-eosina -----	32

VI.3 Análisis de la expresión genética de la TPH1 y la TPH2 -----	32
VI.3.1 Extracción del ARN total -----	32
VI.3.2 Cuantificación y análisis de la pureza del ARN -----	33
VI.3.3 Reacción de transcripción reversa (RT) -----	33
VI.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) -----	34
VI.4 Análisis de la expresión relativa de la TPH1 y TPH2 -----	36
VI.4.1 Selección y validación de los oligonucleótidos -----	37
VI.4.2 Validación del control interno -----	38
VI.4.3 PCR en Tiempo Real -----	39
VI.4.4 Análisis de los datos obtenidos de la PCR en Tiempo Real -----	39
VI.4.5 Análisis estadístico -----	40
VI.5 Inmunohistoquímica -----	40
VI.5.1 Inmunodetección de la TPH -----	41
V.5.2 Inmunolocalización de la TPH en el epitelio lingual -----	42
VI.5.3 Determinación de síntesis de serotonina en el epitelio lingual -----	44
VI.5.4 Análisis del efecto de la inactivación genética de la TPH1 sobre el sistema gustativo lingual -----	44
V.5.5 Documentación de los experimentos de inmunohistoquímica -----	47
VII. RESULTADOS -----	48
VII. 1 Expresión de la TPH1 y la TPH2 en papilas gustativas de embriones de ratón --	48
VII. 2 Abundancia relativa de los transcritos de la TPH1 y la TPH2 en papilas gustativas de embriones de ratón -----	50
VII. 3 Expresión de la TPH en papilas gustativas de ratón en desarrollo -----	53
VII. 4 Localización celular de la TPH en papilas gustativas de ratón -----	54
VII.4.1 Inmunolocalización de la TPH en papilas gustativas de ratón neonato -----	54
VII.4.2 Inmunolocalización de la TPH en papilas gustativas diferenciadas de ratón ----	55
VII. 5 Síntesis de serotonina en papilas gustativas de ratones adultos controles y Ko TPH1 -----	56
VII. 6 Efecto de la carencia de la TPH1 sobre la formación, innervación y morfología de las papilas gustativas -----	59

VII. 6.1 Efecto de la carencia de la TPH1 sobre el patrón de innervación de las papilas caliciformes -----	60
VII. 6.2 Efecto de la carencia de la TPH1 sobre el número de papilas fungiformes -----	60
VII. 5.3 Efecto de la carencia de la TPH1 sobre la morfología de las papilas	
Caliciformes -----	63
VIII. DISCUSION -----	64
IX. CONCLUSIONES -----	68
X. REFERENCIAS -----	69

LISTA DE ABREVIATURAS

AADC	decarboxilasa de aminoácidos aromáticos, por sus siglas en inglés
AC	adenilil ciclasa
AchE	acetilcolina esterasa
ADN	ácido desoxiribonucleico
ADNc	ácido desoxiribonucleico complementario
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido desoxiribonucleico mensajero
ARNr	ácido desoxiribonucleico ribosomal
ATP	adenosin trifosfato, por sus siglas en inglés
BDNF	factor neurotrófico derivado del cerebro, por sus siglas en inglés
Bmp	proteína morfogénica de hueso, por sus siglas en inglés
°C	grado Celsius
CCK	colecistoquinina, por sus siglas en inglés
cGTP	guanosin trifosfato cíclico
CHO	ovario de hámster chino, por sus siglas en inglés
C _T	ciclo umbral, por sus siglas en inglés
DAG	diacil glicerol
DNase	desoxiribonucleasa
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos, por sus siglas en inglés
g	gramo
GPCR	receptor acoplado a proteína G, por sus siglas en inglés
GTP	guanosin trifosfato, por sus sigla en inglés
h	hora
iGlu R	receptor ionotrópico del glutamato
IP ₃	inositol 1,4,5-trifosfato
MAO A	monoamina oxidasa A
MAO B	monoamina oxidasa B
µg	microgramo
mGluR	receptor metabotrópico del glutamato

μL	microlitro
mL	mililitro
NA	noradrenalina
NaCl	cloruro de sodio
nm	nanogramo
NMDA	receptor N-metil-D-aspartato
NeuroD	factor de diferenciación neurogénica
NPY	Nueropéptido Y
NT3	neurotrofina 3
NTS	núcleo del tracto solitario
PAF	paraformaldehído
Pb	pares de bases
PBS	buffer salino de fosfatos, por sus siglas en inglés
PCR	reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés
PDE	fosfodiesterasa, por sus siglas en inglés
PGP 9.5	protein gen product 9.5
PIP ₂	fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
PLC	fosfolipasa C, por sus siglas en inglés
PLC β_2	fosfolipasa C del tipo β_2
RNase	ribonucleasa
RT	transcriptasa reversa, por sus siglas en inglés
RT-PCR	transcriptasa reversa seguida de una PCR
s	segundo
SERT	transportador de serotonina, por sus siglas en inglés
Shh	sonic hedgehog
TA	temperatura ambiente
Tm	temperatura de fusión
TPH	triptofano hidroxilasa, por sus siglas en inglés
VIP	péptido vasoactivo intestinal, por
5-HT	5-hidroxitriptamina
5-HT _(n)	receptores serotoninérgicos

LISTA DE FIGURAS

1. Organización neuroanatómica del sistema gustativo en mamíferos -----	3
2. Estructura de las células gustativas -----	4
3. Organización estructural de las células gustativas en la lengua -----	5
4. Mecanismos moleculares de la transducción de la información gustativa -----	7
5. Desarrollo e innervación de las papilas gustativas en ratón -----	21
6. Sitios de síntesis de serotonina -----	25
7. Esquema de disección de las diferentes papilas gustativas de ratón -----	32
8. Representación esquemática de la morfología de la papila caliciforme -----	47
9. Identificación de los transcritos de la TPH1 y la TPH2 en papilas gustativas de ratón en desarrollo -----	49
10. Identificación del ARNm de ambas isoformas de TPH en lengua total de embriones de 13 días de gestación -----	49
11. Gel representativo de la electroforesis de los productos de amplificación obtenidos por PCR en Tiempo Real -----	50
12. Curvas de fusión de los productos de amplificación de la PCR en Tiempo real -	51
13. Curva de fusión de los productos de amplificación del gen ARN 18S -----	52
14. Niveles de expresión del gen ARNr 18S en diferentes etapas del desarrollo de las papilas gustativas -----	52
15. Abundancia relativa de los transcritos de la TPH1 y la TPH2 en papilas caliciformes de ratón en desarrollo -----	53
16. Detección inmunohistoquímica de la triptofano hidroxilasa en el epitelio lingual de ratón en desarrollo -----	54

17. Expresión de la TPH en fibras gustativas de papilas caliciformes de ratón	
neonato -----	56
18. Localización de la expresión de la TPH en papilas gustativas diferenciadas ----	57
19. Doble marcaje inmunohistoquímico de la TPH y serotonina -----	58
20. Imagen ampliada del doble marcaje inmunohistoquímico de TPH y 5-HT ---	59
21. Efecto de la inactivación genética de la TPH1 sobre el patrón de innervación de	
las papilas caliciformes de ratón-----	61
22. Visualización inmunohistoquímica de las papilas fungiformes -----	62
23. Efecto de la inactivación genética de la TPH1 sobre el número de papilas	
fungiformes en lengua de ratones control y ratones Ko TPH1 -----	62

LISTA DE TABLAS

I. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de PCR para el análisis de la expresión genética de la TPH1 y TPH2 -----	36
II. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de PCR en Tiempo Real para el análisis de la expresión relativa de la TPH1 y TPH2 -----	38
III. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de PCR en Tiempo Real para la amplificación del control interno -----	38
IV. Efecto de la inactivación genética de la TPH1 sobre la morfología de las papilas caliciformes -----	63

RESUMEN

Las papilas gustativas constituyen la unidad estructural y funcional del sistema gustativo que está encargado de la detección, traducción y análisis de la información sávida presente en los alimentos. Por otro lado, la serotonina (5-Hidroxitriptamina, 5-HT) además de sus funciones como neurotransmisor se ha implicado en eventos del desarrollo como factor trófico. Existen evidencias experimentales que indican la presencia del neurotransmisor y de sus sistemas de recaptura y degradación en el epitelio lingual durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, hasta la fecha no ha sido reportada la presencia de un sistema serotoninérgico en el epitelio lingual, por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar si existe este sistema en el epitelio lingual y si la 5-HT participa en la formación e innervación de las papilas gustativas de ratón en desarrollo. Se realizaron experimentos de biología molecular y de inmunohistoquímica para detectar la presencia de la triptofano hidroxilasa (TPH), enzima limitante en la síntesis de 5-HT. También se empleó la técnica de inmunohistoquímica para evaluar el efecto de la 5-HT sobre la innervación y el número de papilas gustativas. En todos los ensayos utilizamos ratones de la cepa C57BL/6J controles y Ko TPH1. Observamos la presencia de la TPH1 y TPH2 en las papilas gustativas, por otro lado en los ratones Ko TPH1 se observó disminución de la densidad de innervación de la papila caliciforme y una reducción del número de papilas fungiformes. En base a estas observaciones, proponemos que las acciones tróficas de la 5-HT sobre el sistema gustativo son moduladas por un sistema serotoninérgico inherente al epitelio lingual.

ABSTRACT

Gustatory papillae and associated taste buds receive and process chemical information from the environment. In mammals, their development takes place during the late phase of embryogenesis. However, the cellular factors that regulate the differentiation of taste papillae remain largely unknown. Here, we show by quantitative real time RT-PCR that both isoforms of tryptophan hydroxylase (TPH1 and TPH2), the first and rate limiting enzyme of serotonin (5-HT) synthesis, are expressed in developing circumvallate papillae. Immunostaining experiments further indicated that TPH is localized both in gustatory fibers and in differentiated taste receptor cells. These results point to the synthesis of 5-HT in gustatory papillae, and allow one to hypothesize that the development of taste buds might be modulated by serotonin

I. INTRODUCCION

I.1 Los mecanismos neurofisiológicos de la percepción del sabor

El sabor corresponde al ensamblaje de las sensaciones percibidas durante la masticación de los alimentos. Desde el punto de vista fisiológico, este concepto abarca una noción compleja, en el sentido común esto se llama “el sabor de un alimento”. En efecto, el sabor engloba la percepción de los olores y los estímulos gustativos (salado, amargo, dulce, ácido y umami) producida durante la masticación, además de las sensaciones producidas por la textura, la temperatura y la astringencia (picante) de los alimentos. A nivel neurofisiológico, la percepción del sabor es la resultante de la estimulación combinada de tres sistemas sensoriales: el olfato, el gusto y el tacto, que junto con el oído y la visión, constituyen los cinco sentidos de los que disponen los mamíferos para tener una representación lo más fiel posible del ambiente. La comprensión de las bases celulares de la percepción del sabor de un alimento recae, así pues, sobre el conocimiento de los mecanismos fisiológicos de la gustación, del olfato y del tacto. Sin embargo, el estudio de la neurofisiología gustativa y olfativa durante mucho tiempo atrajo poco la atención de los neurobiólogos y de los fisiopatólogos. Esta falta de interés está ligada a la noción de placer evocado por la olfacción y la gustación en oposición a la visión y la audición considerados como las funciones sensoriales indispensables para la interacción con el ambiente. Cabe señalar, sin embargo, que el gusto y la olfacción contribuyen igualmente a la digestión en el inicio de las secreciones a nivel gastrointestinal (Mattes, 1997), y están íntimamente asociados con la selección y el rechazo de los alimentos dañinos y potencialmente tóxicos (Dethier, 1993; Doty, 1993). La olfacción y la gustación al parecer juegan un papel fisiopatológico más vasto que el asociado a la digestión. En efecto, la pérdida de la sensibilidad gustativa (ageusia) y/o olfativa (anosmia), se asocian con disminución de peso, desnutrición, desordenes inmunitarios y a la degradación del estado de salud general de personas mayores (Mattes and Coward, 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, un sobreconsumo de sal en estos individuos (Sahagún-Flores *et al.*, 2000). De la

misma manera, la elevación del umbral gustativo es frecuente en los pacientes atendidos de diabetes de tipo I y II (Le Floch *et al.*, 1989, 1990; Stolbova *et al.*, 1999). En el área nutricional, una correlación negativa se observa 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 desordenes 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).

La percepción de las moléculas odorantes y sápidas comienza en células receptoras especializadas a partir de las cuales la información, vía diversos circuitos neuronales, es transmitida al cerebro. En el sistema olfativo, el primer elemento de este circuito de comunicación esta constituido por las neuronas olfativas organizadas en forma de epitelio en la parte posterior de la cavidad nasal. A partir de esta región, la información es enviada al área olfativa de la corteza cerebral de donde es transportada a diversas estructuras del sistema límbico que modulan los efectos emocionales de los olores. En el caso del gusto, la detección de las moléculas sápidas se efectúa gracias a las células gustativas donde la estimulación pone en juego una red neuronal que se extiende desde la lengua, el paladar y la faringe hasta la extremidad inferior de la corteza parietal. Las redes neuronales utilizadas por los sistemas olfativos y gustativos son pues diferentes. Sin embargo, estos dos sistemas trabajan principalmente en sinergismo. Es el caso particular durante la detección del sabor de un alimento, el cual es, de hecho, la resultante de la activación combinada de los receptores olfativos y gustativos por los aromas y las moléculas sápidas liberadas durante la masticación, respectivamente.

I.2 Organización neuro-anatómica y funcional del sistema gustativo

En los mamíferos, la detección y la percepción de las moléculas sápidas ponen en juego una red neuronal que se extiende desde la lengua, el paladar, la faringe y la parte superior del esófago hasta la extremidad inferior de la corteza parietal pasando por el núcleo del tracto solitario y el núcleo posterior del tálamo, dos estructuras localizadas a nivel del tronco cerebral (**Figura 1**). El primer elemento de este circuito de transmisión, es un tipo de células epiteliales especializadas denominadas células gustativas (**Figura 2**), que se agrupan en corpúsculos formando las papilas gustativas (Guyton, 1996; Buck, 2000) (**Figura 3**).

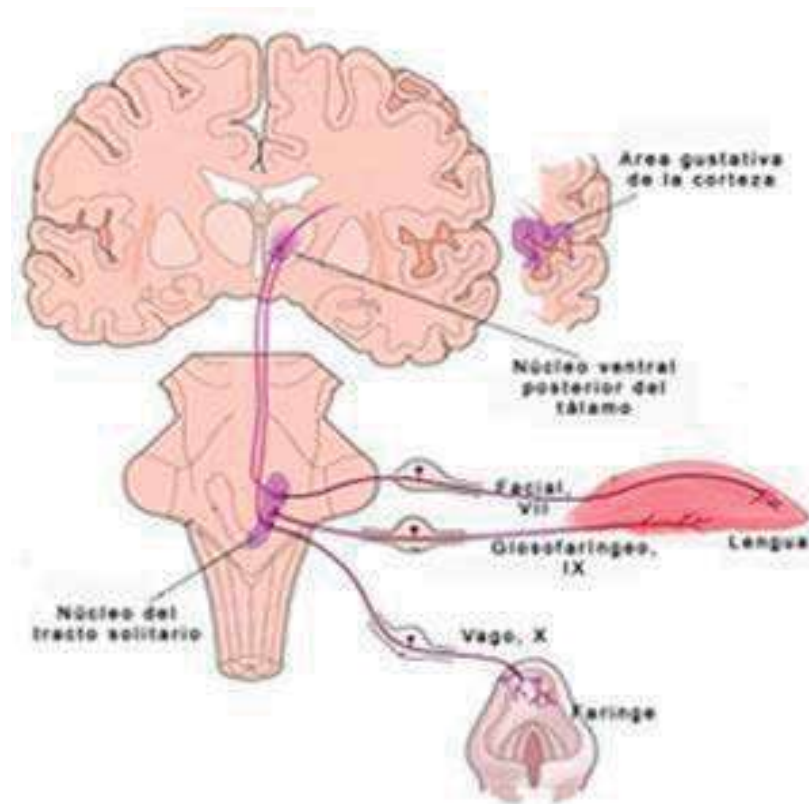


Figura 1. Organización neuroanatómica del sistema gustativo en mamíferos. Redes neuronales implicadas en la detección e integración de las señales gustativas a nivel del epitelio lingual y de la faringe. La innervación por los nervios craneales VII (facial), IX (glossofaríngeo) y X (vago) permite transportar la información gustativa proveniente de las papilas gustativas a la corteza gustativa, pasando por el núcleo del tracto solitario, a nivel del tallo cerebral, y núcleo ventral posterior del tálamo.

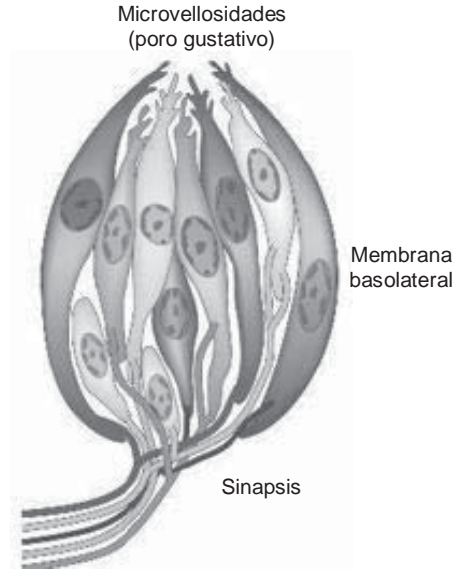
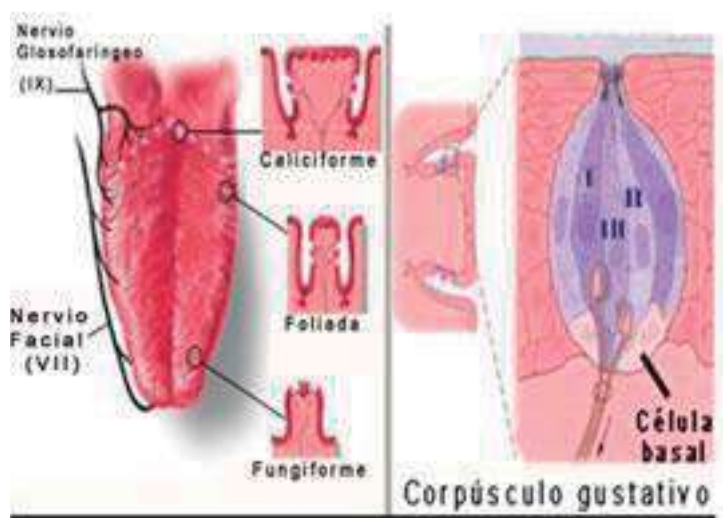


Figura 2. Estructura de las células gustativas. Se puede apreciar la morfología de la célula gustativa. Es una célula bipolar, en el polo apical presenta microvellosidades, es aquí donde las células interaccionan con las moléculas sápidas, en el polo basal las células establecen contacto sináptico con las fibras aferentes. Foto modificada de Huang *et al.*, 2006.

Las papilas gustativas (del latín papilla = eminencia), atendiendo a su morfología se dividen en tres clases diferentes: fungiforme (forma de hongo), caliciforme (forma de botón) y foliada (forma de crestas), y cada una de ellas está constituida de un número variable de corpúsculos gustativos. 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 corpúsculos gustativos. Las papilas caliciformes se encuentran en la tercera parte posterior de la lengua. El número de este tipo de papilas es de 7-9 en humanos y solo una en el caso de roedores; aun siendo un número reducido, estas constituyen el 48% del total de corpúsculos gustativos. Por otro lado, las papilas foliadas se localizan en los lados de la tercera parte posterior de la lengua. Solo existen dos papilas de esta clase, las cuales contienen el 34% de los corpúsculos gustativos presentes en la lengua (**Figura 3**).



Modificado de Chandrashekar et al., 2006

Figura 3. Organización estructural de las células gustativas en la lengua. Las células gustativas se agrupan en corpúsculos para formar las papilas gustativas. Existen tres tipos diferentes de papilas gustativas, las cuales tienen una localización específica en la lengua. Además, las papilas caliciformes y foliadas están constituidas por un número superior de corpúsculos gustativos.

Se distinguen igualmente cuatro tipos morfológicamente diferentes de células gustativas al interior de cada corpúsculo: las células basales, oscuras (tipo I), claras (tipo II) e intermedias (tipo III) (**Figura 3**). Las células basales son pequeñas células esféricas localizadas en la base del corpúsculo a partir de las cuales son generadas todas las células gustativas (Buck, 2000). Las células oscuras, claras e intermedias, en cuanto a ellas, se caracterizan por su forma bipolar. Estas células envían sus prolongaciones hacia la cavidad bucal donde interactúan con las moléculas sápidas presentes en los alimentos y hacia la base del corpúsculo gustativo (Buck, 2000; Lindemann, 2001) (**Figura 2 y 3**) en donde establecen los contactos sinápticos con las fibras que las inervan (Buck, 2000; Lindemann, 2001) (**Figura 3**). Las células gustativas de tipo I poseen propiedades similares a las células gliales (Bigiani, 2001), esto es, servir de sostén al corpúsculo gustativo y regular las concentraciones extracelulares de iones al interior del corpúsculo. Las células de tipo II expresan la maquinaria necesaria para la detección y transducción de las señales gustativas (Boughter *et al.*, 1997; Adler *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000a y 2000b; Yee *et al.*, 2001; Defazio *et al.*, 2006). Sin embargo, ellas no forman sinapsis

estructuralmente definida con las fibras aferentes primarias (Clapp *et al.*, 2004). Por otro lado, las células de 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, como mencionamos anteriormente, en las células de tipo II.

Las papilas gustativas son inervadas por los nervios craneanos: facial (VII), glossofaríngeo (IX) y vago (X) (**Figura 1 y 3**). Las fibras sensoriales del nervio facial, a través de la cuerda del tímpano, transporta la información gustativa a la corteza cerebral proveniente de las papilas fungiformes, mientras que la información proveniente de las papilas caliciformes y foliadas es transportada al cerebro vía nervio glossofaríngeo. Finalmente, el nervio vago es el encargado de trasladar al cerebro la información proveniente de la faringe. Todos los nervios que establecen contacto sináptico con las células gustativas convergen a nivel de la región rostral del núcleo del tracto solitario (NTS) localizado en el tronco cerebral (Guyton, 1996; Buck, 2000). Las proyecciones de segundo orden son luego conectadas con el núcleo ventro-postero-medial del tálamo. Las neuronas del núcleo ventro-postero-medial se proyectan hacia la parte anterior de la ínsula en el lóbulo cortical temporal (**Figura 1**) y hacia el opérculo en el lóbulo cortical frontal. Estas regiones son consideradas como las áreas cerebrales gustativas donde toma lugar la percepción conciente del gusto. Ciertos nervios implicados en la transmisión de las señales gustativas contienen igualmente fibras somatosensoriales que establecen contacto sináptico con el epitelio lingual y el tejido muscular que rodea a los corpúsculos gustativos (Guyton, 1996; Buck, 2000). Estas fibras, denominadas fibras perigemales en oposición a las fibras intragemales que inervan las células gustativas, se proyectan también al área gustativa del NTS. Además, también existe un área cortical al nivel de la corteza orbito-frontal donde las neuronas responden a diferentes combinaciones de estímulos gustativos/visuales y olfativos/somato-sensoriales. Esta región podría representar el centro cerebral del sabor.

I.3 Aspectos moleculares de la detección del sabor

Existen cinco modalidades de sabor diferentes: el sabor dulce, amargo, salado, ácido y el umami, un sabor recientemente descrito generado por ciertos aminoácidos. A nivel molecular, la detección y traducción de los sabores es efectuada por receptores que se localizan en la superficie de las microvellosidades presentes en la membrana apical de las células gustativas (**Figura 4**). En función de la naturaleza del sabor, el receptor activado pertenecerá, ya sea, a la familia de receptores de tipo canal, en los cuales el sitio de unión para el ligando y un canal iónico forman parte de un mismo complejo macromolecular, o bien al tipo de receptores acoplados a proteínas G. En el ultimo caso, la estimulación del receptor activa una proteína que tiene la particularidad de fijar el GTP, de allí su nombre de proteína G. Esta proteína esta constituida de tres subunidades (α , β y γ) capaces de activar diversos sistemas de señalización intracelulares. La detección y traducción de los sabores salados y ácidos es efectuada por receptores de tipo canal mientras que los receptores acoplados a proteínas G intervienen en la detección de los sabores dulce, amargo y umami.

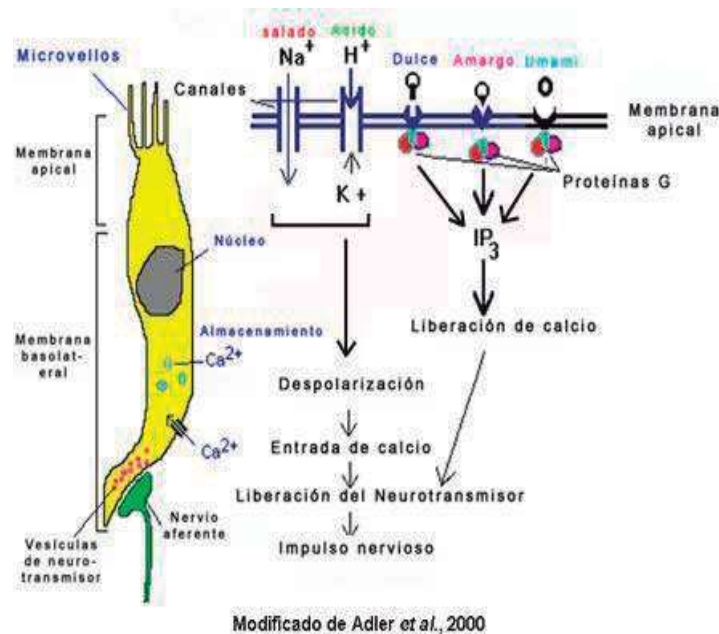


Figura 4. Mecanismos moleculares de la transducción de la información gustativa. Se puede apreciar la anatomía de la célula gustativa, la localización de los receptores gustativos (en las microvellosidades de la membrana apical) y las vías de transducción de las señales gustativas.

I.3.1 Mecanismos moleculares de la detección de los sabores salados y ácidos

Todos los vertebrados, poseen células gustativas que responden a los sabores salado y ácido. En mamíferos, la excitación débil de estas células produce una sensación agradable sin embargo, cuando la estimulación es fuerte produce una sensación desagradable generando un comportamiento de aversión.

La percepción del sabor salado se asocia con la acción de los iones (Na^+) presente en forma de sal en los alimentos y principalmente en forma de cloruro de sodio (NaCl), la sal de mesa. La detección de los estímulos salados se efectúa a través de la interacción de los iones sodio con los canales iónicos sensibles a la amilorida (un guanidinio heterocíclico que bloquea reversiblemente los canales epiteliales de Na^+) (Boughter, 1997) (**Figura 4**). La interacción del NaCl con estos canales, se produce por la difusión de iones sodio al interior de la célula gustativa contra un gradiente electroquímico generando una despolarización de la membrana (Avenet and Lindemann, 1991), esto dirige a la producción de potenciales de acción que resultan en la liberación de un neurotransmisor (serotonina, noradrenalina o ATP) sobre las fibras nerviosas aferentes (Lindemann, 1996) después del influjo de iones de calcio (Ca^{2+}). Varias sales sódicas son saladas, no obstante, la intensidad de su percepción depende de la talla de su anión asociado, por ejemplo, el NaCl es más salado que el acetato de sodio a la misma concentración. Estas diferencias de sensibilidad a las sales de Na^+ resultan, probablemente, de las diferentes capacidades de los aniones para penetrar las uniones fuertes (tight junction) presentes entre las células gustativas e interaccionar con los canales basolaterales, a través de una ruta paracelular (Ye *et al.*, 1991; Elliott and Simon, 1990).

Al parecer los protones son los responsables del estímulo agrio, ya que el sabor agrio generado por compuestos ácidos es proporcional a la concentración de protones. La percepción del sabor ácido de un alimento, resulta de la interacción de los protones (H^+) liberados durante la masticación con diversos tipos de canales iónicos. Los protones extracelulares son capaces de bloquear canales de K^+ (Cummings and Kinnamon, 1992)

(Figura 4), impidiendo la salida de este catión, lo cual provoca una despolarización y la generación de potenciales de acción por la activación de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje, resultando en la liberación del neurotransmisor sobre las fibras gustativas aferentes. Estudios genéticos y funcionales recientes han demostrado que el receptor PKD2L1 (polycystic kidney disease), un miembro de la familia de canales iónicos TRP (transient receptor potencial), es selectivamente expresado en una población de células gustativas distintas a las que median los sabores dulce, umami y amargo (Huang *et al.*, 2006). La ablación, por la acción de la toxina diftérica, de las células que expresan este receptor produce animales con una pérdida total de la percepción del sabor ácido, manteniendo intacta la capacidad de identificar los demás sabores. Sin embargo, el mecanismo por el cual PKD2L1 puede mediar las respuestas a los sabores ácidos no ha sido descrito.

I.3.2 Mecanismos moleculares de la detección de los sabores dulce y amargo

La detección y traducción de las señales gustativas de tipo amargo y dulces es efectuada por receptores acoplados a proteínas G (Figura 4). Dos familias de receptores se han descrito para dichas modalidades de sabor: el grupo de los receptores T1R que comprende de miembros: T1R1, T1R2 y T1R3 (Hoon *et al.*, 1999; Max *et al.*, 2001; Montmayeur *et al.*, 2001), y la familia de los receptores T2R compuesta por 40-80 miembros diferentes en el hombre (Adler *et al.*, 2000; Meyerhof, 2005). Ambas familias de receptores tienen la particularidad de expresarse diferencialmente, esto es, los receptores T2R se expresan preferencialmente en células gustativas de las papilas caliciformes y foliadas y raramente en células de las papilas fungiformes (Adler *et al.*, 2000; Meyerhof, 2005; Behrens *et al.*, 2006). Por el contrario, los receptores T1R están presentes principalmente en células de las papilas fungiformes (Hoon *et al.*, 1999). Debido a que las papilas fungiformes son particularmente sensibles al sabor dulce, mientras que las papilas caliciformes son más sensibles al sabor amargo, se empezó a especular que los receptores de la familia T1R estaban implicados en la detección del sabor dulce, mientras que los receptores de la familia T2R lo estaban en la detección del sabor amargo (Chandrashekar *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2001). Cabe señalar sin

embargo, que la gustducina, la proteína G implicada en la transducción de señales dulces y amargas, no esta presente en todas las células que expresan los receptores de tipo T1R o T2R. De la misma forma, los receptores del sabor amargo y dulce, identificados a la fecha, no siempre se presentan en las células que expresan la gustducina. Además, la inactivación de la expresión de esta proteína transductora, por mutación nula, no provoca la perdida completa de la percepción a los compuestos amargos y dulces (Wong *et al.*, 1996). Estas observaciones sugieren que en la detección de los sabores dulces y amargos puede intervenir todavía otra familia de receptores, incluso otras proteínas G. Además, no se descarta que ciertos compuestos anfifílicos amargos o dulces, tengan la capacidad de atravesar las membranas e interactuar directamente con la gustducina u otras proteínas de señalización, sin la participación de los receptores membranales (Naim *et al.*, 1994; Damak *et al.*, 2003; Peri *et al.*, 2000).

Además de la diferencia de selectividad opuesta a los compuestos amargos y dulces, los receptores T1R y T2R se distinguen por su estructura molecular y su modo de activación. Aunque los dos tipos de receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés), los tres subtipos de receptores T1R identificados a la fecha se caracterizan por tener un dominio amino-terminal extracelular de talla grande (400-600 residuos), que constituye el sitio de unión para el ligando. Mientras que la región amino-terminal extracelular de los receptores del sabor amargo es mucho más corta y el sitio de unión para los compuestos amargos se localiza en un dominio transmembranal del receptor. Además, los receptores del sabor amargo funcionan como proteínas alostéricas monoméricas, en las cuales la fijación del ligando induce un cambio de conformación capaz de activar las proteínas G. Mientras que el receptor del sabor dulce funciona como heterodimero donde las interacciones entre sus unidades son esenciales para su actividad. Así, la asociación de T1R2 y T1R3 forman un complejo macromolecular capaz de reconocer los compuestos dulces como sacarina, sacarosa, aminoácidos y algunas proteínas dulces (Nelson *et al.*, 2001, 2002; Li *et al.*, 2002).

A nivel intracelular, todas las vías de transducción de los receptores de los sabores amargo y dulce conducen a un aumento del calcio (Ca^{2+}) intracelular seguido de la liberación de un neurotransmisor (**Figura 4**). En el caso particular de los edulcorantes artificiales y azúcares, el aumento del Ca^{2+} intracelular es consecuencia de la activación de la enzima fosfolipasa C de tipo β_2 ($\text{PLC}\beta_2$). Como parte de su actividad enzimática, esta enzima cataliza la formación de diacilglicerol (DAG) y de inositol trifosfato (IP_3) a partir de fosfatidilinositol difosfato (PIP_2). El aumento de la concentración de IP_3 provoca la liberación de iones Ca^{2+} del retículo endoplásmico generando una despolarización de la célula y la liberación del neurotransmisor. Una segunda vía, activada por algunos azúcares, involucra el sistema enzimático de la adenilato ciclasa (AC), quien cataliza la formación de pirofosfato y adenosin monofosfato cíclico (cAMP, por sus siglas en inglés). Este último, bloquea los canales basolaterales de K^+ , vía la activación de una cinasa dependiente de cAMP provocando la despolarización de la célula. En papilas caliciformes de rata, se ha demostrado recientemente que la sacarosa induce un aumento de la concentración intracelular de guanosin monofosfato cíclico (cGMP, por sus siglas en inglés), sugiriendo la existencia de una tercera vía de transducción intracelular de señales dulces (Krizhanovsky *et al.*, 2000). En el caso de los mecanismos de transducción de las señales amargas, esto implica la activación de una fosfodiesterasa (PDE) y de la $\text{PLC}\beta_2$ (Yan *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003; Scott, 2004). La activación de la PDE involucra una disminución de la concentración de nucleótidos cíclicos cAMP y cGMP en la célula. Esto lleva a una apertura de canales de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ generando una despolarización celular. La activación de la $\text{PLC}\beta_2$ involucra, como en el caso de la activación por compuestos dulces, la síntesis de IP_3 que induce la liberación de calcio intracelular.

I.3.3 Mecanismos moleculares de la detección del sabor umami

El término japonés “umami” (sabor delicioso) es utilizado para designar una sensación gustativa diferente de la salada, ácida, amarga y dulce. Fue en 1908 que el profesor de química japonés, Kikunae Ikeda, identifica este novedoso sabor, al degustar un caldo de alga marina denominada “kombu”. El no reconoció ninguno de los cuatro sabores básicos descritos (dulce, salado, ácido y amargo). El le llamó a este novedoso sabor “umami”.

Después de los años 80's, los defensores de la teoría de los cuatro sabores añadieron este quinto sabor a los ya existentes, conservando el nombre de umami. El umami es un sabor distintivo de los espárragos, los tomates, el queso, el consomé de pollo y el extracto de carne. Este sabor es generado por las sales glutámicas, principalmente por el L-glutamato monosódico que uno encuentra naturalmente en muchos alimentos, además de otros aminoácidos y péptidos.

Se sugirió la participación de una forma truncada en la parte N-terminal del receptor metabotrópico del glutamato del tipo 4 (mGluR4t), en la percepción gustativa del L-glutamato. Se mostró que este receptor está presente en las células gustativas (Chaudhari *et al.*, 1996; Toyono *et al.*, 2002), y que cuando es expresado en células CHO (ovario de hámster chino, por sus siglas en inglés) estas responden al L-glutamato en una gama de concentraciones correspondientes a las observadas en los estudios de percepción gustativa *in vivo* (Chaudhari *et al.*, 2000). Recientemente, Toyono y col. (2003) estudió la expresión en las papilas gustativas de los otros dos miembros del grupo III de receptores metabotrópicos del glutamato (mGluR): mGluR1 y mGluR5. Si mGluR5 no se expresa, mGluR1 es intensamente expresado, particularmente a nivel de las microvellosidades de las células gustativas que emergen del poro del corpúsculo gustativo. La participación de mGluR1 en la percepción del umami es, por lo tanto, posible. Sin embargo, al utilizar un sistema de expresión *in vitro*, se mostró que las células que expresan la combinación de los receptores T1R1+T1R3 responden a la estimulación con L-glutamato (Nelson *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002), y que la doble inactivación de la expresión de estos receptores *in vivo*, abate completamente las respuestas celulares y comportamentales al umami (Zhao *et al.*, 2003). Estos resultados sugieren fuertemente que la percepción gustativa del umami recae únicamente en la combinación de los receptores T1R1+T1R3.

La activación del receptor T1R1+T1R3 por el glutamato monosódico conduce, de la misma manera que la estimulación amarga y azucarada, a un aumento en la concentración intracelular de calcio y a la liberación del neurotransmisor hacia las fibras sensoriales (**Figura 4**). La activación del receptor metabotrópico del tipo del glutamato, es seguida de una disminución de la concentración de cAMP intracelular involucrando

una elevación de la concentración de Ca^{2+} , conduciendo ésta, a la generación de un impulso nervioso transmitido al sistema nervioso aferente. Un mecanismo adicional de transducción intracelular del umami pone en juego la apertura o bloqueo de canales iónicos ha sido propuesto. Los receptores ionotrópicos al L-glutamato (iGluR) son expresados en el tejido gustativo. Datos electrofisiológicos utilizando un inhibidor de los iGluR, el N-metil D-aspartato (NMDA), han confirmado que estos receptores están igualmente implicados en la percepción del umami (Lin and Kinnamon, 1999). Estos receptores son similares a los de canales catiónicos que, cuando son abiertos, permiten la entrada a la célula de iones de Na^+ y Ca^{2+} . Este influjo induce una despolarización de las células gustativas conduciendo a la transmisión de una señal eléctrica al nervio aferente primario.

I.4 Codificación e integración de las señales gustativas a nivel periférico y central

El termino codificación gustativa engloba los mecanismos por los cuales la información sobre la identidad y la concentración de las sustancias sápidas es integrada en los corpúsculos gustativos y luego representada por el patrón de potenciales de acción transmitidos al cerebro. Las teorías concernientes a la codificación de las señales gustativas se basan exclusivamente en registros electrofisiológicos realizados en las fibras aferentes primarias de los nervios gustativos. De esta manera se mostró que cada fibra gustativa responde preferencialmente aun tipo de estímulo. Por ejemplo, la cuerda del tímpano, una rama del par craneano numero VII o nervio facial, responde preferencialmente al NaCl y a la sacarosa, mientras que el nervio glosofaríngeo responde preferencialmente a los ácidos y a la quinina. Sin embargo, otros estudios han mostrado que una fibra periférica puede responder preferencialmente a la sacarosa pero también ser activada por la fructosa, el NaCl y el ácido acético, en relación a esto, se han propuesto dos hipótesis sobre la codificación de la información gustativa: la hipótesis “computacional” y la de las “líneas dedicadas” (Smith and St. John, 1999; Schiffman, 2000). El modelo de las líneas dedicadas clasifica las fibras gustativas en función de su respuesta preferencial para tal o tales estímulos y considera que una célula responderá con el máximo de potenciales de acción por unidad de tiempo a uno de los cinco

estímulos gustativos. La consecuencia de esta proposición, es que la información gustativa es transmitida al cerebro por vías que preservan la especificidad de las clases de fibras. Por ejemplo, cada categoría gustativa estimula un solo tipo celular y un solo tipo de fibras. Para el modelo computacional, la percepción gustativa es determinada por la combinación de las respuestas de todas las células, y por ende, de todas las fibras, a un estímulo particular independientemente de su nivel de actividad.

A nivel central, ciertos datos obtenidos a nivel del núcleo del tracto solitario, tálamo y corteza, están a favor de un modo de respuesta preferencial. Ciertamente, se ha mostrado que la amilorida inhibe únicamente la actividad de las neuronas que responden preferencialmente al NaCl sin que la actividad de las neuronas que responden a los otros estímulos gustativos sean afectados (Hettiger and Frank, 1990). Sin embargo, ciertas neuronas de estas regiones cerebrales responden a varias sustancias sápidas, este hecho favorece al modelo computacional (Gilbertson and Gilbertson, 1994).

Estudios novedosos efectuados sobre receptores gustativos clonados no permiten aún, discernir de manera definitiva entre el modelo de líneas dedicadas y la hipótesis computacional. De hecho, si bien un receptor puede reconocer moléculas de estructura diversa perteneciente a la misma categoría gustativa, el hecho que una misma célula pueda responder a dos estímulos de naturaleza gustativa diferente, permanece aún en controversia. Aunque estudios de electrofisiología (Patch-Clamp) en células individuales, y la medición de las concentraciones intracelulares de calcio, han mostrado que una misma célula gustativa puede ser estimulada por compuestos amargos y dulces, experimentos de biología molecular han demostrado que los receptores del sabor amargo y dulce no son coexpresados en células gustativas (Adler *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2001). Además, experimentos recientes realizados en animales transgénicos (Mueller *et al.*, 2005) han mostrado que la inactivación genética de los receptores T2R5 en ratón, elimina completamente las respuestas celulares y comportamentales inducidos por el compuesto amargo cicloheximida sin alterar las respuestas inducidas por los compuestos dulces, salados y ácidos. Además, después de la expresión en ratón del receptor humano activado por el β -glucopiranosido, un compuesto de sabor amargo al cual el ratón no es

naturalmente sensibles, los ratones transgénicos responden al β -glucopiranosido con la misma sensibilidad detectada en el hombre. Finalmente, los ratones en los cuales la expresión del receptor a la espiradolina, un compuesto opioide que no evoca ninguna sensación sávida, fue llevada a cabo bajo el control del promotor de los receptores del sabor dulce, muestran una preferencia gustativa por las soluciones que contienen la espiradolina (Nelson *et al.*, 2002). Por el contrario, la espiradolina evoca comportamientos gustativos repulsivos de los ratones en los cuales la expresión del receptor para este compuesto es realizada bajo el control del promotor de los receptores del sabor amargo (Mueller *et al.*, 2005). En base a estas observaciones que se han descrito brevemente, se ha propuesto la existencia de células dedicadas selectivamente a la detección del sabor dulce o del sabor amargo y que la percepción de una o de otra de estas categorías gustativas dependerá únicamente del tipo de célula activada. En otros términos, el dulce y el amargo sería una característica celular y no la propiedad de los receptores o de las moléculas gustativas (Mueller *et al.*, 2005).

I.5 Sistemas de neurotransmisión y señalización gustativa

En los apartados anteriores hemos visto que la percepción de los estímulos gustativos comprende varias etapas, donde la primera consiste en la fijación de una molécula sávida sobre los receptores específicos presentes en la membrana apical de las células gustativas. Seguida de esta interacción, se desencadena una cascada de señalización intracelular que conduce a la liberación de uno o varios neurotransmisores en la base del corpúsculo, y por consecuencia, a la estimulación de las fibras gustativas encargadas de transportar la información a las áreas gustativas de la corteza cerebral donde toma lugar la percepción consciente de los sabores. Para que un neurotransmisor pueda estar implicado en la señalización gustativa debe:

- a) Localizarse y liberarse a partir células gustativas o de las fibras gustativas.
- b) Tener efectos estimulantes o inhibitorios sobre las células gustativas.

Además, debe existir:

- c) Un sistema de recaptura y/o de degradación del neurotransmisor presente en el epitelio lingual
- d) Expresión en las células gustativas o fibras gustativas de receptores específicos al neurotransmisor.

Varios sistemas de neurotransmisión han sido implicados en la transmisión de la información entre las células gustativas y las fibras nerviosas, pero hasta el momento, no se ha descrito neurotransmisor que reúna los criterios antes mencionados.

I.5.1 El sistema serotoninérgico

La serotonina es el neurotransmisor más estudiado en la señalización gustativa. Mediante experimentos de inmunohistoquímica la presencia de serotonina en un subtipo de células gustativas de tipo III ha sido reportada por varios autores, en rata (Yee *et al.*, 2001), ratón (Kim and Roper, 1995), conejo (Nada and Hirata, 1975) y mono (Fujimoto *et al.*, 1987; Kim and Roper, 1995). La presencia de serotonina igualmente ha sido detectada en células basales en papilas gustativas de ajolote (Barlow *et al.*, 1996; Barlow and Northcutt, 1998). Midiendo de manera indirecta la liberación de serotonina por autoradiografía cuantitativa, Nagai y col. (1998) mostraron que ciertas células gustativas del anfibio *Necturus maculosus* tienen la capacidad de almacenar y de liberar serotonina. Posteriormente, otros autores demostraron la expresión del transportador de serotonina en células gustativas de rata (Ren *et al.*, 1999). Recientemente, Huang y col. (2005a y 2005b) utilizaron células CHO (ovario de hámster chino, por sus siglas en inglés) que expresan el receptor serotoninérgico 5-HT_{2C} como un biodetector, con el fin de analizar el proceso de liberación de la serotonina a partir de células gustativas. De esta manera, los investigadores mostraron que la estimulación de los corpúsculos gustativos de ratón por compuestos dulces, amargos o ácidos involucra la liberación de serotonina. De manera interesante, la liberación de 5-HT por estas categorías gustativas inició, al parecer, de manera independiente del calcio extracelular.

Por otra parte, estudios de registro de la actividad de las células gustativas por la técnica de Patch-Clamp han mostrado que la serotonina modula la apertura de los canales de calcio en células gustativas de anfibios (Delay *et al.*, 1994) e inhibe el flujo de las corrientes de Na^+ y K^+ en células gustativas de mamíferos (Herness and Chen, 1997; Herness and Chen, 2000). Finalmente, experimentos de RT-PCR y de inmunohistoquímica mostraron que las papilas gustativas de rata adulta expresan dos tipos de receptores serotoninérgicos: el receptor 5-HT_{1A} y el receptor 5-HT₃ (Kaya *et al.*, 2004). El receptor 5-HT_{1A} se localiza en células gustativas que no expresan serotonina, mientras que el receptor 5-HT₃ es expresado en las fibras gustativas aferentes. En base a esto, se propuso que en respuesta a un estímulo sávido ciertas células gustativas de tipo III liberan la serotonina. Así, la 5-HT liberada modula la actividad de las células gustativas adyacentes a través de la interacción con receptores 5-HT_{1A} (modulación de tipo paracrina), y estimula las fibras aferentes vía la activación de receptores 5-HT₃ (transmisión sináptica). Sin embargo, este escenario deja en suspenso varias cuestiones. Primero, actualmente se desconoce de donde proviene la serotonina contenida en las células gustativas. En otras palabras, no se sabe si las células gustativas poseen únicamente la capacidad de almacenar serotonina o si ellas tienen igualmente la propiedad de sintetizar esta monoamina. Segundo, la inactivación genética del receptor 5-HT₃ no produce ninguna modificación de la percepción gustativa de los compuestos amargos, dulces, ácidos o salados (Finger *et al.*, 2005).

I.5.2 Otros sistemas de neurotransmisión

Un número considerable de evidencias experimentales indican que el adenosin trifosfato (ATP) es también un neuromediador implicado en la señalización gustativa. Primero, las fibras aferentes que inervan los corpúsculos gustativos expresan receptores purinérgicos de tipo P2X₂ y P2X₃ (Bo *et al.*, 1999). La participación de estos receptores en la transmisión de la información entre las células y fibras gustativas fue puesto en evidencia recientemente por Finger *et al.*, (2005). Estos investigadores demostraron, en efecto, que las respuestas electrofisiológicas de la cuerda del tímpano o del nervio glossofaríngeo generadas por los estímulos gustativos están ausentes en animales transgénicos que no

expresan los receptores P2X2 y P2X3. Sin embargo, estos animales conservan la sensibilidad al frío y al tacto indicando que únicamente la percepción gustativa es afectada. De acuerdo con estos resultados a nivel celular, Finger y col. (2005) reportaron que los animales doblemente Knockout (Ko) P2X2/P2X3 no presentan respuesta alguna a la mayoría de los compuestos sápidos en pruebas comportamentales de percepción gustativa.

Además de la serotonina y del ATP, se han propuesto neurotransmisores como noradrenalina (NA), acetilcolina y glutamato; y diversos péptidos como colecistoquinina (CCK), péptido vasoactivo intestinal (VIP), neuropéptido Y (NPY) y leptina en la señalización gustativa. Sin embargo, la única evidencia que permite sugerir la implicación de la mayor parte de estos neuromediadores en la percepción gustativa, es su localización y la de sus receptores al interior de los corpúsculos gustativos (Nagai *et al.*, 1996; Kawai *et al.*, 2000; Herness *et al.*, 2002; Herness *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2005 y Zhao *et al.*, 2005).

En lo que concierne al tipo de neurotransmisor implicado en la transmisión de la señal del corpúsculo gustativo hasta NTS, estudios recientes han mostrado que la neuronas de la región rostral del NTS pueden ser estimuladas por glutamato (Li and Smith, 1997) y la sustancia P (Davis and Smith, 1997) e inhibidas por el ácido γ -aminobutírico (Smith and Li, 1998) y la metencefalina (Li *et al.*, 2003). La presencia de acetilcolinesterasa (AChE) en la región rostral del NTS y en el nervio glossofaríngeo (Barry *et al.*, 1993a), sugiere que el sistema colinérgico esta también implicado en la modulación de las señales gustativas a nivel del área gustativa del NTS.

La información gustativa trasportada por la cuerda del tímpano durante la ingestión de alimentos esta estrechamente asociada a la información somatosensorial trasportada por el nervio trigémino y varios autores sugieren que las dos vías nerviosas interactúan a diferentes niveles. Dentro de este contexto, Wang y col. (1995) mostraron que la estimulación eléctrica del nervio trigémino disminuye la intensidad de las respuestas gustativas evocadas por NaCl en la cuerda del tímpano a través de un mecanismo que

implica, probablemente, neuromoduladores como los neurotransmisores clásicos (NA y 5-HT) o neuropéptidos. Estas observaciones han sido reforzadas por los trabajos recientes de Simons y col. (2003) donde mostraron que la capsaicina, una sustancia que activa las fibras nociceptoras del trigémino, reduciendo las respuestas gustativas evocadas por el NTS. En el sistema nervioso central, se ha observado una convergencia entre los influjos somestésicos y gustativos a nivel cortical (Hanamori *et al.*, 1997, Cerf-Ducastel *et al.*, 2001), talámica (Nomura and Ogawa, 1985) y en el núcleo parabrancial (Hayama *et al.*, 1987).

Por otra parte, se ha propuesto que el NTS podría ser el sitio anatómico donde la interacción de las señales gustativas y somatosensoriales provenientes de los corpúsculos tome lugar. Estudios anatómicos en diferentes especies animales, en efecto, han revelado que un número importante de proyecciones del nervio trigémino localizadas en la parte rostral del NTS se superponen con las proyecciones provenientes de la cuerda del tímpano. Además, se han registrado neuronas en el NTS que responden a estimulaciones mecánicas y gustativas (Travers and Norgren, 1995). Sin embargo, se desconoce si estas células nerviosas responden a la estimulación mecánica debido a la activación trigémina o de la excitación de la cuerda del tímpano. Finalmente, se estableció que las fibras nerviosas de la cuerda del tímpano presentan una sensibilidad mecánica y térmica a la vez (Matsuo *et al.*, 1995). Estas observaciones de orden anatómico y electrofisiológico son reforzadas por datos de comportamiento y clínicos que sugieren igualmente interacciones entre estímulos somatosensoriales y gustativos. Por ejemplo, la transección a nivel periférico de las aferentes trigeminales disminuye selectivamente ciertos comportamientos de ingestión producidos por preferencias alimenticias en la rata (Berridge and Fentress, 1985) y los pacientes que sufren de lesiones o de neuropatías trigeminales presentan anomalías de la función gustativa (Grant *et al.*, 1987).

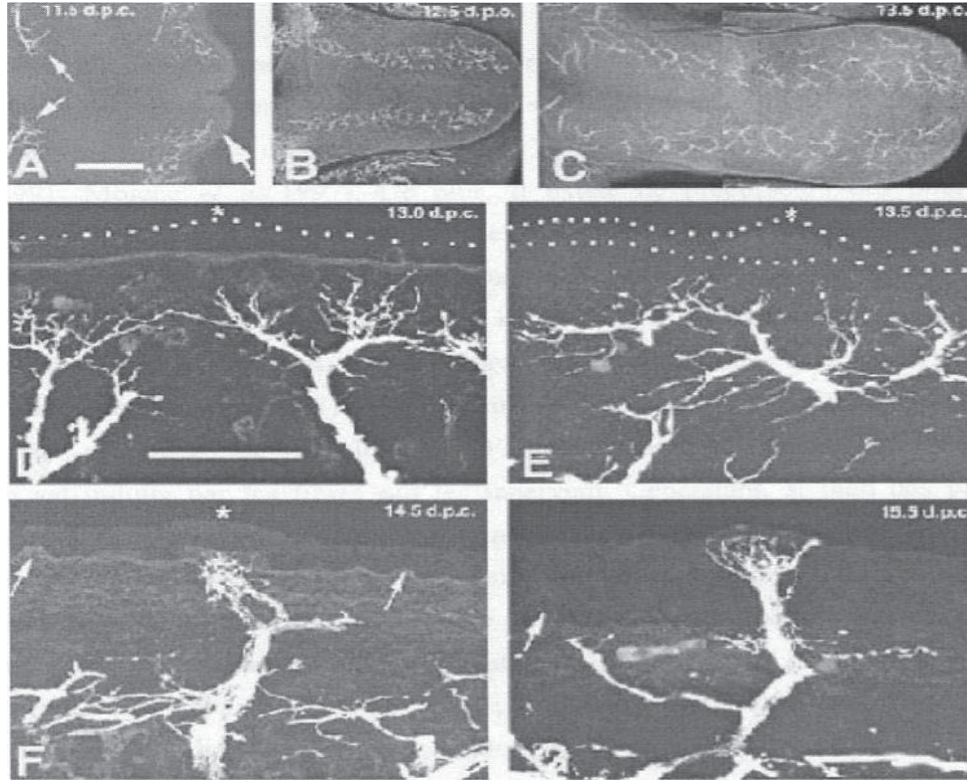
Los nervios gustativos (VII, IX y X) y la cuerda del tímpano (V), participan, por lo tanto, en la transmisión de las señales gustativas y somatosensoriales hacia la parte rostral del NTS. En esta estructura convergen igualmente las señales que provienen de otros

sistemas sensoriales, como la visión y la audición. Esta riqueza y complejidad de información sensorial constituye la base de la percepción del sabor de un alimento.

I.6 Desarrollo y plasticidad del sistema gustativo

Las células gustativas son sometidas a un proceso constante de renovación, en el ratón por ejemplo, el tiempo de vida promedio de una célula gustativa es de 9-10 días (Beidler and Smallmann, 1965; Farbman, 1980). A fin de mantener el mismo nivel y la misma calidad de las sensaciones gustativas, es indispensable que toda terminación nerviosa que se desprende de una célula muerta se fije a una célula en vía de diferenciación que posea las mismas características funcionales, de tal suerte que una fibra nerviosa que estuvo, por ejemplo, en contacto con una célula que responde a estímulos dulces, forme de nuevo sinapsis con una célula gustativa del mismo tipo. Los factores celulares, así como los mecanismos moleculares que controlan estos procesos constantes de renovación celular se desconocen a la fecha en gran medida. Lo mismo ocurre con los mecanismos y/o los factores implicados en la pérdida de la sinapsis, muerte y diferenciación de las células gustativas en el adulto. Esta carencia de conocimiento, estriba en gran parte en la imposibilidad de analizar, *in vitro*, los procesos de renovación e innervación de las células gustativas aisladas a partir de lenguas de animales adultos. Sin embargo, un cierto número de datos se han obtenido a partir de estudios enfocados sobre el desarrollo de las vías gustativas en embrión (**Figura 5**). Las papilas y corpúsculos gustativos provienen del endodermo y su formación en el curso del desarrollo ocurre poco tiempo después de la aparición de las primeras fibras nerviosa en la lengua (12.5 días embrionarios o E12.5) (Farbman and Mbiene, 1991; Whitehead and Kachele, 1994). Sin embargo, cuando explantes de endodermo de salamandra o de lengua de rata sin innervación son sometidos a cultivo, las papilas gustativas se desarrollan con las mismas características morfológicas y el mismo perfil temporal de diferenciación que *in vivo* (Barlow *et al.*, 1996; Farbman and Mbiene, 1991; Mbiene *et al.*, 1997b). Además, los precursores de los corpúsculos gustativos en el epitelio lingual existen antes de que las células sean innervadas (Mbiene and Roberts, 2003). Estas observaciones han llevado a muchos investigadores a proponer que el desarrollo de las papilas y corpúsculos gustativos es una propiedad inherente al

epitelio lingual y que estos procesos no dependen de las señales provenientes de las fibras nerviosas (Mbiene *et al.*, 1997b; Barlow *et al.*, 1996; Mbiene and Roberts, 2003).



Mbiene and Roberts, 2003

Figura 5. Desarrollo e innervación de las papilas gustativas en ratón. A 11.5 días de gestación, las proyecciones del nervio glosofaríngeo están presentes en la parte posterior de la lengua primitiva (A). A 12.5 días las fibras nerviosas aparecen a un costado del surco medio de la lengua (B). (C) a los 13.5 días embrionarios, la lengua es mas estructurada y el proceso de innervación esta mas avanzado. (D) a 13 días de gestación, aparecen los precursores de los corpúsculos gustativos en el epitelio, mas no se observa contacto con los nervios localizados en el epitelio lingual. (E) a 13.5 días embrionarios se observa el arribo de las terminaciones nerviosas a las estructuras prepapilares. (F) a los 14.5 días de gestación las fibras nerviosas establecen contacto con os precursores de corpúsculos gustativos. A los 15.5 días embrionarios, se puede observar la papila gustativa desarrollada con la correspondiente innervación de los precursores de los corpúsculos gustativos (G).

En este sentido, la formación de las papilas gustativas se distingue del proceso de desarrollo de otras estructuras sensoriales donde la diferenciación es inducida por las

fibras que las inervan. Sin embargo, si bien las papilas gustativas pueden diferenciarse *in vitro* en ausencia de innervación, ellas no pueden garantizar la diferenciación y conservación de los corpúsculos gustativos (Barlow, 2003). Además, si los nervios facial o glossofaríngeo son seccionados se presenta una disminución progresiva del número de corpúsculos gustativos, los cuales reaparecen después de que estos nervios son regenerados (Hosley *et al.*, 1987; Oakley *et al.*, 1993; Whitehead *et al.*, 1987; Barry *et al.*, 1993b; Suzuki *et al.*, 1996). Finalmente, la supresión genética del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) o de la neurotrofina 3 (NT3) conduce a una disminución severa de la densidad de innervación gustativa y somatosensorial, del número de corpúsculos, así como del número de papilas fungiformes (Cooper and Oakley, 1998; Nosrat *et al.*, 1996; Nosrat *et al.*, 1997; Oakley *et al.*, 1998). Por lo tanto, si bien las papilas gustativas pueden desarrollarse inicialmente sin innervación, las neurotrofinas y otros factores tróficos, aun no identificados, liberados por las fibras nerviosas son esenciales para garantizar la diferenciación y la conservación de los corpúsculos gustativos.

Además del BDNF y de la NT3, los procesos de diferenciación de los corpúsculos gustativos pudiesen estar regulados por la proteína señal sonic hedgehog (Shh), o por las proteínas del desarrollo pertenecientes a la familia de las Proteínas morfogénicas de hueso (Bmp, por sus siglas en inglés), del tipo Bmp2, Bmp4 y Bmp7. Esta propuesta se basa en las observaciones que indican que la expresión de los ARN mensajeros que codifican para estas proteínas coincide tanto en tiempo como en espacio con la formación de las papilas gustativas (Hall *et al.*, 1999; Jung *et al.*, 1999). Además, experimentos recientes han mostrado que el bloqueo farmacológico *in vitro* de la actividad de Shh y Bmp (2,4y 7) conduce a un aumento del número de papilas fungiformes (Hall *et al.*, 2003; Mistretta *et al.*, 2003) y una disminución de las mismas (Zhou *et al.*, 2006), respectivamente. Estos datos sugieren que estos morfógenos son capaces de alterar el destino de los precursores de las células gustativas.

El epitelio lingual además de poseer la capacidad de formar las papilas gustativas de manera autónoma, también dirige su propia innervación. Según Barlow (1999), el

proceso de innervación de las células gustativas comprende dos etapas. Durante la primera etapa, los axones de las neuronas aferentes son orientados hacia la cavidad bucal por los factores celulares que a larga distancia ejercen un efecto sobre las fibras nerviosas ya sea de repulsión o de atracción. Después, las señales emitidas por los precursores de los corpúsculos gustativos controlan el desarrollo y especifican el sitio donde debe establecerse el contacto sináptico entre las terminales de las fibras sensoriales aferentes y las células gustativas. Otros autores (Rochlin and Farbman, 1998) han sugerido que la primera etapa de innervación de los corpúsculos gustativos es en parte modulada por la semaforina III/D, una sustancia con propiedades repulsivas. La mutación nula de los receptores para esta sustancia provoca, de hecho, alteraciones en la trayectoria axonal del nervio trigémino (Taniguchi *et al.*, 1997), uno de los nervios implicados en la transmisión de las señales gustativas percibidas por las papilas fungiformes (Guyton, 1996; Buck, 2000). Por otra parte, el BDNF ha sido implicado en el establecimiento de los contactos sinápticos específicos entre las células gustativas y las fibras aferentes primarias (Ringstedt *et al.*, 1999). De hecho, la sobreexpresión de esta proteína reduce el número de terminales nerviosas en los corpúsculos gustativos y genera aberraciones morfológicas a nivel sináptico. Considerando la diversidad y multiplicidad de los contactos sinápticos de los corpúsculos gustativos, es probable que además de la semaforina III/D y del BDNF, existan otros factores implicados en la regulación de los procesos de innervación lingual.

Otros factores reguladores de la diferenciación a los cuales se les propone una participación en el desarrollo del sistema gustativo lingual solo en base a su expresión genética en el epitelio lingual durante el desarrollo son: el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés) (Jung *et al.*, 1999) y el factor de diferenciación neurogénica (NeuroD) (Suzuki *et al.*, 2002).

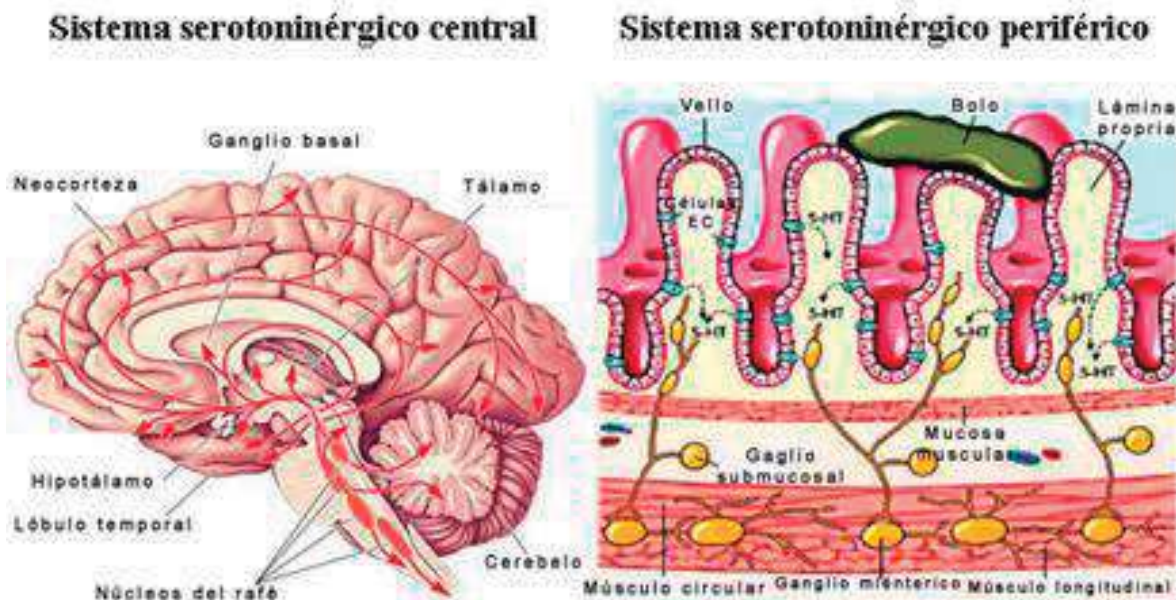
I.7 Generalidades del sistema serotoninérgico

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), es un neurotransmisor implicado en la regulación de múltiples funciones vitales del organismo. Se encuentra distribuido a través de vertebrados e invertebrados. En mamíferos, las fuentes esenciales de 5-HT en el

organismo son: el cerebro y el intestino (**Figura 6**). En estos dos órganos es sintetizada a partir del aminoácido L-triptofano a través de un proceso que comprende dos etapas:

1. Transformación del L-triptofano en 5-hidroxitriptofano por acción de la triptofano hidroxilasa (TPH), de la cual se han descrito dos isoformas TPH1 y TPH2 (Walther *et al.*, 2003). Esta transformación es el punto limitante de la síntesis de 5-HT.
2. Descarboxilación del 5-hidroxitriptofano en 5-hidroxitriptamina. Esta reacción es catalizada por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC, por sus sigla en inglés)

A nivel central, la 5-HT es sintetizada exclusivamente en neuronas llamadas: serotoninérgicas (Dahlström and Fuxe, 1964), lo cual ha sido demostrado por métodos histoquímicos de fluorescencia. Estos autores mostraron que la mayor parte de los cuerpos celulares de las neuronas que sintetizan serotonina se localizan en los núcleos mesencefálicos y bulbares del rafe. A partir de estos núcleos, las neuronas serotoninérgicas envían sus proyecciones descendentes que inervan el tronco cerebral y la medula espinal y ascendentes que inervan diversas estructuras cerebrales como son: la sustancia negra, el glóbulo pálido, el putamen, el caudado, el tálamo, el hipotálamo y la corteza cerebral (Ishimura, 1988; Descarries *et al.*, 1990; Törk, 1990). La 5-HT sintetizada a nivel cerebral es almacenada en vesículas sinápticas en las terminaciones serotoninérgicas de donde será liberada por exocitosis (Martin and Sanders-Bush, 1982; Fedelman and Quenzer, 1984). En el intestino, la 5-HT es sintetizada en las células enterocromafines. Cabe destacar que, en mamíferos, 90% del contenido total de serotonina en el organismo es recapturado en el tracto gastrointestinal y en el plexo mesentérico (Fedelman and Quenzer, 1984; Gershon, 2003; Gershon, 2004). A partir de estas estructuras la 5-HT es liberada a la circulación sanguínea donde es almacenada en gran medida en las plaquetas.



Modificado de: The Enteric Nervous System: A Second Brain, GERSHON, M. D. - Columbia University, 1999.

Figura 6. Sitios de síntesis de serotonina. La serotonina se sintetiza a nivel central en los núcleos del raquí y a nivel periférico en células enterocromafines del intestino.

La serotonina liberada en las terminales serotoninérgicas puede actuar sobre los diferentes receptores de este neurotransmisor e inducir diversos efectos fisiológicos. La interacción serotonina-receptor es, sin embargo, transitoria porque existe a nivel de sinapsis serotoninérgica procesos de inactivación que permiten mantener concentraciones bajas de la amina en el espacio extracelular. Uno de estos procesos implica la degradación enzimática de la 5-HT vía la desaminación oxidativa por la monoamina oxidasa A (MAO A). La serotonina es igualmente inactivada en el espacio sináptico a través de la recaptura vía el transportador de serotonina (SERT o 5-HTT, por sus siglas en inglés) por la neurona presináptica. Una vez recapturada es metabolizada como mencionamos arriba o reciclada en vesículas.

Las funciones fisiológicas de la 5-HT son complejas. Por ejemplo, la densa innervación serotoninérgica de la medula espinal sugiere que la serotonina interviene en el control de las aferentes sensoriales y de las eferentes motrices y, por ende, en el control de la nocicepción. De acuerdo con esta propuesta, la estimulación del núcleo del raquí magno por la administración intratecal de 5-HT produce en el animal una disminución de sensibilidad a los estímulos nociceptivos (Oliveras *et al.*, 1979; Yaksh and Wilson, 1979). Además, la administración de antagonistas de la 5-HT disminuye el efecto analgésico de

la morfina (Proudfit and Anderson, 1975). El sistema serotoninérgico inerva igualmente los ganglios de la base y es, por lo tanto, potencialmente capaz de intervenir en el control de la motricidad. Las estructuras límbicas son ricas en terminaciones serotoninérgicas en donde se le atribuye a la serotonina un papel clave en ciertos procesos de aprendizaje (Decker and McGaugh, 1991), así como en los mecanismos del control de la emoción y del humor. También, una falla en el funcionamiento del sistema serotoninérgico está clásicamente asociado a la fisiopatología de la ansiedad (Iversen, 1984; Johnston and File, 1986; Brawman-Mintzer and Yankers, 2004) y de la depresión (Blier *et al.*, 1987; Curzon, 1988; Eison, 1990; Baldwin and Rudge, 1995; Bourin *et al.*, 2002). A nivel del hipotálamo, la 5-HT participa en el control de las secreciones neuroendocrinas (Vacher *et al.*, 2004), en la termoregulación (Goodwin *et al.*, 1987), en la expresión del comportamiento sexual (Lucki, 1998; Dias and Crews, 2006) y en la ingesta alimenticia (Lucki, 1998). A nivel periférico, la serotonina regula la función cardiovascular (Ni and Watts, 2006), la motilidad intestinal (Gershon, 2003 y 2004) y la agregación plaquetaria durante la coagulación.

Independientemente de su localización en el adulto, la 5-HT ha sido detectada durante la división del cigoto, gastrulación y neurulación en embriones de erizo de mar, rana, pollo y *Drosophila*. La presencia de 5-HT y sus receptores en embriogénesis temprana y la habilidad que tienen ciertos agente farmacológicos (Lauder *et al.*, 1981) específicos de 5-HT para interferir con el desarrollo embrionario sugiere que los embriones primitivos usan 5-HT antes del inicio de la neurogénesis para regular proliferación celular y/o movimientos morfogénicos (Lauder, 1988; Colas *et al.*, 1999). Además, se ha sospechado por años que la serotonina regula morfogénesis craneofacial y cardiovascular: la administración de inhibidores de SERT, como son la sertralina o fluoxetina, a cultivos de embriones de ratón, conduce a malformaciones craneofaciales (Shuey *et al.*, 1992). Por otro lado, en embriones que crecen en presencia de 5-HT o inhibidores del transportador de serotonina, se ha reportado un decremento de la proliferación del miocardio, mesenquima cardíaco y endotelio indicando que la 5-HT puede regular la proliferación celular en el corazón embrionario (Yavarone *et al.*, 1993). La inactivación genética del receptor serotoninérgico 5-HT_{2B} (KO 5-HT_{2B}) conduce a la muerte embrionaria (E11) por

malformaciones e hipoplasias cardiacas (Nebigil *et al.*, 2000). Los animales homocigotos -/- para este receptor presentaron una reducción en los niveles de expresión del receptor tirosin kinasa, ErbB-2, un receptor de membrana involucrado en eventos de diferenciación y proliferación celular. Finalmente, Mercado y col. (1992, 1998) demostraron la presencia en conos de crecimiento axonal, de todos los elementos moleculares necesarios para la unión, la captura, y la liberación de serotonina. Estos datos refuerzan las observaciones hechas por Sikich y col. (1990), las cuales indicaban que la serotonina reducía el crecimiento de los axones y la formación de sinapsis de las neuronas de la corteza cerebral en cultivo. Estos efectos inhibitorios de la serotonina sobre la migración y crecimiento axonal, han sido, igualmente demostrados en diversas especies de moluscos (Haydon *et al.*, 1984, 1987; McCobb *et al.*, 1988; Lima *et al.*, 1996; Koert *et al.*, 2001), en peces (Lima *et al.*, 1994), en rata (Sikich *et al.*, 1990) y en ratón (Cases *et al.*, 1996; Upton *et al.*, 1999). Más recientemente se demostró que la serotonina juega un papel clave en el establecimiento de los patrones de innervación de la corteza somatosensorial y visual (Cases *et al.*, 1996; Upton *et al.*, 1999; Salichon *et al.*, 2001; Gaspar, 2003).

Las múltiples acciones de la serotonina resultan de su interacción específica con diferentes tipos de receptores. En base a datos farmacológicos, bioquímicos, fisiológicos y de biología molecular; se ha admitido, a la fecha, la existencia de al menos 14 receptores serotoninérgicos (Pauwels, 2000; Hoyer *et al.*, 2002), los cuales están agrupados en siete familias: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆, 5-HT₇. La mayoría de los receptores de la serotonina están acoplados a una proteína G y su estimulación modula, ya sea, la actividad de la enzima adenilil ciclasa, o la de la fosfolipasa C (PLC). Estos pertenecen, por lo tanto, a la superfamilia de receptores acoplados a una proteína G como ocurre con algunos receptores del gusto. Los receptores 5-HT₃ constituyen la excepción ya que son de tipo ionotrópico como el caso de los receptores nicotínicos de la acetilcolina y de los receptores no NMDA del glutamato.

II. JUSTIFICACION

Un gran número de evidencias experimentales han implicado a la 5-HT en la detección y la transmisión de las sensaciones gustativas. En particular, se ha mostrado que la serotonina despolariza las neuronas aisladas de las fibras aferentes primarias que inervan los corpúsculos gustativos (Zhong *et al.*, 1999; Koga and Bradley, 2000), y reduce la permeabilidad de las células gustativas a los iones de sodio (Imendra *et al.*, 2000; Imendra *et al.*, 2002) y potasio (Herness and Chen, 1997 y 2000). Por otra parte, las células gustativas de diversas especies de mamíferos, incluyendo el hombre, tienen la capacidad de almacenar y de liberar serotonina (Kim and Roper, 1995; Azzali, 1997; Ren *et al.*, 1999; Yee *et al.*, 2001).

Numerosos estudios han demostrado que la serotonina, además de su papel como neurotransmisor, participa como factor trófico modulando diferentes eventos del desarrollo como: diferenciación celular, proliferación celular, morfogénesis craneofacial, crecimiento cardíaco y crecimiento y migración axonal (Buznikov *et al.*, 2001).

Por otro lado, varios estudios sugieren que además de modular el funcionamiento de las vías gustativas en el adulto, la serotonina regula los procesos de innervación y formación de las papilas y corpúsculos gustativos. Estudios efectuados en embriones de rata, han mostrado que el ARNm que codifica para el transportador de 5-HT (5-HTT) se expresa en células del epitelio lingual (Hansson *et al.*, 1999). Además, ambas isoformas de monoamina oxidasa (A y B), la enzima responsable del catabolismo de la serotonina, han sido también encontradas en el epitelio lingual de ratón de 17 días de desarrollo embrionario (Vitalis *et al.*, 2002). Finalmente, se ha demostrado la presencia de serotonina en células basales de los corpúsculos gustativos de ajolote (Barlow *et al.*, 1996). La importancia de estas observaciones reside en el hecho de que las células basales de estos anfibios están implicadas en el mantenimiento de la integridad morfológica de las células gustativas, así como en el inicio del proceso de formación e innervación de los corpúsculos gustativos (Barlow *et al.*, 1996; Toyoshima *et al.*, 1999).

Todas estas evidencias experimentales sugieren la presencia de un sistema serotoninérgico inherente al epitelio lingual, el cual no ha sido demostrado. La presencia de la mayoría de los componentes de dicho sistema en etapas embrionarias, además de los antecedentes de la participación de la serotonina en diferentes eventos del desarrollo, nos lleva a establecer la siguiente hipótesis de trabajo:

III. HIPOTESIS

“Existe síntesis de serotonina en el epitelio lingual la cual participa en el desarrollo de las papilas gustativas.”

IV. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la posible participación trófica de la serotonina en el desarrollo de las papilas gustativas.

V. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la posible expresión de la TPH, la enzima limitante en la síntesis de 5-HT, en las papilas gustativas de ratón en desarrollo.
2. Determinar la funcionalidad de dicha enzima, es decir, saber si existe síntesis de serotonina *in situ* o si esta monoamina proviene de otra fuente.
3. Evaluar el efecto de la carencia de la TPH1 en el desarrollo de las papilas gustativas.

VI. MATERIALES Y METODOS

VI. 1 Animales

En nuestros experimentos se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6J a diferentes etapas del desarrollo, controles y Knockout para la TPH1 (Ko TPH1), los cuales fueron adquiridos de Charles River (Francia) y donados por el Dr. Michael Bader del Centro Max Delbrück para la “Medicina Molecular” (Alemania), respectivamente. La generación del animal Ko TPH1 es descrita en Walther *et al.*, (2003). Los animales fueron mantenidos en ciclos de luz-abscuridad de 12 h con agua y alimento *ad libitum*.

La mañana en la que a las hembras se les observo tapón vaginal se consideró día embrionario 0 (E0) o inicio de la gestación.

Las manipulaciones de los animales fueron realizadas de acuerdo con la directiva del 24 de noviembre de 1986 de la Unión Europea concerniente al uso y cuidado de animales utilizados con fines científicos.

VI.2 Obtención de las muestras

VI.2.1 Biología molecular

Para estudios de biología molecular se utilizaron muestras de papila caliciforme de ratón de tres etapas diferentes de desarrollo embrionario: 13, 15 y 17 días embrionarios (E13, E15 y E17), y de animales neonatos ó 0 días postnatal (P0). Las hembras de 13, 15 y 17 días de gestación fueron sacrificadas por dislocación cervical y por cesárea se extrajeron los embriones. Los embriones y ratones neonatos fueron decapitados para obtener la lengua. A las lenguas obtenidas se les diseco por microdissección la papila caliciforme (**Figura 7**). Debido al reducido tamaño de la papila (1-2 mm de diámetro en el ratón adulto), se realizó una colección de 2-4 papilas caliciformes para las cuatro etapas del desarrollo estudiadas.

VI.2.2 *Inmunohistoquímica*

Para análisis inmunohistoquímico, lenguas de ratones E15, E17, P0, P11 y adultos fueron extraídas y se les diseco las papilas caliciformes y papilas fungiformes (**Figura 7**) para los diferentes experimentos de inmunomarcaje.

VI.2.3 *Tinción de hematoxilina-eosina*

Para determinar la morfología de las papilas caliciformes, se extrajeron lenguas de ratones neonatos (P0) a los cuales se les disecaron las papilas caliciformes (**Figura 7**) y se realizó la tinción de hematoxilina-eosina.

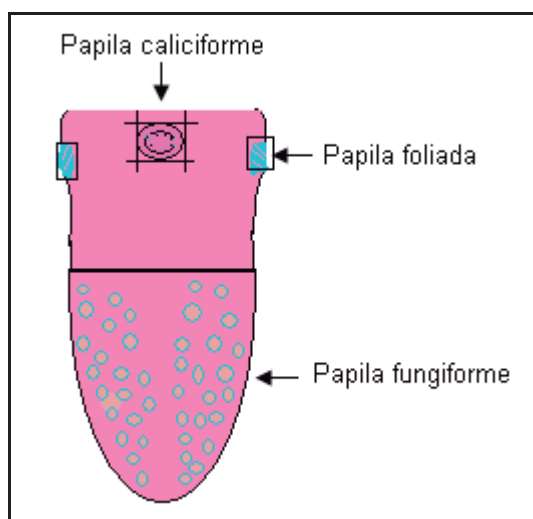


Figura 7. Esquema de disección de las diferentes papilas de la lengua de ratón. Vista superior de la región lingual a partir de la cual se obtuvieron las muestras utilizadas en los diferentes experimentos.

VI.3 **Análisis de la expresión genética de la TPH1 y la TPH2**

VI.3.1 *Extracción del ARN total*

El ARN total fue extraído usando el reactivo de Trizol. Después de la disección, las papilas caliciformes fueron inmediatamente introducidas en un tubo Eppendorf libre de ARNasas y ADNasas que contenía 500 μ L de TRIZOL[®] (Invitrogen) y homogeneizadas con ayuda de un mini polytron. El homogeneizado se agitó por 15 segundos y en presencia de 200 μ L de cloroformo por mililitro de TRIZOL[®] usado para homogeneizar. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente por 3 minutos y centrifugada a 12, 000

g durante 15 minutos a 4°C, el ARN fue recuperado de la fase acuosa. La fase acuosa recuperada en un tubo nuevo fue tratada con isopropanol (500 µL/mL de TRIZOL®), después de la incubación por 5-10 minutos a temperatura ambiente se centrifugó (12, 000 g) por 10 minutos a 4°C. Después de la centrifugación el sobrenadante fue eliminado y la pastilla depositada en el fondo del tubo se lavo con 1 mL de etanol al 75%. Después de eliminar el etanol el tubo se dejo secar por 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Finalmente el ARN fue resuspendido en 20 µL de agua libre de ARNasas (Invitrogen).

El ARN obtenido se trato con 1 unidad (U) de DNase libre de RNase (Promega) en un medio de reaccion (Promega) durante 30 minutos a 37°C. Después de un proceso de purificación, el ARN fue recuperado en 20 µL de agua libre de ARNasas. El ARN se guardo a -80°C para evitar la degradación.

VI.3.2 *Cuantificación y análisis de la pureza del ARN*

Debido a la necesidad de conocer la concentración exacta de ARN en nuestra solución para la realización de nuestros experimentos, se realizó la cuantificación por espectrofotometría en diluciones 1:100 del ARN total obtenido, con agua estéril. Las bases púricas y pirimídicas absorben a 260 nanómetros (nm); 1 unidad de densidad óptica (DO) a 260 nm corresponde a una solución de 40 µg de ARN/ mL. Es igualmente posible detectar una posible contaminación proteica debido a que las proteínas absorben a 280 nm, una relación $DO_{260}/DO_{280} \geq 1.8$ nos indica que nuestra solución de ARN es de alta pureza.

VI.3.3 *Reacción de transcripción reversa (RT)*

Esta reacción es utilizada para sintetizar ADN complementario (ADNc) a partir de una matriz de ARN de interés. El ADNc es utilizado para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las ADN polimerasas dependientes de ARN o retrotranscriptasas son capaces de sintetizar ADNc partiendo de ARN. Esta reacción se lleva a cabo a partir de de una matriz de ARN, con cebadores (oligo-dT o random primers) y dNTP's en un medio de reacción favorable para la enzima.

Dos microgramos de ARN total se utilizaron para la síntesis de ADNc usando 40 U de Superscript II RNaseH-Reverse-Transcriptase (Invitrogen). La reacción fue conducida en un volumen total de 20 μ L siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada reacción se corrió un control en el cual la enzima transcriptasa reversa fue sustituida por agua. Dicho control fue identificado como RT negativo. La concentración de ADNc fue determinada por espectrofotometría a 260 y 280 nm en una dilución 1:50 con agua estéril.

VI.3.4 *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

El objetivo de la técnica de PCR es amplificar *in vitro* un fragmento de ADN de interés, simulando la síntesis de ADN *in vivo*. Cada cadena de ADN sirve de matriz para la síntesis de la cadena complementaria. Si el proceso es repetido, la reacción en cadena va a doblar el número de moléculas. Así, después de 20 ciclos (repeticiones) se obtienen 2^{20} veces el número de templado inicial.

El ciclo comprende tres etapas: desnaturalización, que consiste en separar las dobles cadenas en cadenas sencillas aplicando calor; alineamiento, en esta etapa los cebadores u oligonucleótidos se hibridan con la matriz y finalmente la etapa de extensión, donde se sintetizan las cadenas complementarias a la matriz a partir de los oligonucleótidos hibridados. La reacción se efectúa en el mismo tubo, solo la temperatura varia. Estos cambios de temperatura no afectan la actividad enzimática debido al empleo de una ADN polimerasa termoestable.

Las aplicaciones de esta técnica son numerosas. Así, la PCR es utilizada para analizar de manera cualitativa la presencia de un fragmento de ADN o de ARN cuando este es convertido a ADNc por la RT. Esta etapa previa es necesaria porque la matriz, a partir de la cual el fragmento de interés es amplificado, debe ser de ADN. De esta manera, la PCR permite determinar la expresión de ARNm que codifiquen para una proteína o para un péptido de interés. En este trabajo hemos utilizado esta técnica para la determinación de la expresión de la triptofano hidroxilasa 1 (TPH1) y de la triptofano hidroxilasa 2 (TPH2) en papilas gustativas de ratón en desarrollo.

Las condiciones de la PCR pueden ser adaptadas a diferentes experimentos:

La elección de los oligonucleótidos es de gran importancia. La composición influye su temperatura de fusión (T_m) y el grado de hibridación de la matriz en función de la temperatura. Ciertas secuencias de oligonucleótidos pueden adoptar estructuras secundarias afectando, de esta manera, la correcta hibridación de los oligonucleótidos con la matriz. Así, la composición nos dirá si es posible una eventual formación de estructuras secundarias, además de la T_m de los oligonucleótidos, a partir de la cual se establecerá la temperatura óptima de hibridación.

La temperatura de hibridación es determinante. Si la temperatura de hibridación óptima se establece principalmente en función de la T_m de los oligonucleótidos, es posible tener variaciones significativas en nuestros resultados. Por esta razón se precisa una búsqueda de la temperatura óptima de hibridación, la cual se encuentra a temperaturas cercanas de la T_m . Para esta búsqueda se requiere tener en mente las siguientes consideraciones: la disminución de la temperatura puede conducir a la amplificación inespecífica, es decir, amplificación de fragmentos diferentes a los de interés; a medida que se eleve la temperatura de hibridación, más específica será la reacción. Sin embargo, el aumento de la temperatura disminuye frecuentemente la eficacia de la reacción, debido a que esta situación dificulta la hibridación de los oligonucleótidos con la matriz.

La duración de las diferentes etapas varía en función de la naturaleza del fragmento a amplificar y de la ADN polimerasa utilizada. En el caso de fragmentos largos, los tiempos de elongación y de desnaturalización deberán eventualmente ampliarse comparado a fragmentos más cortos.

Para determinar la expresión de la TPH1 y TPH2, 2 μL de producto de reacción de la transcripción reversa se utilizaron como matriz para la PCR usando AccuPrimeTM Pfx DNA Polymerase (Invitrogen). La reacción se llevo a cabo en un volumen total de 50 μL siguiendo las recomendaciones del fabricante. Reacciones conducidas en productos de RT donde se omitió la transcriptasa reversa se utilizaron como control en el análisis de

expresión. Los parámetros de PCR fueron: un paso inicial de desnaturalización de 2 minutos a una temperatura de 94°C seguido por 35 ciclos de 60 segundos a 94°C, 60 segundos a 54.8°C y 90 segundos a 72°C en el caso de la amplificación de la TPH1, en el caso de la TPH2, el único parámetro diferente con respecto a la TPH1 fue la temperatura de hibridación, la cual fue de 60.3°C para este caso. En los dos casos, se realizó un ciclo final de extensión por 10 minutos a 72°C. En la **Tabla I** se presentan los oligonucleótidos utilizados para amplificar fragmentos específicos de ambas isoformas de TPH. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la triptofano hidroxilasa 1 (TPH1), corresponde a los nucleótidos 1775-2015 de la secuencia de la TPH1 de ratón disponible bajo el código de acceso NM_009414, la talla del fragmento amplificado es de 240 pares de bases. Para la amplificación de la triptofano hidroxilasa 2 (TPH2, código de acceso NM_173391), la posición de los nucleótidos es de 1324-1714, el fragmento amplificado para este caso es de 390 pares de bases. Los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis en un gel de agarosa.

Tabla I. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de PCR para el análisis de la expresión genética de la TPH1 y TPH2.

Oligonucleótido	Secuencia
TPH1 (sentido)	5'TGATGGTTTCCAGTGCATATCC3'
TPH1 (antisentido)	5'CGTGGCACGTGAACTATATTT3'
TPH2 (sentido)	5'TTTGACCCAAAGACGACCTGCTTGCA3'
TPH2 (antisentido)	5'TGCATGCTTACTAGCCAACCATGACACA3'

VI.4 Análisis de la expresión relativa de la TPH1 y TPH2

Existen diferentes métodos para la cuantificación de ARNm, entre estos se encuentra el northern blotting, el ensayo de protección de la ribonucleasa (Ribonuclease Protection Assay, RPA), la hibridación *in situ* y la PCR en Tiempo Real (Real Time PCR). La PCR

en Tiempo Real es el método más sensible y puede discriminar ARN mensajeros de secuencias casi idénticas. Este método utiliza un compuesto fluorogénico, el cual tiene la capacidad de unirse únicamente a moléculas de ADN de doble cadena y fluorescer. Por lo tanto, un aumento en la concentración de ADN lleva a un aumento proporcional en la fluorescencia. La cuantificación puede ser absoluta o relativa. En la cuantificación absoluta se precisa de una curva estándar generada a partir de diluciones de ADN de concentración conocida. En la cuantificación relativa, cambios en la expresión de un gen o diferencias en la expresión de dos o más genes pueden ser determinadas normalizando los resultados de PCR en Tiempo Real contra un gen de referencia también conocido como control interno. Como control interno se utilizan genes que se expresen de manera constante, es decir, que los niveles de expresión no cambien con las condiciones experimentales. La PCR en Tiempo Real exige oligonucleótidos que amplifique fragmentos con una longitud de 70 a 150 pares de bases, por esta razón, para nuestro estudio se optó por diseñar oligonucleótidos adecuados para dicho experimento.

VI.4.1 Selección y validación de los oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos para TPH1 (NM_009414) y TPH2 (NM_173391) de ratón (*Mus musculus*). Para el diseño de los oligonucleótidos se consideró el alto grado de identidad entre ambas isoformas de triptofano hidroxilasa (71%). Los oligonucleótidos obtenidos debían hibridar en sitios no homólogos o lo más divergentes posible entre ambas isoformas de triptofano hidroxilasa, para garantizar la especificidad de los productos de amplificación. En la **Tabla II** se presentan los oligonucleótidos utilizados para el análisis de la expresión relativa por PCR en Tiempo Real de la TPH1 y la TPH2. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la triptofano hidroxilasa 1 (TPH1), corresponde a los nucleótidos 99-205 de la secuencia de la TPH1 de ratón disponible bajo el código de acceso NM_009414, la talla del fragmento amplificado es de 106 pares de bases. Para la amplificación de la triptofano hidroxilasa 2 (TPH2, código de acceso NM_173391), la posición de los nucleótidos es de 2044-2144, el fragmento amplificado para este caso es de 100 pares de bases.

Tabla II. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de PCR en Tiempo Real para el análisis de la expresión relativa de la TPH1 y TPH2.

Oligonucleótido	Secuencia
TPH1 (sentido)	5'CACGAGTGCAAGCCAAGGTTT3'
TPH2 (antisentido)	5'AGTTTCCAGCCCCGACATCAG3'
TPH2 (sentido)	5'GAGTTGCTCCACGCTTTGC3'
TPH2 (antisentido)	5'ACACTCAGTCTACATCCATCCC3'

Para verificar la especificidad de ambos pares de oligonucleótidos se realizó una amplificación por PCR en Tiempo Real. Al final de la reacción de PCR el aparato proporciona una curva de disociación, también llamada curva de fusión, si se observa un solo pico es indicio de especificidad. Por el contrario, si se observan dos o más picos significa que no hay especificidad en la reacción, es decir, además de nuestro amplificado de interés tenemos amplificación inespecífica.

VI.4.2 Validación del control interno

Para analizar cambios relativos en la cantidad de transcritos se elige como patrón un gen de referencia (control interno) que no varíe su expresión con las condiciones experimentales. El ARNr 18S satisfizo los criterios de elección, por lo que fue elegido para nuestro estudio como el control interno. En la **Tabla III** se presentan los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del control interno. Los oligonucleótidos corresponden al gen ARNr 18S.

Tabla III. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de PCR en Tiempo Real para la amplificación del control interno.

Oligonucleótido	Secuencia
ARNr 18S (sentido)	5'ACGGAAGGGCACCACCAGGAG3'
ARNr 18S (antisentido)	5'GCACCACCACCCACGGAATCG3'

VI.4.3 PCR en Tiempo Real

El experimento se realizó con el iCycler iQ Real-Time PCR detection system instrument de BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA). La preparación de la mezcla para la reacción de PCR fue como sigue: en un tubo para PCR libre de ARNasas y ADNasas, se colocaron 4.5 μL (4 ng/ μL) de las muestras de ADNc obtenido en V.3.3, 25 μL de 2X QuantiTect SYBR green PCR Master Mix (Qiagen) y 1.5 μL (10 pmol) de cada uno de los oligonucleótidos.

Todos los ensayos se efectuaron atendiendo los siguientes parámetros de PCR: un paso inicial de desnaturalización de 5 minutos a 95°C y 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C. Para asegurarnos de que los resultados obtenidos provenían de la amplificación de la TPH1 y TPH2, los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa.

Para este análisis se realizaron dos experimentos de muestras independientes de ARN, cada experimento fue ejecutado por triplicado.

VI.4.4 Análisis de los datos obtenidos de la PCR en Tiempo Real

Los niveles de expresión relativa de los ARN mensajeros de la TPH1 y la TPH2 se calcularon usando el método comparativo ΔC_T descrito por Livak and Schmittgen (2001) usando el ARNr 18S como gen de referencia. El ciclo umbral (C_T), el cual corresponde al ciclo de amplificación en el cual la fluorescencia excede el ruido de fondo, fue determinado para la TPH1, TPH2 y ARNr 18S en todas las muestras y en el mismo ensayo, el cual fue realizado por triplicado. Posteriormente, se calculó la cantidad relativa de TPH1 o TPH2 normalizada a la expresión endógena de ARNr 18S usando la fórmula $2^{-\Delta C_T}$, donde $\Delta C_T = C_T \text{ (TPH1 o TPH2)} - C_T \text{ (ARNr 18S)}$. La aplicabilidad del método ΔC_T fue validada determinando como varía la eficiencia de amplificación de los genes de las dos isoformas de TPH y ARNr 18S, con la dilución de matriz. Estos experimentos preliminares mostraron que la eficiencia de amplificación de la PCR fue la misma para los tres genes. Es decir, las diferencias en C_T entre los tres genes se conservaron no importando el grado de dilución de la matriz.

VI.4.5 *Análisis estadístico*

Los datos obtenidos se analizaron utilizando el programa Graphpad Prism 4.0. Se compararon los niveles de expresión relativa entre la TPH1 y la TPH2 a diferentes etapas del desarrollo embrionario, así como cambios en la expresión relativa de cada una de las isoformas de TPH durante el curso del desarrollo embrionario, dicho análisis se realizó mediante la prueba, “t” de Student.

VI.5 **Inmunohistoquímica**

La utilización de la inmunohistoquímica recae en la propiedad que tienen los anticuerpos de formar, con los antígenos correspondientes, complejos inmunes estables expresados sobre un corte histológico. De esta manera, la técnica aporta información precisa sobre la localización celular de una molécula determinada. El complejo antígeno-anticuerpo obtenido no es visible de manera natural, por ello es necesario recurrir a artificios susceptibles de visualizar. Para este fin, se utilizan anticuerpos (anticuerpos secundarios) acoplados a una molécula fluorescente o a una molécula donde la oxidación produzca un precipitado coloreado. El anticuerpo secundario puede ser, de la misma manera, acoplado a un sistema de amplificación de señal como la biotina.

En este trabajo hemos utilizado la técnica de inmunohistoquímica para:

1. Determinar la expresión de la enzima triptofano hidroxilasa (TPH) en papilas caliciformes a diferentes etapas del desarrollo.
2. Definir la localización celular de la TPH en el epitelio lingual.
3. Determinar la síntesis de serotonina en las papilas gustativas de ratón adulto.
4. Analizar el efecto de la inactivación genética de la TPH1, una de las dos isoformas de la enzima responsable de la síntesis de serotonina, sobre el sistema gustativo lingual.

Los anticuerpos utilizados en estos experimentos se describen en la **Tabla IV**.

Tabla IV. Anticuerpos utilizados en los experimentos de inmunohistoquímica.

Estructura diana	Anticuerpo (anticuerpo primario)	Tiempo de incubación	Dilución	Revelación (anticuerpo secundario)
TPH	Anti-TPH	48 h	1:250	Biotinilado anti-ratón. Estreptavidina acoplada a la Alexa 488 ó 568
Fibras gustativas	Anti-PGP 9.5	16 h	1:1000	Anti-conejo acoplado a la Alexa 488
Células gustativas diferenciadas	Anti-gustducina	48 h	1:1000	Anti-conejo Alexa 568
Serotonina	Anti-serotonina	36 h	1:250	Biotinilado anti-rata. Estreptavidina acoplada a la Alexa 568
Corpúsculos gustativos	TROMA-1	16 h	1:100	Biotinilado anti-rata. Estreptavidina acoplada a la Alexa 568

Los controles negativos utilizados en los experimentos de inmunohistoquímica consistieron en el cambio del anticuerpo primario por PBS.

VI.5.1 Inmunodetección de la TPH

Para la detección inmunohistoquímica de la triptofano hidroxilasa, las lenguas disecadas de embriones E15, E17 y de animales neonatos (P0) fueron fijadas en una solución fría de paraformaldehído (PAF) al 4 % en PBS. Después de la fijación durante toda la noche a 4°C, las lenguas fueron crioprotegidas en sacarosa al 30% en PBS por un periodo adicional de 24 h o hasta que los bloques de tejido tocan el fondo del contenedor, orientadas en material de inmersión OCT (Polyscience) y almacenadas a -80°C hasta el día de la obtención de los cortes. Se obtuvieron cortes linguales de la papila caliciforme con el uso de un criostato a un espesor de 16 µm, los cortes obtenidos fueron colocados en laminillas para microscopio Superfrost® (MENZEL-GLASER) gelatinizadas, se dejaron secar a TA por 30 minutos y almacenados a -80°C hasta el día del experimento. A la salida de -80°C las laminillas se dejaron atemperar por 30 minutos. Posteriormente,

los cortes fueron lavados con PBS e incubados en buffer de bloqueo (0.5mg/mL de albúmina de suero bovino, 3% de suero normal de cabra, 0.3% de Triton X-100 en PBS) por 1 h a TA y luego expuestos a un anticuerpo anti-TPH monoclonal de ratón (Clona WH-3, Sigma) a una dilución 1:250 en buffer de bloqueo por 48 h a 4°C. A la salida del refrigerador las laminillas se atemperaron por 1 h. Después de la remoción de la solución del anticuerpo primario, los cortes fueron lavados 4 veces por 5 minutos (4 x 5 minutos) con PBS e incubados por 2 h a TA en la oscuridad con una solución de PBS que contenía el anticuerpo secundario biotinilado anti-ratón (1:300, Molecular Probes), luego lavados con PBS 4 x 5 minutos y expuestos a la Estreptavidina acoplada a la Alexa 488 (1:300, Molecular Probes) durante 30 minutos a TA. Después de la eliminación de la estreptavidina las laminillas fueron lavadas 3 x 10 minutos con PBS, cubiertas con solución de montaje VectaShield (Vector Labs) y guardadas a 4°C hasta la documentación.

V.5.2 Inmunolocalización de la TPH en el epitelio lingual

Para determinar la localización de la TPH se exploraron dos estructuras diferentes, las fibras aferentes primarias (fibras gustativas) y células gustativas. Para el primer caso un comaraje con los anticuerpos anti-TPH y anti-PGP 9.5 (Biogénesis), un anticuerpo policlonal de conejo que reconoce al carboxilo terminal de una ubiquitina hidrolasa, fue utilizado en ratones P0. Para el segundo caso el doble marcaje fue con los anticuerpos anti-TPH y anti-Gustducina monoclonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology), un anticuerpo que reconoce a la subunidad α de la Proteína G presente en células gustativas diferenciadas, conocida como Gustducina. Los animales para este estudio fueron de 11 días postnatales (P11), etapa del desarrollo en la cual las células gustativas alcanzan su diferenciación y su identificación es precisa.

Los ratones P0 fueron sacrificados por decapitación y las lenguas extraídas fueron fijadas en PAF al 4% en PBS. Después de la fijación durante toda la noche a 4°C, las lenguas fueron crioprotegidas en sacarosa al 30% en PBS por 24 h, orientadas en material de inmersión OCT y almacenadas a -80°C hasta el día de la obtención de los cortes. Por criostato se obtuvieron cortes de 16 μ m de la papila caliciforme, los cuales se dejaron

secar a TA por 30 minutos en laminillas gelatinizadas y se guardaron a -80°C hasta el día del experimento. Después de ser lavados con PBS se incubaron los cortes en un buffer de bloqueo (0.5mg/mL de albúmina de suero bovino, 3% de suero normal de cabra, 0.3% de Triton X-100 en PBS) por 1 h a TA. Después de la remoción de la solución de bloqueo, los cortes se incubaron por 48 h a 4°C en buffer de bloqueo que contenía una mezcla de los anticuerpos primarios: anti-TPH (1:250) y anti-PGP 9.5 (1:1000). Después de que las laminillas que contenían los cortes se atemperaron por 1 h, fueron lavadas 4 x 5 minutos con PBS y expuestas a una mezcla de los anticuerpos secundarios: biotinilado anti-ratón (1:300) y anti-conejo Alexa 488 por 2 h. Posteriormente, se lavaron 4 x 5 minutos con PBS y se incubaron por 30 minutos en PBS + Estreptavidina acoplada a la Alexa 568. Después de 3 lavados por 10 minutos las laminillas fueron montadas con VectaShield y guardadas a 4°C hasta documentación.

Para el comarcaje TPH/Gustducina, los animales P11 fueron decapitados y las lenguas disecadas fueron fijadas durante toda la noche a 4°C en una solución de PBS con 4% de PAF. Después de la fijación los tejidos fueron crioprotectados en sacarosa al 30% por 24 h, orientadas en OCT y guardadas a -80°C hasta la realización de los cortes. Los cortes se obtuvieron y guardaron como se menciona arriba hasta el experimento. A la salida de -80°C los cortes se dejaron atemperar por 30 minutos y posteriormente se incubaron en un buffer de bloqueo (0.5mg/mL de albúmina de suero bovino, 3% de suero normal de cabra, 0.3% de Triton X-100 en PBS) por 1 h a TA. Después de la remoción del buffer de bloqueo, los cortes fueron expuestos a una solución de buffer de bloqueo que contenía los anticuerpos primarios anti-TPH (1:250) y anti-Gustducina (1:1000) a 4°C por 48 h. Una vez terminado el periodo de incubación, las laminillas se dejaron atemperar por 1 h y se expusieron a una solución de PBS que contenía una mezcla de los anticuerpos secundarios biotinilado anti-ratón (1:300) y anti-conejo Alexa 568 (1:300) a TA por 2 h. Después de 4 lavados por 5 minutos, se incubaron en Estreptavidina acoplada a la Alexa 488 a una dilución 1:300 con PBS por 30 minutos a TA, se lavaron 3 x 10 minutos con PBS, se montaron en VectaShield y se almacenaron a 4°C hasta documentar.

VI.5.3 *Determinación de síntesis de serotonina en el epitelio lingual*

Para poner en evidencia la síntesis de serotonina y con ello demostrar la existencia de un sistema serotoninérgico inherente al epitelio lingual se realizó un comarcaje con los anticuerpos anti-TPH y anti-serotonina monoclonal de rata (SEROTEC). El estudio fue conducido en animales adultos por cuestiones técnicas, ya que el inmunomarcaje de serotonina requiere de una administración de precursor de la serotonina para que el marcaje pueda ser visualizado.

Ratones adultos de 2 meses de edad controles y Ko TPH1 fueron administrados con L-triptofano, vía intraperitoneal, a una dosis de 100 mg/Kg de peso (Fujimiya *et al.*, 1986) y sacrificados por dislocación cervical 1 h después del tratamiento. Los animales descerebrados fueron perfundidos con una solución fría de PAF al 4% y las lenguas fueron disecadas y fijadas en PAF al 4% a 4°C por una noche. Después, fueron crioprotegidas con sacarosa al 30% por 24 h, orientadas en OCT y almacenadas a -80°C. Cortes de las papilas caliciformes de 16 µm de espesor fueron obtenidas. Posteriormente, los cortes fueron lavados con PBS e incubados en una solución de buffer de bloqueo (0.5mg/mL de albúmina de suero bovino, 3% de suero normal de cabra, 0.3% de Triton X-100 en PBS) por una hora a TA. Una vez removido el buffer de bloqueo, los cortes fueron expuestos a los anticuerpos primarios anti-TPH (1:250) y anti-5-HT (1:250) por 48 h a 4°C. Después de la remoción de los anticuerpos los cortes fueron lavados 4 x 5 minutos con PBS e incubados en una mezcla de anticuerpos secundarios biotinilado anti-rata (1:1500, Molecular Probes) y anti-ratón Alexa 488 (1:250, Molecular Probes) por 2 h a TA. Los anticuerpos secundarios fueron eliminados por lavados 4 x 5 min con PBS y los cortes se incubaron con Estreptavidina acoplada a la Alexa 568 por 30 minutos a TA. Después de lavar 3 x 10 minutos, las laminillas se montaron en VectaShield y guardaron a 4°C hasta ser documentadas.

VI.5.4 *Análisis del efecto de la inactivación genética de la TPH1 sobre el sistema gustativo lingual*

Para conocer el efecto que pudiese tener la carencia de la TPH1 sobre el fenotipo gustativo, se evaluaron las diferencias en la innervación de las papilas caliciformes, la

diferencia en el número de papilas fungiformes y las diferencias morfológicas de la papila caliciforme entre animales control y Ko TPH1. El estudio fue conducido en animales neonatos, etapa en la cual se pueden evaluar los efectos producidos por la carencia de la TPH1 durante la etapa del desarrollo.

El inmunomarcaje de la innervación gustativa de las papilas caliciformes se efectuó con el anticuerpo anti-PGP 9.5. El análisis se realizó en papilas caliciformes debido a que la innervación aquí, a diferencia de las demás papilas, presenta un patrón bien definido y por consiguiente, cualquier alteración en la innervación se aprecia fácilmente. Las lenguas obtenidas de animales neonatos, controles y Ko TPH1, decapitados se fijaron por 1 día en etanol ácido (70% EtOH + 10% ácido acético en PBS) a 4°C. Se transfirieron a una solución de sacarosa al 30% por 24 h para protegerlas del congelamiento, se orientaron en OCT y almacenaron a -80°C. Los cortes (16 µm) obtenidos se lavaron 4 x 5 minutos con una solución de PBS que contenía 0.4% de Triton X-100. Posteriormente, los cortes fueron incubados por 1 h en una solución de PBS que contenía 3% de suero de cabra. Durante toda una noche a 4°C los cortes fueron expuestos a una solución del anticuerpo anti-PGP 9.5 (1:1000) en PBS. Después de atemperarse por una hora, los cortes fueron lavados 4 x 5 minutos con PBS e incubados con el anticuerpo secundario anti-conejo Alexa 488 (1:300) en PBS por 30 minutos a TA. La solución con el anticuerpo secundario fue removida con 3 lavados por 10 minutos con PBS. Finalmente las laminillas se montaron con VectaShield y guardaron a 4°C hasta la documentación.

Para evaluar posibles variaciones en el número de papilas fungiformes se realizó un comarcaje con los anticuerpos anti-PGP 9.5 y TROMA-1 (Molecular Probes) anticuerpo monoclonal de rata, los cuales reconocen fibras de los nervios gustativos y citoqueratina-8, un marcador de células gustativas basales, respectivamente. Con este comarcaje es posible visualizar las papilas fungiformes y por consiguiente, ser contabilizadas. Animales P0 control y Ko TPH1 fueron sacrificados por decapitación. Después de su disección, las lenguas se incubaron toda la noche a 4°C en una solución de PBS que contenía 10% de ácido acético y 70% de etanol. Después de su fijación, el tejido es transferido a una solución de PBS con 30% de sacarosa y almacenado a 4°C por 24 h. Al

término de su fijación y crioprotección, los bloques de lengua que contenían las papilas fungiformes, se orientaron y fijaron en OCT y se almacenaron a -80°C hasta la obtención de los cortes. Los cortes obtenidos ($30\ \mu\text{m}$) en laminillas gelatinizadas se guardaron a -80°C para evitar la degradación de nuestros tejidos. A la salida del congelador, las laminillas se dejaron atemperar por 30 minutos a TA y se lavaron 4 x 5 minutos con una solución de PBS que contenía 0.4% de Triton X-100. Posteriormente, los tejidos se incubaron en una solución de suero de cabra al 3% en PBS por 1 h a TA y expuestos durante toda la noche a 4°C a una solución de PBS que contenía una mezcla de los anticuerpos primarios TROMA-1 (1:100) y PGP 9.5 (1:1000). Después de la remoción de los anticuerpos primarios, los cortes se lavaron 4x 5 veces con PBS y se incubaron durante 1 h a TA en una solución de PBS que contenía los anticuerpos secundarios a las siguientes diluciones: biotinilado anti-rata (1:1500) y anti-conejo Alexa 488 (1:300). A la incubación le siguió 4 lavados por 5 minutos cada uno con PBS y la exposición a la Estreptavidina acoplada a la Alexa 568 durante 30 minutos a TA. Finalmente los cortes se lavaron 3 x 10 minutos, se montaron en VectaShield y guardaron a 4°C hasta la documentación. La contabilización del número de papilas fungiformes fue realizada con ayuda de un microscopio de fluorescencia, el número de papilas se determino sumando las papilas presentes en todos los cortes obtenidos de las dos terceras partes anteriores de la lengua, zona donde se localizan las papilas en cuestión. Los datos obtenidos fueron analizados con “t” de Student por medio del paquete estadístico Graphpad Prism 4.0.

Para evaluar la morfología de las papilas gustativas se eligieron a las papilas caliciformes, debido a que la morfología de estas, a diferencia de las demás papilas, es constante en todos los animales. Los parámetros evaluados fueron la amplitud y la altura de la papila (**Figura 8**). Para este propósito la técnica utilizada fue la tinción de Hematoxilina-Eosina, cuyo procedimiento es descrito a continuación. Ratones neonatos controles y Ko TPH1 fueron decapitados y se les extrajo la lengua, las cuales se fijaron en PAF al 4% en PBS a 4°C . Después, los bloques de tejido que contenía la papila caliciforme fueron crioprotegidos en PBS con sacarosa al 30% por 24 h a 4°C y orientados en OCT. Se obtuvieron cortes de $16\ \mu\text{m}$ en laminillas gelatinizadas, los cuales fueron fijados con etanol al 96% por 5 minutos a TA. Los cortes se lavaron con agua corriente por 10 s y se

sumergieron en una solución del colorante hematoxilina por 1 minuto a TA. Posteriormente, los cortes se lavaron con agua corriente por 10 s y se sumergieron a una solución de etanol ácido (0.5% de HCl en Etanol). Después, los tejidos se lavaron con agua corriente por 10 s y se expusieron a una solución del colorante eosina por 1 minuto a TA. Los cortes se lavaron y se deshidrataron en etanol a concentraciones crecientes (70%, 96% y absoluto). Las muestras fueron montadas en resina para su documentación. Los datos obtenidos en este estudio fueron analizados con el paquete estadístico Graphpad Prism 4.0 con una “t” de Student.

V.5.5 Documentación de los experimentos de inmunohistoquímica

Los marcajes con inmunofluorescencia fueron documentados con un microscopio confocal Leica TCS-SP1 (Heidelberg, Alemania) y las imágenes fueron procesadas con los programas TCS-NT (Leica, Heidelberg, Alemania) y Adobe Photoshop 7.0.1.

Las imágenes obtenidas de la tinción de Hematoxilina-Eosina Fueron documentadas con un microscopio Nikon E-4000 (Japon). Las imágenes fueron procesadas con los programas LUCIA 4.80 (System for Imagen Processing and Análisis, USA) y Adobe Photoshop 7.0.1.

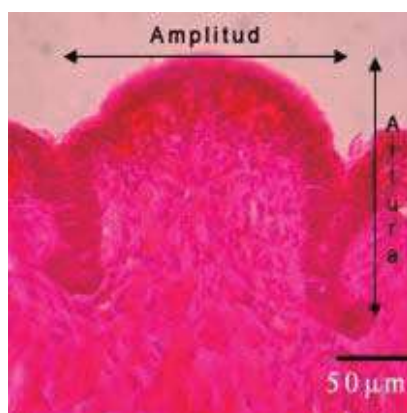


Figura 8. Representación esquemática de la morfología de la papila caliciforme. En la foto se muestran los parámetros evaluados en este estudio, la amplitud y la altura de la papila caliciforme.

VII. RESULTADOS

VII. 1 Expresión de la TPH1 y la TPH2 en papilas gustativas de embriones de ratón

Existen dos isoformas altamente homólogas de triptofano hidroxilasa: la TPH1 y la TPH2. La primera isoforma se expresa en glándula pineal y células enterocromafines del intestino, mientras que la segunda es responsable de la síntesis de 5-HT en el sistema nervioso central (Walther *et al.*, 2003). En este trabajo se efectuaron experimentos de RT-PCR utilizando oligonucleótidos que reconocen secuencias específicas de las isoformas TPH1 y TPH2 de ratón. En todos los experimentos se incluyeron muestras de ARN no sometido a la reacción de transcriptasa reversa, lo que nos permite verificar que nuestras muestras no estén contaminadas con ADN genómico.

Los experimentos de PCR con el ADNc obtenido a partir de papilas caliciformes dieron lugar a un solo producto de amplificación, donde la talla del fragmento obtenido coincide con la talla esperada de acuerdo a los oligonucleótidos empleados, 240 y 390 pares de bases para la TPH1 y TPH2, respectivamente. (**Figura 9**). La expresión de los genes de la TPH1 y la TPH2 se observó desde los 15 días de gestación (**Figura 9**), también se detectó la expresión de ambas isoformas de TPH en muestras obtenidas de la totalidad de la lengua de embriones de 13 días de gestación (**Figura 10**). Por otro lado, no se obtuvo señal alguna en los experimentos de PCR realizados con muestras de ARN sin tratamiento con la transcriptasa reversa (**Figura 9**). Estos resultados demuestran que los fragmentos de ADNc amplificados provienen de la expresión de los ARNs que codifica para ambas isoformas de TPH y no de la amplificación de ADN genómico. Además, en la **Figura 9** se puede apreciar también que los niveles de expresión de la TPH2 son superiores a los niveles de la TPH1.

Experimentos de RT-PCR realizados con ARN total obtenido de la totalidad de la lengua de ratones de E13, mostraron la expresión de ambas isoformas de TPH, aunque la TPH2 se expresa en mayor cantidad (**Figura 10**).

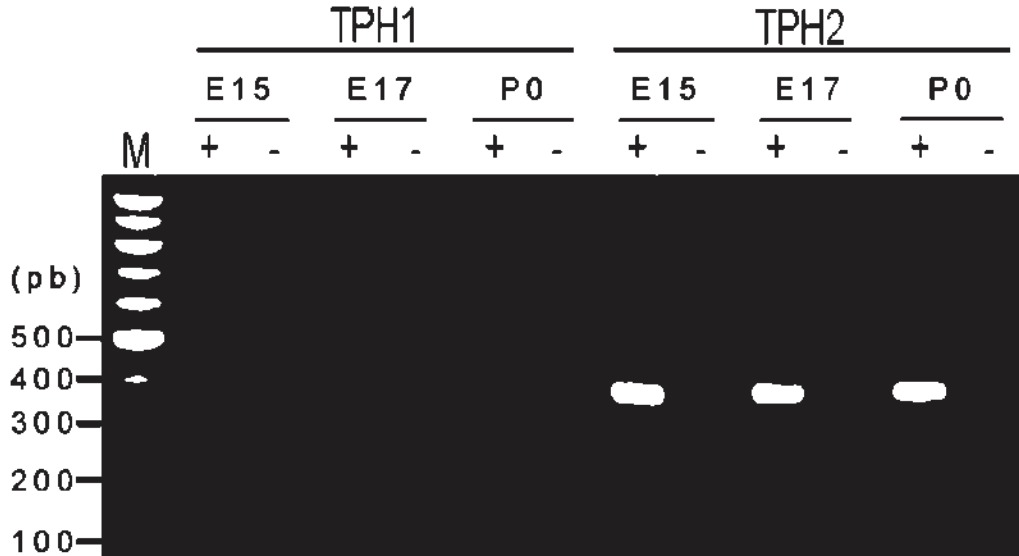


Figura 9. Identificación de los transcritos de la TPH1 y la TPH2 en papilas gustativas de ratón en desarrollo. Los ensayos RT-PCR se realizaron a partir del ARN total extraído de las papilas caliciformes de embriones de 15 (E15) y 17 (E17) días de gestación y neonatos (P0). La figura corresponde al gel representativo de la electroforesis de los productos obtenidos de la reacción de PCR a partir de muestras de ARN tratado (+) o no tratado (-) con la transcriptasa reversa.



Figura 10. Identificación del ARNm de ambas isoformas de TPH en lengua total de embriones de 13 días de gestación. Las muestras fueron tratadas (+) o no (-) con la transcriptasa reversa.

VII. 2 Abundancia relativa de los transcritos de la TPH1 y la TPH2 en papilas gustativas de embriones de ratón

Debido a que la cuantificación de los niveles de expresión de un gen por RT-PCR, requiere de oligonucleótidos altamente específicos, se diseñaron oligonucleótidos que reconocen secuencias únicas de la TPH1 y la TPH2 de ratón que permiten diferenciar entre estas dos formas de la enzima.

Los experimentos de PCR realizados con los oligonucleótidos para la TPH1 y TPH2 sobre ADNc proveniente de papilas caliciformes de ratón en desarrollo, dan un producto único de la talla esperada (**Figura 11**).

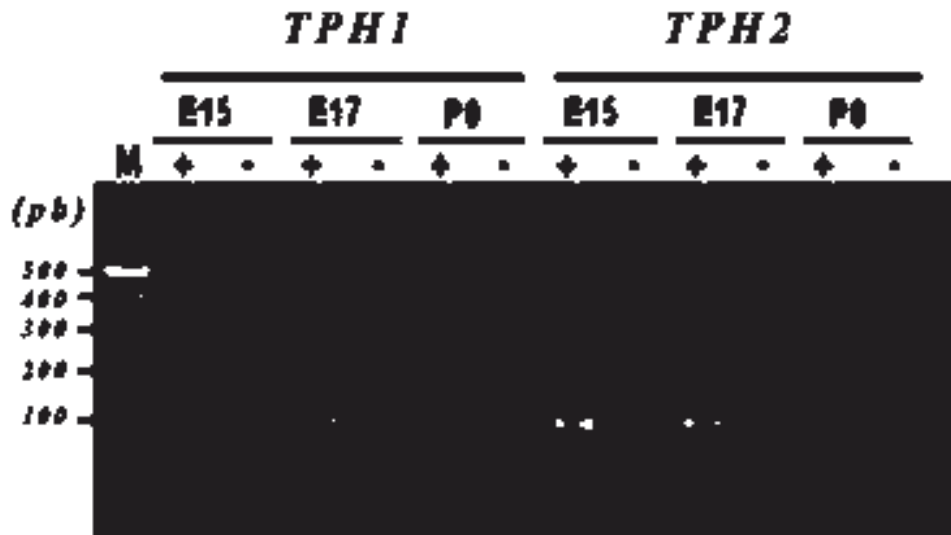


Figura 11. Gel representativo de la electroforesis de los productos de amplificación obtenidos por PCR en Tiempo Real. E15, E17 y P0 representan 15, 17 días embrionarios y postnatal 0 (neonatos). La figura corresponde al gel de electroforesis de los productos obtenidos de muestras de ARN de papilas caliciformes con (+) o sin (-) tratamiento con la transcriptasa reversa.

Además, el análisis de curva de fusión mostró un solo pico para cada uno de los productos de amplificación (**Figura 12**), esto indica que los oligonucleótidos utilizados

son específicos. De haber amplificación inespecífica, este podría apreciarse fácilmente por la aparición de uno o más picos adicionales con diferentes puntos de fusión, lo cual no es el caso en nuestro estudio. Además, se puede observar que en los controles sin ADNc no se presenta amplificación ni para la TPH1 (**Figura 12A**), ni para la TPH2 (**Figura 12B**).

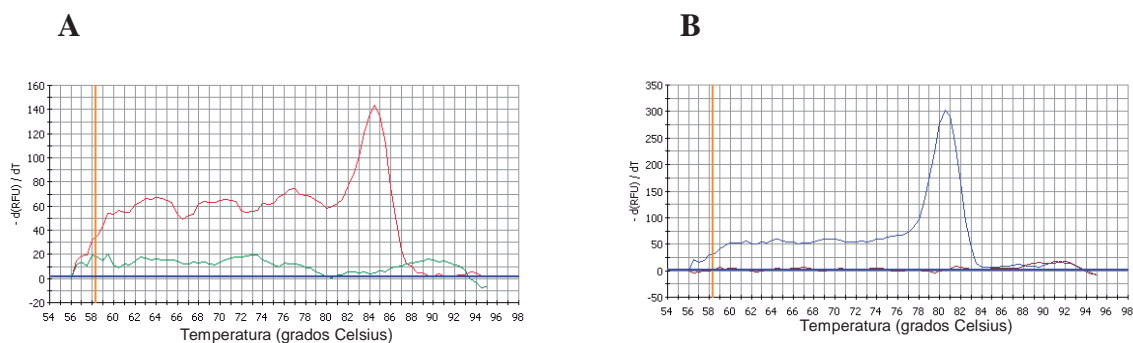


Figura 12. Curvas de fusión de los productos de amplificación de la PCR en Tiempo Real. A representa la curva de fusión de la TPH1 y B de la TPH2. La curva de fusión de color rosa (A) corresponde al producto de amplificación de la TPH1 y la curva verde corresponde al control negativo sin ADNc. La curva de color azul (B) corresponde al producto de amplificación de la TPH2 y la curva morada al control negativo sin ADNc.

Como se menciona anteriormente, la selección del gen de referencia es un paso crucial en la cuantificación de los niveles de expresión. La expresión de un gen candidato a control interno debe ser constante independientemente de las condiciones experimentales, para, de esta manera, poder normalizar los niveles de expresión del gen de interés. El gen de referencia utilizado en este estudio fue el ARNr 18S. La especificidad de la amplificación del gen de referencia (**Figura 13**), así como la constancia en los niveles de expresión, del mismo, durante las diferentes etapas estudiadas (**Figura 14**) posibilitó el uso de la amplificación de este gen como referencia para normalizar los niveles de expresión de los genes de ambas isoformas de TPH.

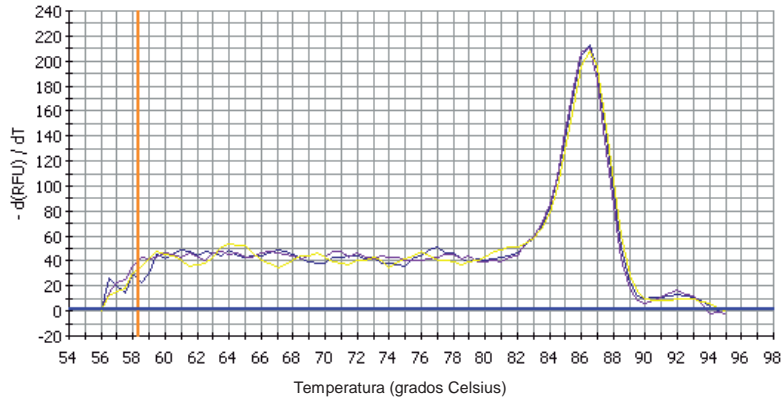


Figura 13. Curva de fusión de los productos de amplificación del gen ARNr 18S. En la gráfica se aprecia la especificidad de los oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen de referencia.

En el gel de electroforesis de los productos de PCR en Tiempo Real de la TPH1 y de la TPH2, se observa la presencia de amplificación de ambas isoformas de TPH en las tres etapas estudiadas del desarrollo de las papilas gustativas (**Figura 11**). Además los controles sin tratamiento con transcriptasa reversa no presentaron señal de amplificación, lo que elimina la posibilidad de la existencia de contaminación de las muestras con ADN genómico.

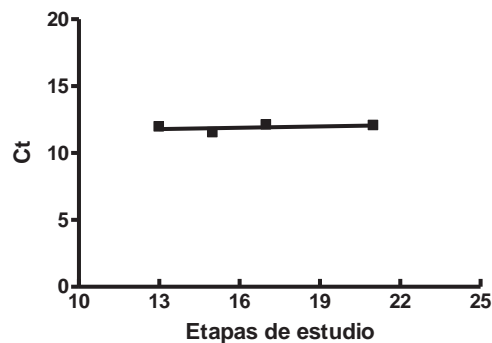


Figura 14. Niveles de expresión del gen ARNr 18S en diferentes etapas del desarrollo de las pailas gustativas. Las etapas evaluadas son E13, E15, E17 y P0. n=6

El análisis cuantitativo por RT-PCR en Tiempo Real indicó que la TPH2 se expresa en menor proporción relativa que la TPH1 (**Figura 15**). Además, mientras la abundancia relativa del ARNm de la TPH1 en la papila caliciforme permanece constante en las tres

etapas del desarrollo, un incremento significativo en los niveles de expresión de la TPH2 después del nacimiento (P0) es claramente visible, con respecto a las dos etapas embrionarias estudiadas (E15 y E17).

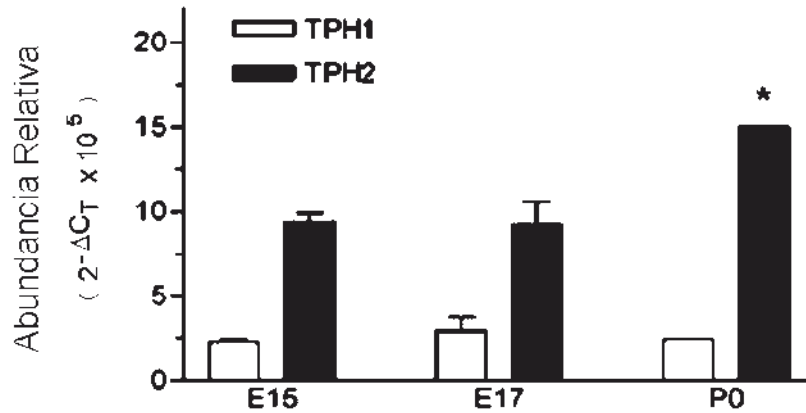


Figura 15. Abundancia relativa de los transcritos de la TPH1 y la TPH2 en papilas caliciforme de ratón en desarrollo. El histograma ilustra los niveles de expresión de la TPH1 y la TPH2 normalizados a los niveles de expresión del gen ARNr 18S amplificado en las mismas muestras y bajo las mismas condiciones experimentales. Cada barra representa la media \pm la Desviación Estándar de dos experimentos independientes realizados con dos muestras diferentes de RNA. Todas las determinaciones fueron hechas por triplicado y hubo menos de 5% de variación entre ellos. Se obtuvo una diferencia significativa en la expresión de la TPH2 a P0 cuando se comparo, por una “t” de Student no apareada, con la expresión a E15 y E17 * $p < 0.05$.

VII. 3 Expresión de la TPH en papilas gustativas de ratón en desarrollo

Con el fin de determinar el perfil de expresión celular de la TPH en las papilas gustativas, cortes parasagittales de lenguas de ratones E15, E17 y neonatos que contenían papila caliciforme fueron marcadas con el anticuerpo monoclonal anti-TPH M α WH3 (Sigma) que reconoce un epítoto común en las secuencias de aminoácidos de la TPH1 y la TPH2 (Haycock *et al.*, 2002). Por esta razón el anticuerpo ha sido utilizado para visualizar tanto TPH1 en el tracto gastrointestinal (Meyer and Brinck, 1999), como la TPH2 en el cerebro (Yohrling *et al.*, 2002; Commons *et al.*, 2005). A E15 y E17, se observo intenso marcaje de fibras con TPH, justo abajo del epitelio papilar en desarrollo (**Figura 16A y B**). A P0, la inmunoreactividad a la TPH se observo en el plexo nervioso de la papila caliciforme y

en las fibras localizadas en la parte apical de la papila (**Figura 16C**). En el control negativo, donde el anticuerpo fue sustituido por PBS, no se produjo ninguna señal positiva (**Figura 16D**). Este último resultado indica que el marcaje obtenido con el anticuerpo anti-TPH es específico.

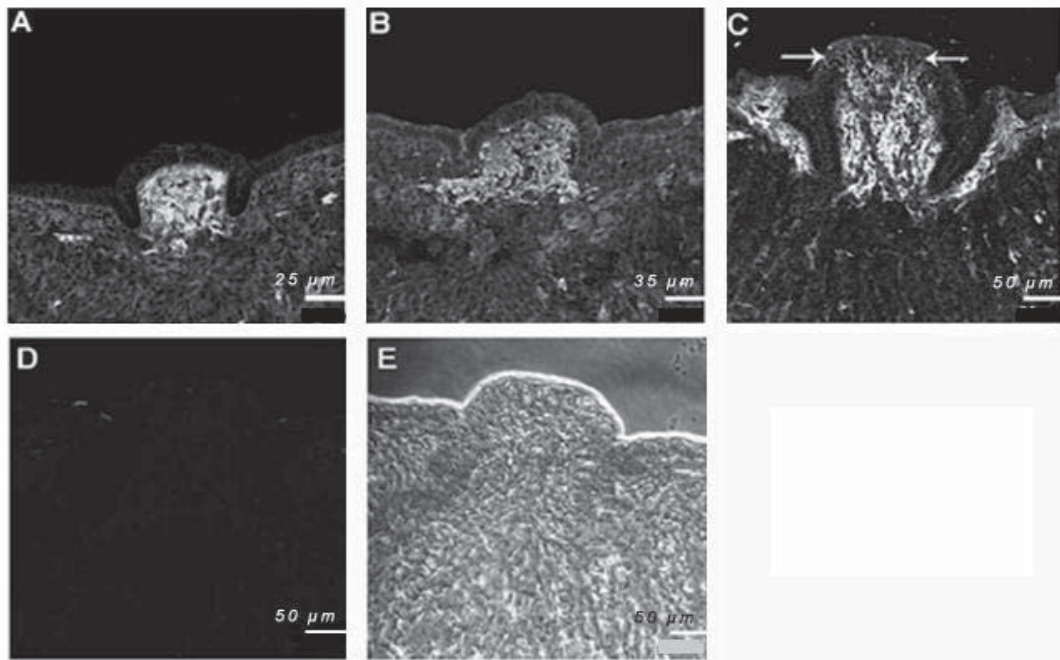


Figura 16. Detección inmunohistoquímica de la triptofano hidroxilasa en el epitelio lingual de ratón en desarrollo. Fotomicrografías de fluorescencia confocal de cortes parasagitales de papilas caliciformes realizados en embriones de 15 (A) y 17 (B) días o de ratones neonatos (C), inmunomarcados con un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo común a la TPH1 y a la TPH2. (D) cortes de papila caliciforme de P0 ilustran la ausencia de señal cuando el anticuerpo es sustituido por PBS. (E) imagen de contraste de fases de (D). A P0, se puede observar como numerosas fibras del plexo nervioso entran al ápex de la papila e inervan los corpúsculos gustativos indiferenciados (flechas en C).

VII. 4 Localización celular de la TPH en papilas gustativas de ratón

VII.4.1 Inmunolocalización de la TPH en papilas gustativas de ratón neonato

Para establecer claramente la expresión de la TPH en las fibras gustativas, se realizó un análisis inmunohistoquímico comparativo con los anticuerpos anti-TPH y anti-PGP 9.5 en papilas caliciformes. Este último anticuerpo se fija de manera selectiva a las fibras

nerviosas periféricas, independientemente del neurotransmisor que estas contengan y es utilizado comúnmente para visualizar la innervación gustativa. Como se muestra en la **Figura 17A y 17B**, los anticuerpos a TPH y PGP 9.5 producen un patrón de marcaje prácticamente idéntico en cortes de lengua de ratón neonato. En particular, los dos anticuerpos marcan de manera intensa el plexo nervioso localizado en el centro de la papila. De la misma manera, se pueden observar numerosas fibras del plexo central, marcadas con TPH y PGP 9.5, que penetran en el epitelio apical de la papila caliciforme, región en la cual toma lugar la diferenciación de los primeros corpúsculos gustativos (**Figura 17A y 17B**). Además, por superposición de ambos marcajes, se observaron células gustativas basales, así como las neuronas primarias responsables de su innervación, doblemente marcadas con TPH y PGP 9.5 (**Figura 17C**).

VII.4.2 *Inmunolocalización de la TPH en papilas gustativas diferenciadas de ratón*

Con el objetivo de determinar si la TPH es expresada exclusivamente en las fibras gustativas aferentes, y debido a que la diferenciación de las células gustativas, sitio en el cual también pudiera haber síntesis de serotonina, ocurre en la edad postnatal (P8-P11), realizamos un doble marcaje en cortes de papila caliciforme de ratón P11, con los anticuerpos anti-TPH y anti-Gustducina. Como se esperaba, un gran número de células diferenciadas marcadas con gustducina se observaron en los corpúsculos gustativos de papilas caliciformes (**Figura 18B y 18E**).

Como se ilustra en la **Figura 18A**, el plexo central de la papila caliciforme exhibe todavía intenso inmunomarcaje de la TPH a P11. Además, se pueden observar células gustativas claramente marcadas con TPH intercaladas entre células positivas para gustducina (**Figura 18C y 18F**). El examen detallado con microscopio confocal mostró que células marcadas con TPH pueden expresar únicamente la TPH o coexpresar TPH y gustducina (**Figura 18F**). Esta observación es sorprendente, ya que numerosos estudios han demostrado que la gustducina es expresada en un subtipo de células gustativas de tipo II, mientras que la serotonina esta presente en un subtipo de células de tipo III (Kim and Roper, 1995; Nagai *et al.*, 1998).

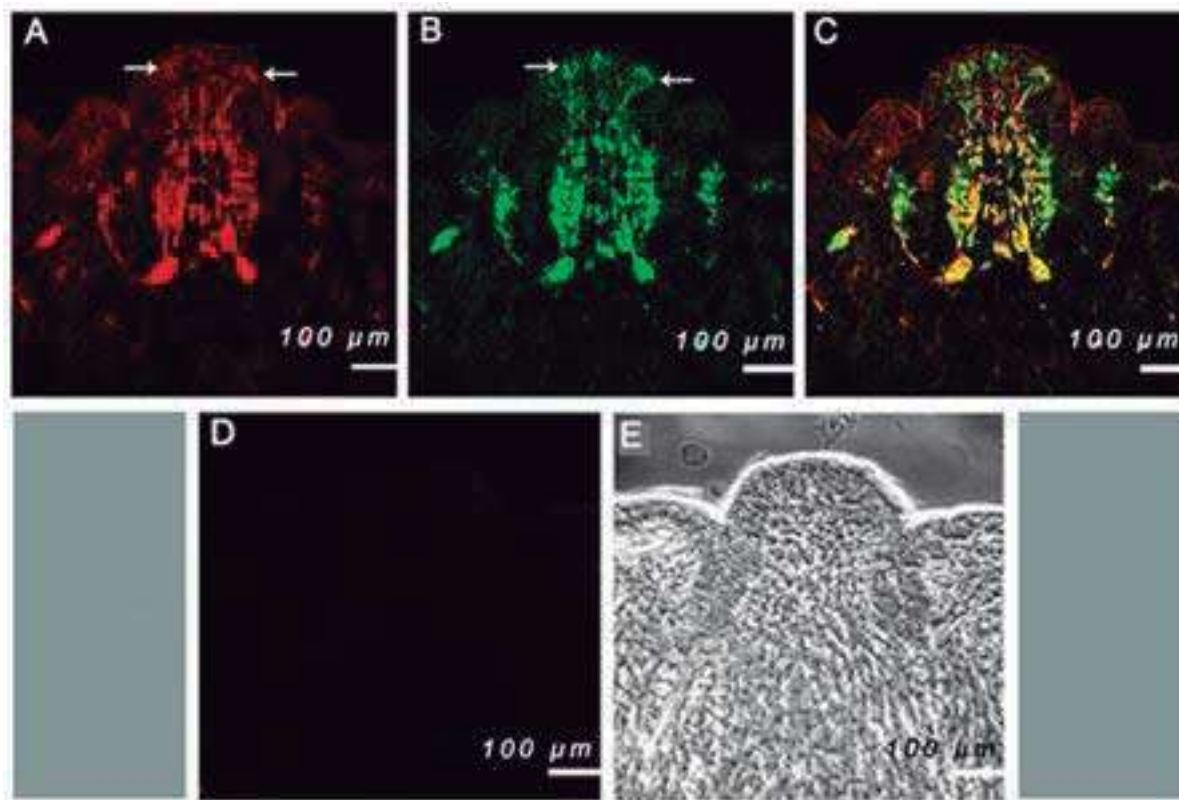


Figura 17. Expresión de la TPH en fibras gustativas de papilas caliciformes de ratón neonato. Imágenes de microscopía confocal de cortes parasagitales de papilas caliciformes de animales P0, inmunomarcados con los anticuerpos anti-TPH (A) y anti-PGP 9.5 (B). En el panel C se ilustra la superposición de (A) y (B). (D) cortes de papila caliciforme de P0 ilustran la ausencia de señal cuando el anticuerpo anti-TPH es sustituido por PBS. (E) imagen de contraste de fases de (D). Además, en A y B se observa la inervación de los precursores de los corpúsculos gustativos.

VII. 5 Síntesis de serotonina en papilas gustativas de ratones adultos controles y *Ko TPH1*

Los resultados obtenidos hasta aquí, apoyan fuertemente la presencia de un sistema serotoninérgico inherente al epitelio lingual. A la presencia de TPH en epitelio lingual durante el desarrollo embrionario, se suman la presencia de la MAO A y la MAO B (Vitalis *et al.*, 2002), del transportador de serotonina (Hansson *et al.*, 1999) y de serotonina (Barlow *et al.*, 1996) cuyo origen se desconoce.

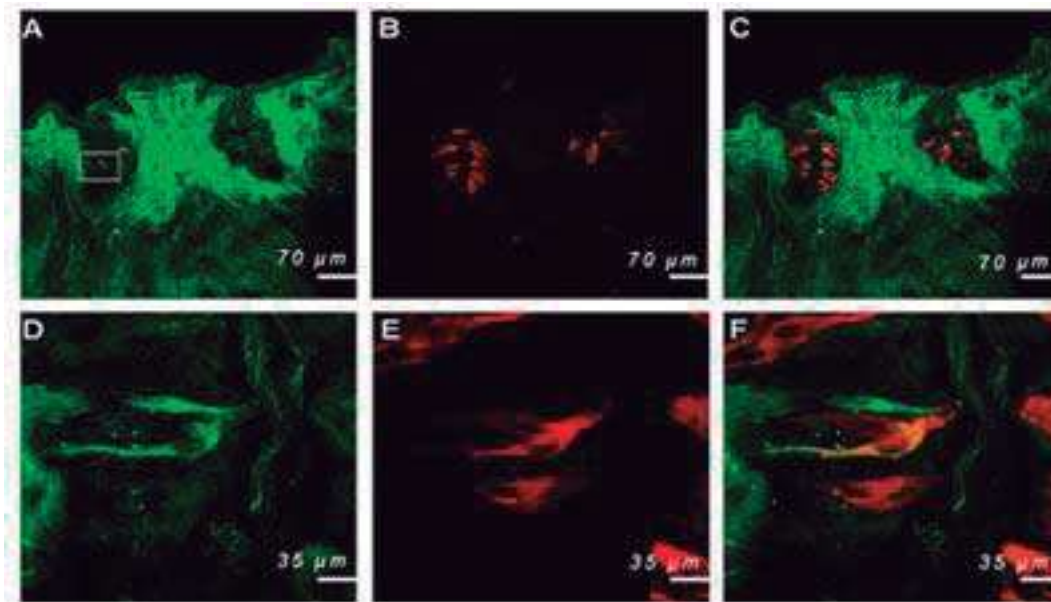


Figura 18. Localización de la expresión de la TPH en papilas gustativas diferenciadas. Imágenes de microscopía confocal de cortes de papila caliciforme de ratones P11 comarcados con los anticuerpos anti-TPH (A) y anti-Gustducina (B). Las imágenes de la parte inferior de la figura (D y E) corresponden a la amplificación de la región enmarcada en A. Los paneles C y F representan la superposición de las imágenes A y B y D y E, respectivamente. Se pueden apreciar células claramente marcadas con TPH intercaladas entre células marcadas con gustducina. Note el doble marcaje TPH/gustducina en células de tipo II (F).

Se sabe que varios tipos de células, por ejemplo las plaquetas, presentan un fenotipo serotoninérgico, es decir, son capaces de capturar, utilizar y degradar serotonina. Para determinar si hay síntesis de serotonina en el epitelio lingual y con esto demostrar claramente la presencia de un sistema serotoninérgico en el epitelio lingual, se realizó un comarcaje con los anticuerpos anti-TPH y anti-5-HT en papilas caliciformes de ratones adultos, controles y Ko TPH1, previamente tratados con L-triptofano. Si bien, nuestro trabajo se centra en etapas perinatales, para este estudio decidimos utilizar ratones adultos por cuestiones técnicas, por un lado la administración intraperitoneal de L-triptofano a embriones o ratones neonatos compromete la viabilidad de estos, dificultando el análisis; por otro lado, la administración de L-triptofano a la madre gestante produce un aumento en serotonina en el embrión, sin embargo, este aumento está por debajo de los niveles de detección por métodos inmunohistoquímicos. La utilidad de este estudio no es afectada por la edad de los ratones empleados, ya que en la vida adulta, donde se ha reportado la

presencia de serotonina, siguen existiendo eventos de diferenciación en la renovación de las células y corpúsculos gustativos. El inmunomarcaje con anti-TPH reveló la presencia de TPH en el plexo nervioso de la papila caliciforme de ratones control y Ko TPH1 (**Figura 19A, 19C, 19E y 19G**), el marcaje en animales control sin inducción con L-triptofano fue bastante bajo comparado con el mismo marcaje en los animales Ko TPH1 (**Figura 19A y 19C**); al parecer la carencia de la TPH1 induce la expresión constitutiva de la TPH2, única isoforma presente en el animal Ko TPH1 (**Figura 19C**). La carga de los animales con L-triptofano indujo la expresión de la TPH en los animales controles (**Figura 19E**), por la similitud en el perfil de marcaje con los animales Ko TPH1 (**Figura 19C**) es probable que la isoforma inducida sea la TPH2.

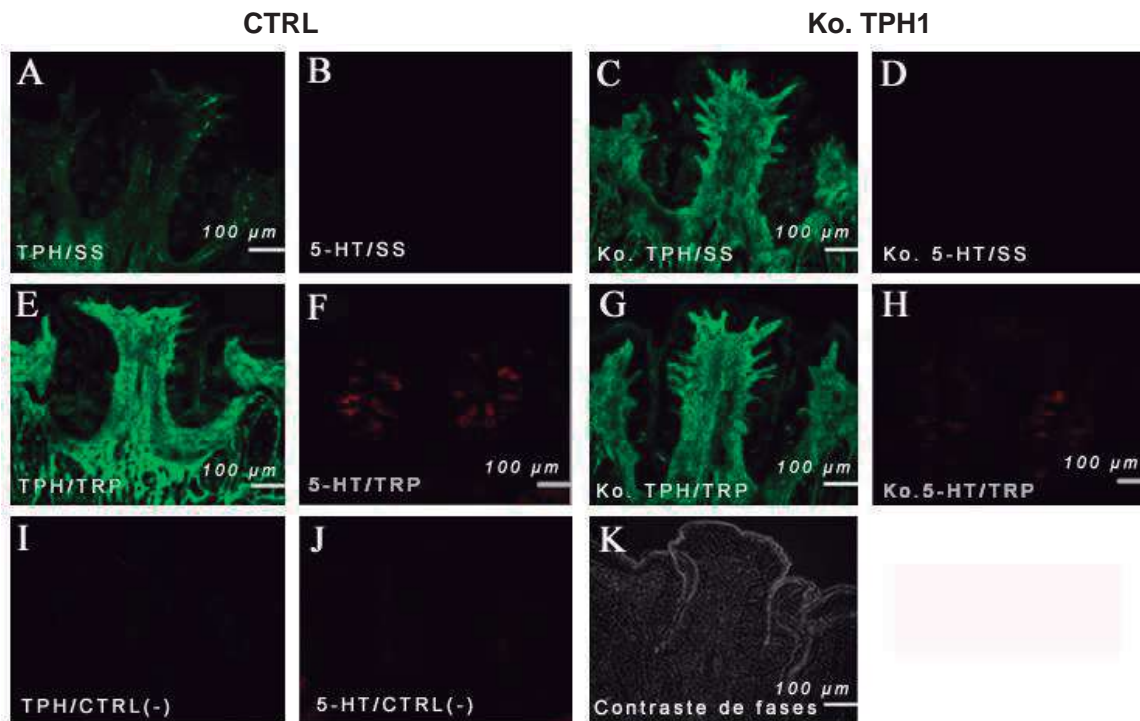


Figura 19. Doble marcaje inmunohistoquímico de la TPH y 5-HT. A y C son marcajes de la TPH en ratones control y Ko TPH1, respectivamente, tratados con SS. E y G los mismos marcajes que en A y C en animales inducidos con L-triptofano. B y D son marcajes con el anticuerpo anti-5-HT en animales control y Ko TPH1, respectivamente. F y H son los mismos marcajes que en B y D en animales inducidos con L-triptofano. I es el control negativo del marcaje TPH, donde el anticuerpo fue sustituido por PBS. En el panel J se presenta el control negativo del marcaje 5-HT, donde se sustituyo el anticuerpo con PBS. En ambos controles negativos no aparece señal de marcaje, lo cual significa que el marcaje TPH y 5-HT es específico. (K) imagen de contraste de fases de J.

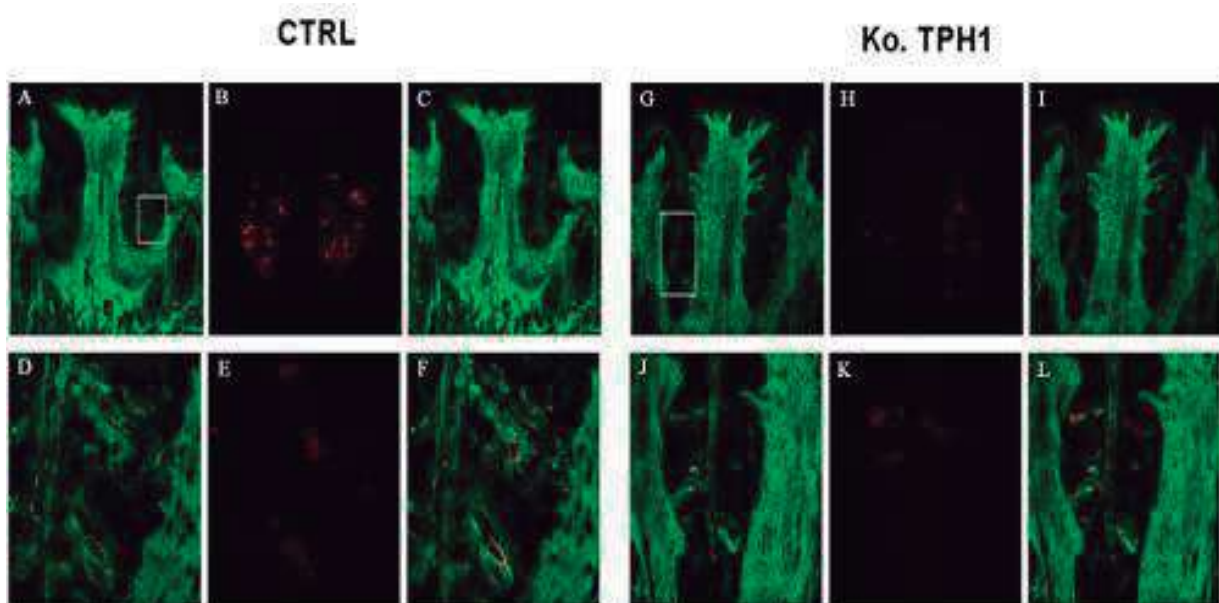


Figura 20. Imagen ampliada del doble marcaje inmunohistoquímico de la TPH y 5-HT. El color verde ilustra el marcaje de la TPH y el rojo el marcaje de la serotonina. Los paneles D, E, F y J, K, L son ampliaciones de los recuadros en A y G, respectivamente.

VII. 6 Efecto de la carencia de la TPH1 sobre la formación, innervación y morfología de las papilas gustativas

La presencia de la triptofano hidroxilasa en las papilas gustativas durante el desarrollo embrionario, así como la síntesis *in situ* de serotonina, apoya la hipótesis de nuestro trabajo, referente a la existencia de un sistema serotoninérgico inherente al epitelio lingual que participa en el desarrollo de las papilas gustativas. Para determinar la participación de la serotonina en el epitelio lingual, nosotros decidimos abordar la pregunta analizando el fenotipo de las papilas gustativas en un modelo genético caracterizado por una depleción selectiva de serotonina: los animales Knockout de la TPH1.

La existencia de dos isoformas de triptofano hidroxilasa ha sido sugerida por observaciones que se han ido acumulando por tres décadas, sin embargo, fue hasta el 2003, poco tiempo antes del inicio de nuestro trabajo, que se estableció claramente que estas dos isoformas, denominadas TPH1 y TPH2, son codificadas por dos genes

diferentes (Walther *et al.*, 2003). La TPH1 es la responsable de la síntesis de 5-HT en la periferia (glándula pineal e intestino), mientras que la TPH2 es la encargada de la síntesis de serotonina a nivel de sistema nerviosos central. Por este motivo, no se encontró serotonina en sangre, glándula pineal o intestino de los ratones Ko TPH1 (Walther *et al.*, 2003; Cote *et al.*, 2003). Por el contrario, estos animales no presentan variación alguna en el contenido cerebral de serotonina con respecto a los animales silvestres (TPH1 +/-). La utilización de los animales TPH1 -/- permiten, de esta manera, determinar cuales son las acciones fisiológicas moduladas exclusivamente por serotonina a nivel periférico. La implicación de la serotonina en la diferenciación de las células mamarias (Matsuda *et al.*, 2004) y en la regeneración hepática (Lesurtel *et al.*, 2006), ha sido demostrada claramente gracias a la utilización de los ratones Ko TPH1.

Nosotros realizamos un análisis del fenotipo de las papilas gustativas caliciformes y fungiformes en animales neonatos Ko TPH1. Gracias a que estos ratones son viables y fértiles, elegimos esta etapa del desarrollo para evitar eventuales fenómenos de compensación que pudieran afectar nuestro análisis.

VII. 6.1 *Efecto de la carencia de la TPH1 sobre el patrón de innervación de las papilas caliciformes*

Las papilas caliciformes son ricamente inervadas por la fibras del nervio glossofaríngeo (par craneal IX) de una manera bien definida. Las papilas caliciformes de los animales Ko TPH1 presentan una disminución severa en la densidad de innervación con respecto a los animales controles. Además, la inactivación genética de la TPH1 produjo en todos los animales una desorganización completa del perfil de innervación de las papilas caliciformes (**Figura 21**).

VII. 6.2 *Efecto de la carencia de la TPH1 sobre el número de papilas fungiformes*

El comarcaje PGP 9.5/TROMA-1 produce un marcaje neto y bien delimitado de las papilas fungiformes. El marcaje TROMA-1 permite visualizar precursores de corpúsculos gustativos, mientras que el marcaje PGP 9.5 permite visualizar las fibras gustativas que arriban a la base de los precursores de corpúsculos gustativos (**Figura 22**). En este

estudio se evaluó el número de papilas fungiformes de animales neonatos controles y Ko TPH1.

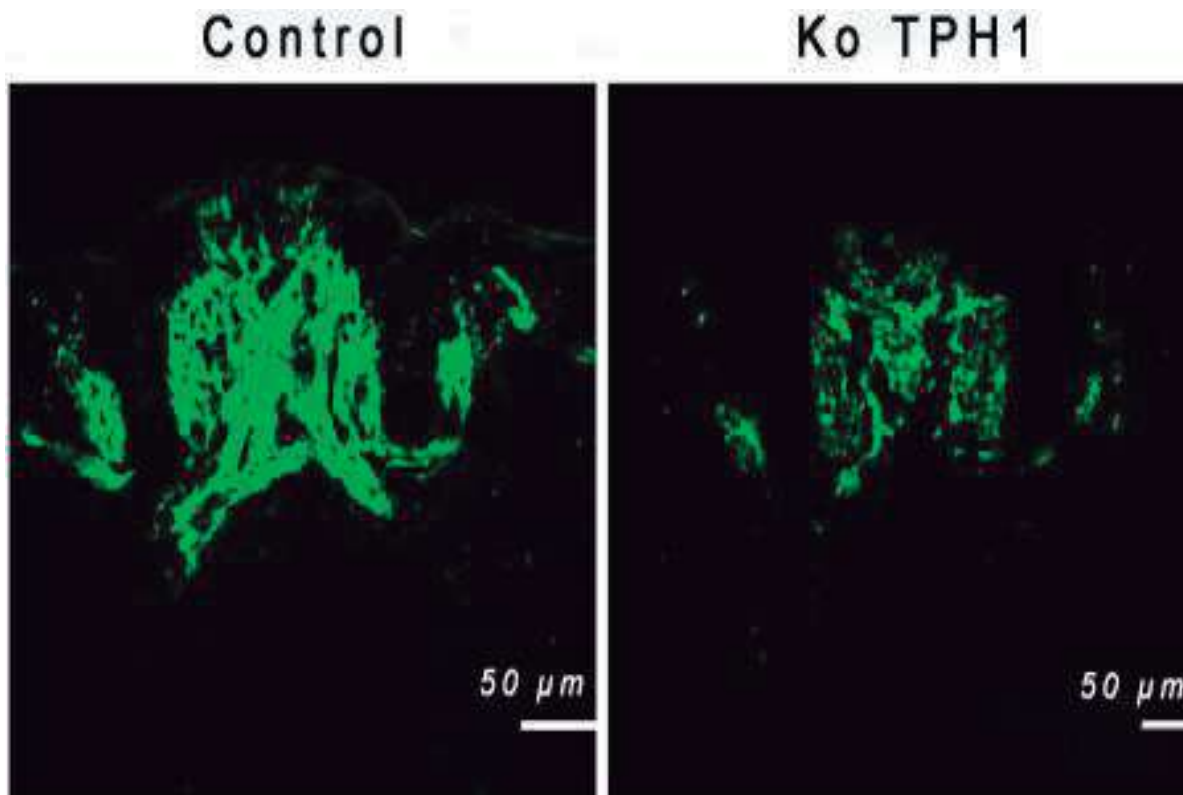


Figura 21. Efecto de la inactivación genética de la TPH1 sobre el patrón de innervación de las papilas caliciforme de ratón. La imagen ilustra el marcaje, con el anticuerpo PGP 9.5, de la innervación de las papilas caliciformes en ratones neonatos controles (izquierda) y Ko TPH1 (derecha).

El número de papilas fungiformes en los animales control fue de 135.25 ± 10 (**Figura 23**). Este valor concuerdan con el número medio de papilas fungiformes, presentes en ratones neonatos, reportado por otros autores (Sun and Oakley, 2002; Mbiene and Roberts, 2003). Con respecto al número de papilas fungiformes en los ratones Ko TPH1, este fue de 97.25 ± 7 (**Figura 23**). El resultado de este análisis es que existe una disminución significativa en el número de papilas fungiformes en los animales Ko TPH1 con respecto al control, aproximadamente del 30%.

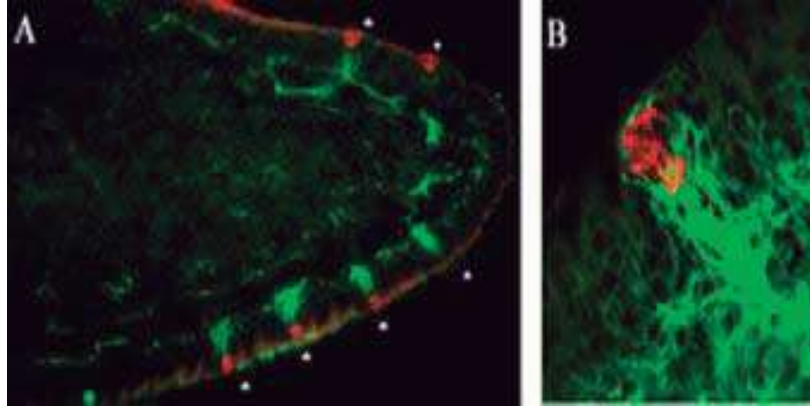


Figura 22. Visualización inmunohistoquímica de la papilas fungiformes de ratón. (A) imagen representativa de microscopia confocal que muestra marcaje inmunológico de los corpúsculos gustativos con el anticuerpo TROMA-1 (señal en rojo) y de la fibras gustativas con el anticuerpo PGP 9.5 (señal en verde), en un corte sagital de la parte anterior de la lengua de un ratón neonato control. (B) imagen ampliada de una papila fungiforme.

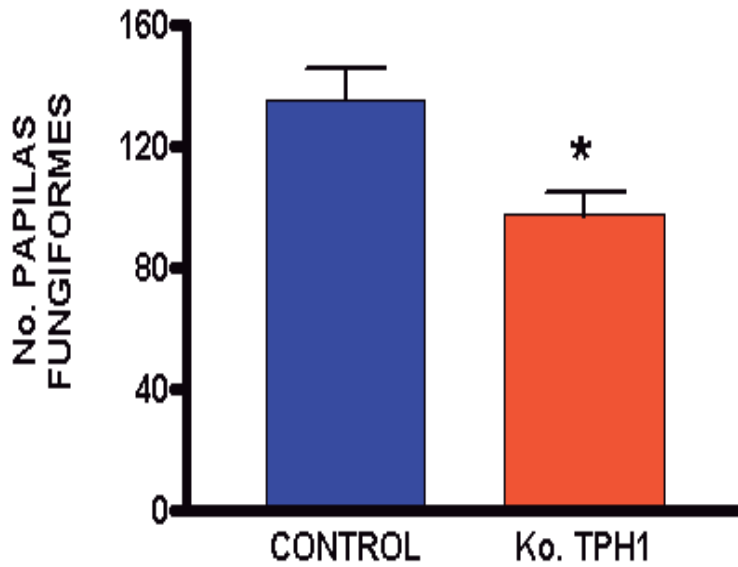


Figura 23. Efecto de la inactivación genética de la TPH1 sobre el número de papilas fungiformes en lengua de ratones control y ratones Ko TPH1. Media ± D.E. * $p < 0.05$ (n=50).

VII. 5.3 *Efecto de la carencia de la TPH1 sobre la morfología de las papilas caliciformes*

En la mayoría de los animales Ko TPH1 examinados, se observa una hipertrofia de las papilas caliciformes, la cual consiste en un incremento significativo en la altura con respecto al control (**Tabla V**), en cuanto a la amplitud no se encontraron cambios significativos.

Tabla V. Efecto de la inactivación genética de la TPH1 sobre la morfología de las papilas caliciformes. En esta tabla se muestran las medias \pm desviación estándar la amplitud y altura de las papilas caliciformes de ratones control y Ko. TPH1.

	Amplitud	Altura
Control	180 \pm 1.6	156 \pm 3.0
Ko. TPH1	191 \pm 4.7	166 \pm 0.5*

*p < 0.05 (n=10)

VIII. DISCUSION

A la fecha, la presencia del sistema serotoninérgico ha sido descrita en tres estructuras diferentes (Walther *et al.*, 2003): en intestino, glándula pineal y núcleos del rafé. En las dos primeras estructuras la serotonina es sintetizada por la TPH1, mientras que en la última la TPH2 es la responsable de la biosíntesis serotoninérgica. Estudios previos demostraron la presencia del SERT, MAO (A y B) y 5-HT en epitelio lingual embrionario ((Hansson *et al.*, 1999; Vitalis *et al.*, 2002). En este trabajo se demostró por biología molecular e inmunohistoquímica la expresión de la TPH (**Figura 9 y 16**). La expresión de los genes de la TPH1 y la TPH2 se observó desde los 15 días de gestación (**Figura 9**), también se detectó la expresión de ambas isoformas de TPH en muestras obtenidas de la totalidad de la lengua de embriones de 13 días de gestación (**Figura 10**). Estos resultados indican que la expresión de la TPH1 y la TPH2 en el epitelio lingual, toma lugar al inicio de la diferenciación e innervación de las papilas gustativas (Farbman and Mbiene, 1991; Mbiene *et al.*, 1997a).

Estudios previos en roedores adultos han demostrado de manera consistente que la serotonina es almacenada en un subgrupo de células gustativas de tipo III (Kim *et al.*, 1995; Nagai *et al.*, 1996; Nagai *et al.*, 1998; Ren *et al.*, 1999; Yee *et al.*, 2001), pero no se ha determinado si las células gustativas que contienen 5-HT tienen igualmente la capacidad de sintetizarla. En el análisis inmunohistoquímico que efectuamos en animales de 11 días postnatales (P11), etapa en la que aparecen las primeras células gustativas diferenciadas, encontramos células gustativas claramente marcadas con TPH lo que nos indica que la serotonina puede ser sintetizada en células gustativas (**Figura 18**). Cabe hacer la observación de que ciertas células marcadas con TPH expresan igualmente la gustducina (**Figura 18C y F**). Este resultado es sorprendente, ya que la gustducina es un marcador de células gustativas de tipo II, que a diferencia de las células de tipo III, contienen todos los elementos implicados en la detección y transducción de las señales gustativas, pero no forman sinapsis con las fibras sensoriales aferentes. Aunque la morfología de la papila gustativa a P11 es esencialmente idéntica a papilas caliciformes de animales adultos, nosotros no descartamos la posibilidad de que estas células

doblemente marcadas con TPH y gustducina sean diferentes a las células positivas a gustducina de animales adultos. Por otro lado, las células que reciben la información gustativa (tipo II) de las moléculas sápidas no establecen contacto sináptico con las aferentes primarias, por lo que se propone una comunicación paracrina entre estas células y las células que establecen sinapsis (células de tipo III) a través de neuromoduladores. Debido a que la 5-HT, receptores serotoninérgicos, así como el sistema de transporte y degradación de esta amina se expresan en las células gustativas funcionales (Ren *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2004; Kaya *et al.*, 2004), este neurotransmisor se convierte en un fuerte candidato a la neuromodulación en los corpúsculos gustativos. Nosotros proponemos que la 5-HT sintetizada en las células de tipo II (positivas a gustducina) es liberada durante la transmisión gustativa y activa receptores serotoninérgicos presentes en células de tipo III (Kaya *et al.*, 2004), las cuales transmiten la información a las fibras sensoriales. Sin embargo, estudios posteriores son necesarios para descartar una posible expresión de la TPH en los otros tipos de células gustativas. La prueba contundente que pone en evidencia la síntesis de 5-HT en células gustativas fue proporcionada por el comarcaje TPH/5-HT realizado en este trabajo. Cuando se trataron animales adultos con L-triptofano, el precursor de la serotonina, se observa una inducción en la expresión de TPH y la aparición de células doblemente inmunoreactivas a TPH y 5-HT (**Figura 19 y 20**). Aunque la síntesis de serotonina fue demostrada en animales adultos, la expresión de la enzima limitante en la síntesis de serotonina, la TPH, durante el desarrollo embrionario (este trabajo), además de la existencia de 5-HT y sus receptores en etapas tempranas del desarrollo embrionario de erizo de mar, rana, pollo y *Drosophila* (Lauder *et al.*, 1981; Buznikov *et al.*, 2001) nos permite hipotetizar que en el epitelio lingual hay síntesis de 5-HT.

En animales Ko TPH1, las papilas caliciformes presentaron una disminución severa en la densidad de innervación con respecto a los animales control y una desorganización casi total de la orientación axonal de las fibras del plexo nervioso (**Figura 21**). Diversos reportes en la literatura han puesto en evidencia el papel modulador de la serotonina sobre el crecimiento y migración axonal. En particular, se ha demostrado que la serotonina modula el patrón de innervación de los campos de barriles en la corteza

somatosensorial (Bennet-Clarke *et al.*, 1994; Cases *et al.*, 1996; Álvarez *et al.*, 2002) y la segregación de las proyecciones retino-talámicas (Upton *et al.*, 1999). Estos efectos resultan de la activación de los receptores 5-HT_{1B} localizados en los axones de las fibras tálamo-corticales (Bennet-Clarke *et al.*, 1993; Salichon *et al.*, 2001). Además, la depleción farmacológica o genética de 5-HT, retarda de manera importante la migración axonal de las fibras tálamo-corticales afectando el establecimiento de los contactos sinápticos entre las fibras y los campo de barriles en la corteza somatosensorial (Bennett-Clarke *et al.*, 1994; Cases *et al.*, 1996; Álvarez *et al.*, 2002). Por otro lado, cuando los niveles extracelulares de serotonina aumentan, después de la inactivación genética de la MAO A o del SERT, la innervación de la corteza somatosensorial no toma lugar (Cases *et al.*, 1996) y la segregación de las proyecciones del tálamo hacia la retina es abolida (Upton *et al.*, 1999). En estos casos, a diferencia del efecto deletéreo observado en la depleción de 5-HT, es un exceso y no una deficiencia en serotonina el que genera las alteraciones sobre el perfil de de innervación de la corteza somatosensorial y visual. Las alteraciones en la innervación de las papilas caliciformes generadas por la disminución en contenido de serotonina en el ratón Ko TPH1 son similares a las generadas por una depleción de serotonina sobre la innervación tálamo-cortical (Bennett-Clarke *et al.*, 1994; Cases *et al.*, 1996; Álvarez *et al.*, 2002). La serotonina modula la sinaptogénesis actuando como una molécula de reconocimiento (Mercado and Hernández, 1992), es probable que la deficiencia de serotonina en nuestro modelo de estudio altere la migración axonal produciendo la desorganización de la innervación observada.

Además del efecto sobre la papila caliciforme, la inactivación genética de la TPH1 disminuye de manera significativa el número de papilas fungiformes con respecto al control (**Figura 23**). También se observaron alteraciones morfológicas que se traducen en un aumento en la talla de la papila caliciforme (hipertrofia) en animales neonatos (**Tabla V**). La 5-HT ha sido detectada durante la división del cigoto, gastrulación y neurulación en embriones de erizo de mar, rana, pollo y *Drosophila* (Lauder *et al.*, 1988; Buznikov *et al.*, 2001). La presencia de 5-HT y sus receptores en embriogénesis temprana y la habilidad que tienen ciertos agente farmacológicos (Luder *et al.*, 1981) específicos de 5-HT para interferir con le desarrollo embrionario sugiere que los embriones primitivos

usan 5-HT para regular proliferación celular y/o movimientos morfogénicos (Lauder, 1988; Colas *et al.*, 1999). La administración de inhibidores de SERT, como son la sertralina o fluoxetina, a cultivos de embriones de ratón, conduce a malformaciones craneofaciales (Shuey *et al.*, 1992). Por otro lado, en embriones que crecen en presencia de 5-HT o inhibidores del transportador de serotonina, se ha reportado un decremento de la proliferación del miocardio, mesenquima cardíaco y endotelio indicando que la 5-HT puede regular la proliferación celular en el corazón embrionario (Yavarone *et al.*, 1993). La inactivación genética del receptor serotoninérgico 5-HT_{2B} conduce a la muerte embrionaria (E11) por malformaciones e hipoplasias cardíacas (Nebigil *et al.*, 2000). La inactivación genética del receptor 5-HT_{2B} produjo reducción en los niveles de expresión del receptor tirosin kinasa, ErbB-2, un receptor de membrana involucrado en eventos de diferenciación y proliferación celular, sugiriendo que la serotonina a través del receptor 5-HT_{2B} induce la mitosis durante la proliferación celular.

IX. CONCLUSIONES

- Existe un sistema serotoninérgico inherente al epitelio lingual.
- La serotonina participa en la innervación y en el desarrollo de las papilas gustativas

X. REFERENCIAS

- Adler, E., Hoon, M.A., Mueller, K.L., Chandrashekar, J. Ryba, N.J. and Zuker, C.S. (2000) A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 100, 693-702.
- Alvarez, C., Vitalis, T., Fon, E.A., Hanoun, N., Hamon, M., Seif, I., Edwards, R., Gaspar, P. and Cases, O. (2002) Effect of genetic depletion of monoamines on somatosensory cortical development. *Neuroscience* 115, 753-64.
- Avenet, P. and Lindemann, B. (1991) Noninvasive recording of receptor cell action potentials and sustained currents from single taste buds maintained in the tongue: the response to mucosal NaCl and amiloride. *J. Membr. Biol.* 124, 33-41.
- Azzali, G. (1997) Ultrastructure and immunocytochemistry of gustatory cells in man. *Ann. Anat.* 179, 37-44.
- Baldwin, D. and Rudge, S. (1995) The role of serotonin in depression and anxiety. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 4, 41-45.
- Barlow, L.A. (1999) A taste for development. *Neruron* 22, 209-212.
- Barlow, L.A. (2003) Toward a unified model of vertebrate taste bud development. *J. Comput. Neurol.* 457, 107-110.
- Barlow, L.A., Chien, C.B. and Northcutt, R.G. (1996) Embryonic taste buds develop in the absence of innervation. *Development.* 122, 1103-1111.
- Barlow, L.A. and Northcutt, R.G.(1998) The role of innervation in the development of taste buds: insights from studies of amphibian embryos. *Ann. NY Acad. Sci.* 855, 58-69.
- Barry, M.A., Halsell, C.B. and Whitehead, M.C. (1993a) Organization of the nucleus of the solitary tract in the hamster: Acetylcholinesterase, NADH dehydrogenase, and cytochrome oxidase histochemistry. *Microsc. Res. Tech.* 26, 231-244.
- Barry, M.A., Larson, D.C. and Frank, M.E. (1993b) Loss and recovery of sodium-salt taste following bilateral chorda tympani nerve crush. *Physiol. Behav.* 53, 75-80.
- Behrens, M. and Meyerhof, W. (2006) Bitter taste receptors and human bitter taste perception. *Cell Mol. Life. Sci.* 63, 1501-1509.
- Beidler, L.M. and Smallman, R.L. (1965) Renewal of cells within taste buds. *J. Cell Biol.* 27, 263-272.

Bennett-Clarke, C.A., Lane, R.D. and Rhoades, R.W. (1996) Fenfluramine depletes serotonin from the developing cortex and alters thalamocortical organization. *Brain Res.* 702, 255–260.

Bennett-Clarke, C.A., Leslie, M.J., Chiaia, N.L. and Rhoades, R.W. (1993) Serotonin IB receptors in the developing somatosensory and visual cortices are located on thalamocortical axons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 153–157.

Bennett-Clarke, C.A., Leslie, M.J., Lane, R.D. and Rhoades, R.W. (1994) Effect of serotonin depletion on vibrissa-related patterns of thalamic afferents in the rat's somatosensory cortex. *J. Neurosci.* 14, 7594-7607.

Berridge, K.C. and Fentress, J.C. (1985) Trigeminal-taste interaction in palatability processing. *Science* 228, 747-750.

Bigiani, A. (2001) Mouse taste cells with glialike membrane properties. *J. Neurophysiol.* 85, 1552-1560.

Bitgood, M.J. and McMahon, A.P. (1995) Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Develop. Biol.* 172, 126–138.

Blier, P., de Montigny, C. and Chaput, Y. (1987) Modifications of the serotonin system by antidepressants treatment: implications for therapeutic response in major depression. *J. Clin. Psychopharmacol.* 7, 24S-35S.

Bo, X., Alavi, A., Xiang, Z., Oglesby, I., Ford, A. and Burnstock, G. (1999) Localization of ATP-gated-P2X2 and P2X3 receptor immunoreactive nerves in rat taste buds. *Neuroreport.* 10, 1107-1111.

Boughner, J.D. Jr. Pumplun, D.W., Yu, C., Christy, R.C. and Smith, D.V. (1997) Differential expression of α -gustducin in taste bud populations of the rat and hamster. *Th. J. Neurosci.* 17, 2852-2858.

Boughner, J.G. (1997) Amiloride suppresses the responses to acids in NaCl best neurons of the hamster solitary nucleus. *Chem. Senses* 22, 648.

Bourin, M., David, D. J., Jolliet, P. and Gardier, A. (2002) Mechanism of action of antidepressants and therapeutic perspectives. *Thérapie* 57, 385-396.

Brawman-Mintzer, O. and Yankers, K. A. (2004) New trends in the treatment of anxiety disorder. *CNS Spectr.* 9, 19-27.

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

Buznikov, G.A., Lambert, H.W. and Lauder, J.M. (2001) Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell Tissue Res.* 305, 177–186.

Cases, O., Vitalis, T., Seif, I., De Maeyer, E., Sotelo, C. and Gaspar, P. (1996) Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxydase A-deficient mice: role of a serotonin excess during the critical period. *Neuron* 16, 297–307.

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 nervosa. *Am. J. Clin. Nutr.* 33, 1801-1808.

Cerf-Ducastel, B., van de Moortele, P.F., MacLeod, P., Le Bihan, D. and Faurion, A. (2001) Interaction of gustatory and lingual somatosensory perceptions at the cortical level in human: a functional magnetic resonance imaging study. *Chem. Senses* 26, 371-383.

Chandrashekar, J., Mueller, K.L., Hoon, M.A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., Zuker, C.S. and Ryba, N.J.P. (2000) T2R function as bitter taste receptor. *Cell* 100, 703-711.

Chaudhari, N., Landin, A.M. and Roper, S.D. (2000) A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor. *Nat. Neurosci.* 3, 113-119.

Chaudhari, N., Yang, H., Lamp, C., Delay, E., Cartford, C., Than, T. and Roper, S. (1996) The taste of monosodium glutamate: membrane receptors in taste buds. *J. Neurosci.* 16, 3817-3826.

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.

Colas, J.F., Launay, J.M., Vonesch, J.L., Hickel, P. and Maroteaux, L. (1999) Serotonin synchronises convergent extension of ectoderm with morphogenetic gastrulation movements in *Drosophila*. *Mech. Dev.* 87, 77–91.

Commons, K.G., Beck, S.G. and Bey, V.W. (2005) Two populations of glutamatergic axons in the rat dorsal raphe nucleus defined by the vesicular glutamate transporters 1 and 2. *Eur. J. Neurosci.* 21, 1577–1586.

Cooper, D. and Oakley, B. (1998) Functional redundancy and gustatory development in *bdnf* null mutant mice. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 105, 79-84.

Cote, F., Thevenot, E., Fligny, C., Fromes, Y., Darmon, M., Ripoche, M.A., Bayard, E., Hanoun, N., Saurini, F., Lechat, P., Dandolo, L., Hamon, M., Mallet, J. and Vodjdani, G. (2003) Disruption of the nonneuronal *tph1* gene demonstrated the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 13525-13530.

Cummings, S.T. and Kinnamon, S.C. (1992) Apical K⁺ channels in Necturus taste cells. Modulation by intracellular factors and taste stimuli. *J. Physiol.* 99, 591-613.

Curzon, G. (1988) Serotonergic mechanisms of depression. *Clin. Neuropharmacol.* 2, 11-20.

Dahlström, A. and Fuxe, K. (1964) Localization of monoamines in lower brain stem. *Experientia* 20, 398-399.

Damak, S., Rong, M., Yasumatsu, K., Kokrashvili, Z., Varadarajan, V., Zou, S., Jiang, P., Ninomiya, Y. and Margolskee, R.F. (2003) Detection of sweet and umami taste in absence of taste receptor T1r3. *Science* 301, 850-853.

Davis, B.J. and Smith, D.V. (1997) Substance P modulates taste responses in the nucleus of the solitary tract of the hamster. *Neuroreport.* 8, 1723-1727.

Decker, M.W. and McGaugh, J.L. (1991) The role of interactions between the cholinergic system and other neuromodulatory system in learning and memory. *Synapse* 7, 151-168.

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

DeFazio, R.A., Dvoryanchikov, G., Maruyama, Y., Kim, J.W., Pereira, E., Roper, S.D. and Chaudhari, N. (2006) Separate populations of receptor cells and presynaptic cell in mouse taste buds. *J. Neurosci.* 26, 3971-3980.

Delay, R.J., Kinnamon, S.C. and Roper, S.D. (1994) Serotonin modulates voltage-dependent calcium current in Necturus taste cell. *J. Neurophysiol.* 77, 2515-2524.

Descarries, L., Audet, M.A., Doucet, G., Garcia, S., Oleskevich, S., Seguela, P., Soghomonian, J.J. and Watkins, K.C. (1990) Morphology of central serotonin neurons. Brief review of quantified aspects of their distribution and ultrastructural relationship. *Ann. NY. Acad. Sci.* 600, 81-92.

Dethier, V.G. (1993) The role of taste in food intake: a comparative view: In mechanism of taste transduction, edited by S.A. Simon and S.D. Roper, Boca Raton FL: CRC Press. p. 3-28.

Dias, B.G. and Crews, D. S. (2006) Serotonergic modulation of male-like pseudocopulatory behavior in the parthenogenetic whiptail lizard, *Cnemidophorus uniparens*. *Horm. Behav.* 50, 401-409.

Doty, R.L. (1993) Smell and taste and their disorders. In: Disease of nervous system: clinical neurobiology, edited by A.K., Asbury, G.M. McKhann and W.I. McDonald, Philadelphia: Saunders, p. 390-403.

Eison, M.S. (1990) Serotonin: a common neurobiologic substrate in anxiety and depression. *J. Clin. Psychopharmacol.* 30, 26-30.

Elliott, E.J. and Simon, S.A. (1990) The anion in salt taste: a possible role for paracellular pathways. *Brain. Res.* 535, 9-17.

Fan, L., Girnius, S. and Oakley, B. (2004) Support of trigeminal sensory neurons by nonneural p57 neurotrophin receptor. *Dev. Brain Res.* 150, 23-39.

Farbman, A.I. (1980) Renewal of taste bud cell in rat circumvallate papillae. *Cell Tissue Kinet.* 13, 349-357.

Farbman, A.I. and Mbiene, J.P. (1991) Early development and innervation of taste bud-bearing papillae on the rat tongue. *J. Comput. Neurol.* 304, 172-186.

Fedelman, R.S. and Quenzer, L.F. (1984) Serotonin. In: *Fundamentals of Neurophychopharmacology*. Sinauer.

Finger, T.E., Danilova, V., Barrows, J., Bartel, D.L., Vigers, A.J., Stone, L., Hellekant, G. and Kinnamon, S.C. (2005) ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science* 310, 1495-1499.

Fujimiya, M., Hosada, S., Kitahama, K., Kimura, H. and Maeda, T. (1986) Early development of serotonin neuron in the rat brain by immunohistochemistry combined with tryptophan administration. *Brain Dev.* 8, 335-342.

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

Gaspar, P., Cases, O. and Maroteaux, L. (2003) The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 1002-1012.

Gershon, M.D. (2003) Plasticity in serotonin control mechanism in the gut. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3, 600-607.

Gershon, M.D. (2004) Serotonin receptor and transporters-role in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 7, 3-14.

Gilbertson, D.M. and Gilbertson, T.A. (1994) Amiloride reduces the aversiveness of acids in preference test. *Physiol. Behav.* 56, 649-654.

Goodwin, G.M., de Souza, R.J. and Green, A.R. (1987) The pharmacology of behavioral and hypothermic responses of rats to 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT). *Psychopharmacology* 91, 506-511.

Grant, R., Ferguson, M.M., Strang, R., Turner, J.W. and Bone, I. (1987) Evoked taste thresholds in a normal population and the application of electrogustometry to trigeminal nerve disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 50, 12-21.

Guyton, A.C. (1996) *Précis de Physiologie Médical.* Piccin Nuova Libreria, Padoue Italie.

Hall, J.M., Bell, M.L. and Finger, T.E. (2003) Disruption of sonic hedgehog signaling alters growth and patterning of lingual taste papillae. *Develop. Biol.* 255, 263–277.

Hall, J.M., Hooper, J.E. and Finger, T.E. (1999) Expression of sonic hedgehog, patched, and *Gli1* in developing taste papillae of the mouse. *J. Comput. Neurol.* 406, 143–155.

Hanamori, T., Kunitake, T., Kato, K. and Kannan, H. (1997) Convergence of oropharyngolaryngeal, baroreceptor and chemoreceptor afferents onto insular cortex neurons in rat. *Chem. Senses* 22, 399-406.

Hansson, S.R., Mezey, E. and Hoffman, B.J. (1999) Serotonin transporter messenger RNA expression in neural crest-derived structures and sensory pathways of the developing rat embryo. *Neurosci.* 89, 243–265.

Hayama, T., Ito, S. and Ogawa, H. (1987) Receptive field properties of the parabrachio-thalamic taste and mechanoreceptive neurons in rats. *Exper. Brain Res.* 68, 458-465.

Haydon, P.G., McCobb, D.P. and Kater, S.B. (1984) Serotonin selectively inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurons. *Science* 226, 561-564.

Haydon, P.G., McCobb, D.P. and Kater, S.B. (1987) The regulation of neurite outgrowth, growth cone motility, and electrical synaptogenesis by serotonin. *J. Neurobiol.* 18, 197-215.

Haycock, J.W., Kumer, S.C., Lewis, D.A., Vrana, K.E. and Stockmeier, C.A. (2002) A monoclonal antibody to tryptophan hydroxylase: applications and identification of the epitope. *J. Neurosci. Methods* 114, 205–212.

Herness, M.S. and Chen, Y. (2000) Serotonergic agonists inhibit calcium-activated potassium and voltage-dependent sodium currents in rat taste receptor cell. *J. Membr. Biol.* 173, 127- 138.

Herness, S. and Chen, Y. (1997) Serotonin inhibits calcium-activated K⁺ current in rat taste receptor cells. *Neuroreport* 8, 3257–3561.

Herness, S., Zhao, F.L., Lu, S.G., Kaya, N. and Shen, T. (2002) Expression and physiological actions of cholecystokinin in rat taste receptor cells. *J. Neurosci.* 22, 10018-10029.

Herness, S., Zhao, F.L., Kaya, N., Shen, T., Lu, S.G. and Cao, Y. (2005) Communication routes within the taste bud by neurotransmitter and neuropeptides. *Chem. Senses* 30, 37-38.

Hettinger, T.P. and Frank, M.E. (1990) Specificity of amilorida inhibition of hamster taste responses. *Brain Res.* 513, 24-34.

Hoon, M.A., Adler, E., Lindemeier, J., Battey, J.F., Ryba, N.J. and Zuker, C.S. (1999) Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell* 96, 541-551.

Hosley, M.A., Hughes, S.E., Morton, L.L. and Oakley, B. (1987) A sensitive period for the neural induction of taste buds. *J. Neurosci.* 7, 2075–2080.

Hoyer, D., Hannon, J.P. and Martin G.R. (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71, 533-554.

Huang, A.L., Chen, X., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Guo, W., Trankner, D., Ryba, N.J. and Zuker, C.S. (2006) The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 442, 934-938.

Huang, Y.J., Maruyama, Y., Lu, K.S., Pereira, E., Plonsky, I., Baur, J.E., Wu, D. and Roper, S.D. (2005a) Mouse taste buds use serotonin as a neurotransmitter. *J. Neurosci.* 25, 843–847.

Huang, Y.J., Maruyama, Y., Lu, K.S., Pereira, E., Plosky, I., Baur, J.E., Wu, D. and Roper, S.D. (2005b) Using biosensors to detect the release of serotonin from taste buds during taste stimulation. *Arch. Ita. Biol.* 143, 87-96.

Imendra, K.G., Fujiyama, R., Miyamoto, T., Okada, Y. and Sato, T. (2000) Serotonin inhibits voltage-gated sodium current by cyclic adenosine monophosphate-dependent mechanism in bullfrog taste receptor cells. *Neurosci. Lett.* 294, 151–154.

Imendra, K.G., Miyamoto, T., Okada, Y. and Toda, K. Serotonin differentially modulates the electrical properties of different subset of taste receptor cell in bullfrog. *Eur. J. Neurosci.* 16, 629-640.

Ishimura, K., Takeuchi, Y., Fujiwara, K., Tominaga, M., Yoshiaka, H. and Sawada, T. (1988) Quantitative analysis of the distribution of serotonin-immunoreactive cell bodies in the mouse brain. *Neurosci. Lett.* 91, 265-270.

Iverson, S.D. (1984) 5-HT and anxiety. *Neuropharmacology* 23, 1553-1560.

Johnston, A.L. and File, S.E. (1986) 5-HT and anxiety: promises and pitfalls. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24, 1467-1470

Jung, H.S., Oropeza, V. and Thesleff, I. (1999) Shh, Bmp-2, Bmp-4 and Fgf-8 are associated with initiation and patterning of mouse tongue papillae. *Mech. Dev.* 81, 179–182.

Kawai, K., Sugimoto, K., Nakashima, K., Miura, H. and Ninomiya, Y. (2000) Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 11044-11049.

Kaya, N., Shen, T., Lu, S.G., Zhao, F.L. and Herness, S. (2004) A paracrine signaling role for serotonin in rat taste buds: expression and localization of serotonin receptor subtypes. *Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol.* 286, R649–R658.

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

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.

Koert, C.E., Spencer, G.E., van Minnen, J., Li, K.W., Geraerts, W.P., Syed, N.I., Smit, A.B. and van Kestern, R.E. (2001) Functional implication of neurotransmitter expression during axonal regeneration: serotonin, but not peptides, auto-regulate axon growth of an identified central neuron. *J. Neurosci.* 21, 5597-5606.

Koga, T. and Bradley, R.M. (2000) Biophysical properties and responses to neurotransmitters of petrosal and geniculate ganglion neurons innervating the tongue. *J. Neurophysiol.* 84, 1404-1413.

Krizhanovsky, V., Agamy, O. and Naim, M. (2000) Sucrose-stimulated subsecond transient increase in cGMP level in rat intact circumvallate taste bud cell. *Am. J. Phys. Cell Phys.* 279, C120-125.

Lasurtel, M., Graf, R., Aleil, B., Walther, D.J., Tian, Y., Jochum, W., Gachet, C., Bader, M. and Clavien, P.A. (2006) Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* 312, 104-107.

Lauder, J. M. (1988) Neurotransmitters as morphogens *Prog. Brain Res.* 73, 365–387.

Lauder, J. M., Wallace, J. A. and Krebs, H. (1981) Roles for serotonin in neuroembryogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 133, 477–506.

Le Floch, J.P., Le Lievre, G., Sadoun, J., Perlemuter, L., Peynegre, R. and Hazard J. (1989) Taste impairment and related factors in type I diabetic patients. *Diabetes Care.* 12, 173-178.

Le Floch, J.P., Le Lievre, G., Verroust, J., Philippon, C., Peynegre, R. and Perlemuter, L. (1990) Factors related to the electric taste threshold in type 1 diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 7, 526-531.

Li, C.S., Davis, B.J. and Smith, D.V. (2003) Opioid modulation of taste responses in the nucleus of the solitary tract. *Brain Res.* 965, 21-34.

Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M. and Adler, E. (2002) Human receptors for sweet and umami taste. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 4692-4696.

Li, C.S. and Smith, D.V. (1997) Glutamate receptor antagonists block gustatory afferent input to the nucleus of solitary tract. *J. Neurophysiol.* 77, 1514-1525.

Lima, L., Matus, P. and Urbina, M. (1994) Syntesis inhibits outgrowth of golfish retina and impairs the trophic effect of taurine. *J. Neurosci. Res.* 38, 444-450.

Lima, L., Urbina, M., Matus, P. And Drujan, Y. (1996) synthesis of serotonin from 5-hydroxytryptophan in the post-crush retina: inhibition of in vitro outgrowth by the intraocular administration of the precursor. *Neurochem. Res.* 21, 939-946.

Lin, W. and Kinnamon, S.C. (1999) Physiological evidence for ionotropic and metabotropic glutamate receptors in rat taste cells. *J. Neurophysiol.* 82, 2061-2069.

Lindemann, B. (2001) Receptors and transduction in taste. *Nature* 413, 219-225.

Lindemann, B. (1996) Taste reception. *Physiol. Rev.* 76, 718-766

Livak, K.J. and Schmittgen, T. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta C_T}$ method. *Methods* 25, 402–408.

Lucki, I. (1998) the spectrum behaviors influenced by serotonin. *Biol. Psychiatry.* 44, 151-162.

Martin, L.L. and Sanders-Bush, E. (1982) The serotonin autoreceptor: antagonism by quipazine. *Neuropharmacology* 21, 445-450.

Matsuda, M., Imaoka, T., Vomachka, A.J., Gudelsky, G.A., Hou, Z., Mistry, M., Bailey, J.P., Nieport, K.M., Walther, D.J., Bader, M. and Horseman, N.D. (2004) Serotonin

regulates mammary gland development via an autocrine-paracrine loop. *Dev. Cell* 6, 193-203.

Matsuo, R., Inoue, T., Masuda, Y., Nakamura, O., Yamauchi, Y. and Morimoto, T. (1995) Neural activity of chorda tympani mechanosensitive fibers during licking behavior in rat. *Brain Res.* 689, 289-298.

Mattes, R.D. (1997) Physiologic responses to sensory stimulation by food: nutritional implications. *J. Am. Diet. Assoc.* 97, 406-413.

Mattes, R.D. and Cowart, B.J. (1994) Dietary assessment of patients with chemosensory disorders. *J. Am. Diet. Assoc.* 94, 50-56.

Max, M., Shanker, Y.G., Huang, L., Rong, M., Liu, Z., Campagne, F., Weinstein, H., Damak, S. and Margolskee, R.F. (2001) *Tas1r3*, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus *Sac*. *Nat. Genet.* 28, 58-63.

Mbiene, J.P., Maccallum, D.K. and Mistretta, C.M. (1997a) Initial innervation of embryonic rat tongue and developing taste papillae: nerves follow distinctive and spatially restricted pathways. *Acta Anat. (Basel)*. 160, 139-158.

Mbiene, J.P., Maccallum, D.K. and Mistretta, C.M. (1997b) Organ cultures of embryonic rat tongue support tongue and gustatory papilla morphogenesis in vitro without intact sensory ganglia. *J. Comput. Neurol.* 377, 324-340.

Mbiene, J.P. and Roberts, J.D. (2003) Distribution of keratin 8-containing cell clusters in mouse embryonic tongue: evidence for a pre-pattern for taste bud development. *J. Comput. Neurol.* 457, 111-122.

McCobb D.P., Haydon, P.G. and Kater, S.B. (1988) Dopamine and serotonin inhibition of neurite elongation identified neurons. *J. Neurosci. Res.* 19, 19-26.

Mercado, R., Floran, B. and Hernandez, J. (1998) Regulated release of serotonin from axonal growth cones isolated from the fetal rat brain. *Neurochem. Int.* 32, 103-106.

Mercado, R. and Hernandez, J. (1992) A molecular recognizing system of serotonin in rat fetal axonal growth cones: uptake and high affinity binding. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 69, 133-137.

Meyer, T. and Brinck, U. (1999) Differential distribution of serotonin and tryptophan hydroxylase in the human gastrointestinal tract. *Digestion* 60, 63-68.

Meyerhof, W. (2005) Elucidation of mammalian bitter taste. *Rev. Physiol, Biochem. Pharmacol.* 154, 37-72.

Miller, S.M. and Naylor, G.J. (1989) Unpleasant taste--aneglected symptom in depression. *J. Affect. Disord.* 17, 291-293.

Mistretta, C.M., Liu, H.X., Gaffield, W. and MacCallum, D.K. (2003) Cyclopamine and jervine in embryonic rat tongue cultures demonstrate a role for Shh signaling in taste papilla development and patterning: fungiform papillae double in number and form in novel locations in dorsal lingual epithelium. *Develop. Biol.* 254, 1-18.

Montmayeur, J.P., Liberles, S.D., Matsunami, H. and Buck, L.B. (2001) A candidate taste receptor near a sweet taste locus. *Nat. Neurosci.* 4, 492-498.

Mueller, K.L., Hoon, M.A., Erlenbach, I., Chandrashekar, J., Zuker, C.S. and Ryba, J.P. (2005) The receptor and coding logic for bitter taste. *Nature* 434, 225-229.

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 occurrence of the cell type containing a specific monoamine in the taste bud 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, [³H]serotonin, [³H]glutamate, and [³H]gamma-aminobutyric acid, in taste buds of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. *J. Comput. Neurol.* 392, 199-208.

Nagai, T., Kim, D.J., Delay, R.J. and Roper, S.D. (1996) Neuromodulation of transduction and signals processing in the end organs of taste. *Chem. Senses* 21, 353-365.

Naim, M., Seifert, B., Nurnber, F., Grunbaum, L. and Schultz, G. (1994) Some taste substances are direct activators of G-proteins. *Biochem. J.* 297, 451-454.

Nebigil, C.G., Choi, D.S., Dierich, A., Hickel, P., Le Meur, M., Messaddeq, N., Launay J.M. and Maroteaux, L. (2000) Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9508-9513.

Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M.K., Feng, L., Ryba, N.J. and Zuker, C.S. (2002) An amino-acid taste receptor. *Nature* 416, 199-202.

Nelson, G., Hoon, M.K., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N.J.P. and Zuker, C.S. (2001) Mammalian sweet taste receptor. *Cell.* 106, 381-390.

Ni, W. and Watts, S.W. (2006) 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the transporter (SERT). *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33, 575-583.

Nomura, T. and Ogawa, H. (1985) The taste and mechanical response properties of neurons in the parvocellular part of the thalamic posteromedial ventral nucleus of the rat. *Neurosci. Res.* 3, 91-105.

Nosrat, C.A., Ebendal, T. and Olson, L. (1996) Differential expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 mRNA in lingual papillae and taste buds indicates roles in gustatory and somatosensory innervation. *J. Comp. Neurol.* 376, 587-602.

Nosrat, C.A., Blomlof, J., ElShamy, W.M., Ernfors, P. and Olson, L. (1997) Lingual deficits in BDNF and NT3 mutant mice leading to gustatory and somatosensory disturbances, respectively. *Development*, 124, 1333-1342.

Oakley, B., Brandemihl, A., Cooper, D., Lau, D., Lawton, A. and Zhang, C. (1998) The morphogenesis of mouse vallate gustatory epithelium and taste buds requires BDNF-dependent taste neurons. *Brain Res. Dev. Brain* 105, 85-96.

Oakley, B., Lawton, A., Riddle, D.R. and Wu, L.H. (1993) Morphometric and immunocytochemical assessment of fungiform taste buds after interruption of the chorda-lingual nerve. *Microsc. Res. Technol.* 26, 187-195.

Oliveras, J.L., Guilbaud, G. and Besson, J.M. (1979) A map of serotonergic structures involved in stimulation producing analgesia in unrestrained freely moving cats. *Brain Res.* 164, 317-322.

Parker, M.A., Bell, M.L. and Barlow, L.A. (2004) Cell contact-dependent mechanisms specify taste buds pattern during a critical period early in embryonic development. *Dev. Dyn.* 230, 630-642.

Pauwels, P.G. (2000) Diverse signaling by 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor. *Biochem. Pharmacol.* 1743-150.

Peri, I., Mamrud-Brains, H., Rodin, S., Krizhanovsky, V., Shai, Y., Nir, S. and Nime, M. (2000) Rapid entry of bitter and sweet tastants into liposomes and taste cell: implications for signal transduction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278, C17-C25.

Proudfit, H.K. and Anderson, E.G. (1975) Morphine analgesia: blockade by raphe magnus lesions. *Brain Res.* 98, 612-618.

Ren, Y., Shimada, K., Shirai, Y., Fujimiya, M. and Saito, N. (1999) Immunocytochemical localization of serotonin and serotonin transporter (SET) in taste buds of rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 74, 221-224.

Ringstedt, T., Ibanez, C.F. and Nosrat, C.A. (1999) Role of brain-derived neurotrophic factor in target invasion in the gustatory system. *J. Neurosci.* 9, 3507-3518.

Rochlin, M.W. and Farbman, A.I. (1998) Trigeminal ganglion axons are repelled by their presumptive targets. *J. Neurosci.* 18, 6840-6852.

Ruiz, C.J., Stone, L.M., McPhheeters, M., Ogura, T., Bottger, B., Lasher, R.S., Finger, T.E. and Kinnamon, S.C. (2001) Maintenance of rat taste buds in primary culture. *Chem. Senses* 26, 861-873.

Sahagún-Flores, J.E., Bravo-Cuellar, A., Celis, A., Hernández-Flores, G. and Orbach-Arbouys, S. (2000) Elevated salt taste detection threshold in subjects with essential arterial hypertension. *Presse médicale* 29, 1458.

Salichon, N., Gaspar, P., Upton, A.L., Picaud, S., Hanoun, N., Hamon, M., De Maeyer, E., Murphy, D.L., Mossner, R., Lesch, K.P., Hen, R. and Seif, I. (2001) Excessive activation of serotonin (5-HT) 1B receptors disrupts the formation of sensory maps in monoamine oxydase and 5-HT transporter Knock-out mice. *J. Neurosci.* 21, 884–896.

Schiffman, S.S. (2000) Taste quality and neural coding: implications from psychophysics and neurophysiology. *Physiol. Behav.* 69, 147-159.

Scott, Kristin. (2004) The sweet and bitter of mammalian taste. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 423-427.

Shen, T., Kaya, N., Zhao, F.L., Lu, S.G., Cao, Y. and Herness, S. (2005) Co-expression patterns of neuropeptides vasoactive intestinal peptide and cholecystokinin with the transduction molecules gustducin and T1R2 in rat taste receptor cells. *Neurosci.* 130, 229-238.

Shuey, D.L., Sadler, T.W. and Lauder, J.M. (1992) Serotonin as a regulator of craniofacial morphogenesis site specific malformations following exposure to serotonin uptake inhibitors. *Teratology* 46, 367-378.

Sikich, L., Hickok, J.M. and Todd, R. D. (1990) 5-HT_{1A} receptors control neurite branching during development. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 56, 269-274.

Simons, C.T., Boucher, Y. and Carstens, E. (2003) Suppression of central taste transmission by oral capsaicin. *J. Neurosci.* 23, 978-985.

Smith, D.V. and St John, S.J., (1999) Neural coding of gustatory information. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 427-435.

Smith, D.V. and Li, C.S. (1998) Tonic GABAergic inhibition of taste-responsive neurons in the nucleus of the solitary tract. *Chem. Senses* 23, 159-1998.

Stolbova, K., Hahn, A., Benes, B., Andel, M. and Treslova, L. (1999) Gustometry of diabetes mellitus patients and obese patients. *Int. Tinnitus. J.* 5, 135-140.

Sun, H. and Oakley, B. (2002) Development of anterior gustatory epithelia in the palate and tongue requires epidermal growth factor receptor. *Dev. Biol.* 242, 31-43.

Suzuki, Y., Takeda, M. y Obara, N. and Nagai, Y. (1996) Phagocytic cell in the taste buds of rat circumvallate papillae alter denervation. *Chem. Senses* 21, 467-476.

Suzuki, Y., Takeda, M. and Obara, N. (2002) Expression of NeuroD in the mouse taste buds. *Cell Tissue Res.* 307, 423-428.

Taniguchi, M., Yuasa, S., Fulisawa, H., Naruse, I., Saga, S., Mishina, M. and Yagi, T. (1997) Disruption of semaphoring III/D gene causes severe abnormality in peripheral nerve projection. *Neuron* 19, 519-530.

Törk, I. (1990) Anatomy of the serotonergic system. *Ann. NY. Acad. Sci.* 600, 9-34.

Toyono, T., Seta, Y., Kataoka, S., Shigemoto, R. and Toyoshima, K. (2002) Expression of the metabotropic glutamate receptor, mGluR4a, in the taste hairs of taste buds in rat gustatory papillae. *Arch. Histol.Cytol.* 65, 91-96.

Toyono, T., Seta, Y., Kataoka, S., Shigemoto, R. and Toyoshima, K. (2003) Expression of metabotropic glutamate receptor group I in rat gustatory papillae. *Cell Tissue Res.* 313, 29-35.

Toyoshima, K., Seta, Y., Toyono, T. and Takeda, S. (1999) Merkel cells are responsible for initiation of taste organ morphogenesis in the frog. *J. Comp. Neurol.* 406, 129-140.

Travers, S.P. and Norgren, R. (1995) Organization of orosensory responses in the nucleus of the solitary tract of rat. *J. Neurophysiol.* 73, 2144-2162.

Upton, A.L., Salichon, N., Lebrand, C., Ravary, A., Blakey, R., Seif, I. and Gaspar, P. (1999) Excess of serotonin (5-HT) alters the segregation of ipsilateral and contralateral retinal projections in monoamine oxydase A knock-out mice: possible role of 5-HT uptake in retinal ganglion cells during development. *J. Neurosci.* 19, 7007-7024.

Vacher, C.M., Calas, A. Maltonti, F. and Hardin-Pouzet, H. (2004) Postnatel regulation by monoamines of vasopressin expression in the neuroendocrine hypothalamus of MAO-A-deficient mice. *Eur. J. Neurosci.* 19, 1110-1114.

Vitalis, T., Fouquet, C., Alvarez, C., Seif, I., Price, D., Gaspar, P. and Cases, O. (2002) Developmental expression of monoamine oxidases A and B in the central and peripheral nervous systems of the mouse. *J. Comput. Neurol.* 442, 331-347.

Walther, D.J., Peter, J.U., Bashammakh, S., Hortnagl, H., Voits, M., Fink, H. and Bader, M. (2003) Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 299, 76.

- Wang, Y., Erickson, R.P. and Simon, S.A. (1995) Modulation of rat chorda tympani nerve activity by lingual nerve stimulation. *J. Neurophysiol.* 73, 1468-1483.
- Whitehead, M.C., Frank, M.E., Hettinger, T.P., Hou, L.T. and Nah, H.D. (1987) Persistence of taste buds in denervated fungiform papillae. *Brain Res.* 405, 192-195.
- Whitehead, M.C. and Kachele, D.L. (1994) Development of fungiform papillae, taste buds, and their innervation in the hamster. *J. Comp. Neurol.* 340, 515-530.
- Winkler, S., Garg, A.K., Mekayarajjanonanth, T., Bakaeen, L.G. and Khan, E. (1999) Expression of the metabotropic glutamate receptor, mGluR4a, in the taste hairs of taste buds in rat gustatory papillae. *J. Am. Den. Asso.* 130, 1759-1765.
- Wong, G.T., Gannon, K.S. and Margolskee, R.F.. (1996) Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature* 381, 796-800.
- Xu, Y., Ito, A. and Arai, R. (2004) Immunohistochemical localization of monoamine oxidase type B in the taste bud of the rat. *Neurotoxicology.* 25, 149–154.
- Yaksh, T.L. and Wilson R.P. (1979) Spinal serotonin terminal system mediates antinociception. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208, 446-453.
- Yan, W., Sunavala, S., Rosenzweig, S., Dasso, M., Brand, J.G. and Spielman, A.I. (2001) Bitter taste transduced by PLC β_2 dependent rise in IP $_3$ and alpha-gustducin-dependent fall in cyclic nucleotides. *Am. Physiol. Cell Physiol.* 280, C742-C745.
- Yang, R., Tabata, S., Crowley, H.H., Margolskee, R.F. and Kinnamon, J.C. (2000a) Ultrastructural localisation of gustducin immunoreactivity in microvilli of type II taste cell in the rat. *J. Comp. Neurol.* 425, 139-151.
- Yang, R., Crowley, H.H., Rock, M.E. and 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., Stoick, C.L. and Kinnamon, J.C. (2004) Synaptobrevin-2-like immunoreactivity is associated with vesicles at synapses in rat circumvallate taste buds. *J. Comp. Neurol.* 417, 59-71.
- Yavarone, M. S., Shuey, D. L., Tamir, H., Sadler, T. W. and Lauder, J. M. (1993) Serotonin and cardiac morphogenesis in the mouse embryo. *Teratology* 47, 573–584.
- Ye, Q., Heck, C.L. and DeSimone, J.A. (1991) The anion paradox in sodium taste reception: resolution by voltage-clamp studies. *Science* 254, 724-726.

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.

Yohrling IV, G.J., Jiang, G.C.-T., DeJohn, M.M., Robertson, D.J., Vrana, K.E. and Cha, J.-H.J. (2002) Inhibition of tryptophan hydroxylase activity and decreased 5-HT_{1A} receptor binding in a mouse model of Huntington's disease. *J. Neurochem.* 82, 1416–1423.

Zhang, C., Brandemuhl, A., Lau, D., Lawton, A. and Oakley, B. (1997) BDNF is required for the normal development of taste neurons in vivo. *Neuroreport* 8, 1013-1017.

Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Mueller, K.L., Cook, B., Wu, D., Zuker, C.S. and Ryba, N.J. (2003) Coding of sweet, bitter, and umami taste: different receptor cell sharing similar signaling pathways. *Cell* 112, 293-301.

Zhao, F.L., Shen, T., Kaya, N., Lu, S.G., Cao, Y. and Herness S. (2005) Expression, physiological actions, and coexpression patterns of neuropeptide Y in rat taste-bud cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 11100-11105.

Zhong, H.J., Zhang, M. and Nurse, C.A. (1999) Electrophysiological characterization of 5-HT receptor on rat petrosal neurons in dissociated cell culture. *Brain Res.* 816, 544-553.

Zhou, Y., Liu, H.X. and Mistretta, C.M. (2006) Bone morphogenetic proteins and noggin: inhibiting and inducing fungiform taste papilla development. *Dev. Biol.* 297, 198-213.