



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA  
FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

NEURONTOGENIA DEL RECEPTOR 5-HT<sub>2B</sub> EN LA PAPILA CALICIFORME  
DE LA RATA

TESIS QUE PRESENTA

JAIME ACOSTA CHÁVEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO  
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR DE TESIS: D.C. ROSALIO MERCADO CAMARGO

MORELIA, MICHOACÁN, AGOSTO DE 2010.

**El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Neurobiología de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Bajo la asesoría del D.C. Rosalio Mercado Camargo.**

	CONTENIDO	Página
	Índice de figuras	vi
	Índice de tablas	vii
	Índice de abreviaciones	viii
I	Resumen	1
II	Abstract	2
III	Introducción	3
III.1	Sistema gustativo	3
III.1.1	Papilas gustativas	6
III.1.2	Corpúsculos gustativos	7
III.1.3	Mecanismos moleculares de la detección de las modalidades gustativas	9
III.1.4	Comunicación celular en los corpúsculos gustativos	15
III.1.5	Recambio celular en el corpúsculo gustativo	17
III.2	Desarrollo del sistema gustativo	17
III.3	Factores moleculares que participan en el desarrollo del sistema gustativo periférico	19
III.4	Serotonina	21
III.4.1	Sistema serotoninérgico	21
III.4.2	Síntesis de serotonina	21
III.4.3	Participación de la serotonina en procesos de desarrollo	25
III.4.4	Serotonina y sistema gustativo	27
IV	Hipótesis	30
V	Objetivo general	30
VI	Objetivos específicos	30
VII	Materiales y métodos	31
VII.1	Animales	31
VII.2	Tratamiento farmacológico	31
VII.3	Obtención de las papilas caliciformes	32
VII.4	Extracción de los ácidos nucleicos	32

VII.5	Reacción de retrotranscripción (RT)	33
VII.6	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	34
VII.7	Análisis de densitometría	35
VII.8	Tinción hematoxilina-eosina	35
VII.9	Conteo de corpúsculos gustativos	36
VII.10	Análisis de morfología de la papila caliciforme del animal tratado con PCPA	36
VII.11	Análisis estadístico	36
VIII	Resultados	37
VIII.1	Validación de los oligonucleótidos para el receptor 5-HT <sub>2B</sub> y para la $\beta$ -actina	37
VIII.2	Validación del control interno	38
VIII.3	Expresión del receptor 5-HT <sub>2B</sub> en la papila caliciforme	39
VIII.4	Expresión relativa del receptor 5-HT <sub>2B</sub> en la papila caliciforme de animales tratados con PCPA	40
VIII.5	Número de corpúsculos gustativos en la papila caliciforme	41
VIII.6	Morfología de la papila caliciforme de ratas tratadas con PCPA	42
IX	Discusión	50
X	Conclusión	54
XI	Bibliografía	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página.
1. –	Neuroanatomía del sistema gustativo	5
2. –	Localización de las papilas gustativas	7
3. –	Esquema representativo de los corpúsculos gustativos	8
4. –	Mecanismo molecular de la modalidad salada	10
5. –	Mecanismo molecular de la modalidad ácida	11
6. –	Mecanismo molecular de la modalidad dulce	13
7. –	Mecanismo molecular de la modalidad amargo	15
8. –	Comunicación entre las células gustativas	16
9. –	Biosíntesis de serotonina	22
10.–	Validación de los oligonucleótidos para el receptor 5-HT <sub>2B</sub> y para la $\beta$ -actina	37
11.–	Productos de reacción de PCR para la $\beta$ -actina en la papila caliciforme	38
12.-	Productos de reacción de PCR para el receptor 5-HT <sub>2B</sub> en la papila caliciforme	39
13.-	Densitometría de las bandas del receptor 5-HT <sub>2B</sub> en la papila caliciforme	40
14.-	Porcentaje de expresión relativa del receptor 5-HT <sub>2B</sub> en la papila caliciforme de animales tratados con PCPA	41
15.-	Número de corpúsculos gustativos en la papila caliciforme de animales control y tratados con PCPA	42
16.-	Fotomicrografías de la papila caliciforme en E17 de animales control y tratados con PCPA	43

17.-	Fotomicrografías de la papila caliciforme en P0 de animales control y tratados con PCPA	43
18.-	Fotomicrografías de la papila caliciforme en P7 de animales control y tratados con PCPA	44
19.-	Fotomicrografías de la papila caliciforme en P14 de animales control y tratados con PCPA	45
20.-	Fotomicrografías de la papila caliciforme en P21 de animales control y tratados con PCPA.	46
21.-	Fotomicrografías de la papila caliciforme en P60 de animales control y tratados con PCPA.	47
22.-	Análisis de la longitud de la papila caliciforme de animales control y tratados con PCPA.	47
23.-	Análisis de la amplitud de la trinchera de la papila caliciforme de animales control y tratados con PCPA.	48
24.-	Análisis del tejido epitelial de la papila caliciforme de animales control y tratados con PCPA.	49

### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1.-	Desarrollo temporal del sistema gustativo	19
2.-	Clasificación de los receptores serotoninérgicos	24
3.-	Condiciones de reacción para la RT	33
4.-	Secuencia de oligonucleótidos para el receptor 5-HT <sub>2B</sub> y la $\beta$ -actina	34
5.-	Condiciones para la PCR	34
6.-	Volúmenes empleados para la PCR	34

## ÍNDICE DE ABREVIACIONES

5,7-DHT	5,7-Dihidroxitriptamina.
ACh	Acetilcolina.
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
RNA	Ácido Ribonucleico.
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico.
ATP	Adenosín trifosfato.
PBS	Buffer salino de fosfatos.
PKD	Canales de la enfermedad poliquística de riñón.
K2P	Canales de potasio.
ASICs	Canales sensibles a iones ácidos.
CHO	Células de ovario de Hamster.
CCK	Colecitosquinina.
Km	Constante de Michaelis-Menten.
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfato.
E15	Día fetal 15.
E17	Día fetal 17.
P0	Día postnatal 0.
P7	Día postnatal 7.
P14	Día postnatal 14.
P21	Día postnatal 21.
P60	Día postnatal 60.
DAG	Diacilglicerol.
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro.

PIP2	Fosfatidilinositol bifostato.
PLC $\beta$ 2	Fosfolipasa C $\beta$ 2.
°C	Grados Celsius
H	Horas
IP3	Inositol trifosfato
KO	Knockout.
UV	Luz ultravioleta.
$\mu$ m	Micrómetros.
MAO	Monoamino oxidasa.
Nm	Nanómetros.
Ngn2	Neurogenina 2.
NT	Neurotrofina.
NA	Noradrenalina.
pCPA	DL-Para-Clorofenilalanina.
PB	Pares de bases.
VIP	Péptido vasoactivo intestinal
pH	Potencial de Hidrogeno.
BMP	Proteína morfogénica de hueso.
Shh	Proteína sinic Hedhog.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
5-HT <sub>1A</sub>	Receptor para serotonina 1A.
5-HT <sub>2B</sub>	Receptor para serotonina 2B.
5-HT <sub>3</sub>	Receptor para serotonina 3.
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G.
RT	Retro-transcripción.
5-HT	Serotonina
SERT	Transportador para serotonina.



TPH                      Triptófano hidroxilasa.  
Vmax                    Velocidad máxima.

## I.- RESUMEN

El sentido del gusto es el encargado de reconocer a las moléculas sápidas contenidas en los alimentos y líquidos que son ingeridos. El primer elemento en el procesamiento de los sabores son un tipo de células especializadas denominadas células gustativas, las cuales se agrupan para formar los corpúsculos, que a su vez forman las papilas gustativas. Las cuales se clasifican atendiendo a su morfología en papilas fungiformes, foliadas y caliciformes. Se ha reportado la presencia de un sistema serotoninérgico inherente al epitelio lingual, la serotonina (5-HT) entre sus múltiples funciones es la de actuar como un factor trófico durante el desarrollo, en relación con el sistema gustativo, se ha demostrado que la 5-HT despolariza las neuronas aisladas de las fibras nerviosas aferentes, que inervan a los corpúsculos gustativos. Así como una reducción en la permeabilidad a iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en las células gustativas. Estas observaciones sugieren que la 5-HT participa activamente en los procesos de detección y transmisión de la señal gustativa. En la papila caliciforme de la rata adulta se ha reportado la expresión de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>3</sub>, actualmente no se conoce qué receptores serotoninérgicos se expresan durante el desarrollo del sistema gustativo y tampoco se conoce el perfil de expresión temporal de estos receptores. Por lo que el objetivo del presente proyecto fue determinar si el receptor 5-HT<sub>2B</sub> se expresa durante las etapas clave de desarrollo de la papila caliciforme y si la serotonina regula la expresión del receptor 5-HT<sub>2B</sub>. Se utilizaron técnicas de RT y PCR para la identificación de la expresión de los receptores serotoninérgicos expresados en la papila caliciforme aislada de la lengua de embriones de rata de la cepa Wistar, a 15 y 17 días embrionarios, así como, en animales de 0, 7, 14, 21 y 60 días postnatales. Los resultados muestran la expresión del receptor 5-HT<sub>2B</sub> en todas las etapas del desarrollo de la papila caliciforme estudiadas, siendo la expresión mayor en las etapas prenatales. Mediante la inhibición reversible de la síntesis de serotonina, administrando DL-para-Clorofenilalanina (pCPA), se observa un incremento en la expresión del receptor 5-HT<sub>2B</sub> en todas las etapas estudiadas, así como una reducción en el número de corpúsculos gustativos y alteraciones morfológicas en la papila caliciforme de animales tratados con PCPA. Estos datos apoyan la hipótesis del papel trófico de serotonina sobre el desarrollo de la papila caliciforme.

## II.- ABSTRACT

The taste system is responsible for identifying sapid molecules contained in food and liquids that are ingested. The first element in the signal processing is a type of specialized cell called cell taste, which are grouped to form the taste buds, which in turn form the taste papillae. The taste papillae are classified its morphology underserved in fungiform, foliate and circumvallated. There are reports of the presence of serotonergic system inherent in the lingual epithelium. Serotonin among its many functions as a trophic factor during development, in relation whit the taste system, have show that serotonin neurons depolarized isolated as afferent nerve fibers, which innervate the taste buds, so as seen reduction in the permeability of Na and K in taste cells. This observation suggests which the serotonin participates actively in a detection and transmission of taste signaling. Has shown that rat adult circumvallated papillae expressed receptors 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2B</sub>, not currently known which serotonergic receptors are expressed in the development of taste system and which is the temporal profile of expression. So the aim of this study was determinate the expression of receptor 5-HT<sub>2B</sub> in the stages key of the development of circumvallated papillae and whether the serotonin regulated the expression of the receptor. Were used for RT and PCR techniques to determine the expression of the receptor 5-HT<sub>2B</sub> in isolate circumvallated papillae of rat of the strain Wistar in embryos of 15 and 17 days of gestation and in animals at 0, 7, 14, 21 and 60 days postnatal. our results show the expression of receptor in all stages studied in the animal control in the present study, being higher in the stages prenatal. By inhibiting the synthesis of serotonin, administering DL-para-chlorophenylalanine (PCPA), there is increased expression of receptor 5-HT<sub>2B</sub> at all stages studied, as well as, a diminution in the number of taste buds and morphological abnormalities in the papillae of animals treated with pCPA. These data support the hypothesis of the trophic role of serotonin in the developing circumvallated papillae.

### III.- INTRODUCCIÓN

#### III.1.- SISTEMA GUSTATIVO

Las sensaciones que son percibidas por los mamíferos son el resultado de la integración de la información percibida por los sistemas sensoriales en el sistema nervioso central. Los sistemas sensoriales con que cuentan los mamíferos son el sentido del tacto, de la vista, del oído, del olfato y gusto. Así pues, en la percepción de un sabor participa la vista al determinar si el alimento es agradable visualmente, el olfato participa en la elección del alimento detectando las moléculas odorantes presentes en el alimento, el tacto se encarga de la percepción de la astringencia y textura del alimento y finalmente el sentido del gusto identifica a las moléculas sápidas contenidas en los alimentos.

En la detección de las diversas modalidades gustativas participan en forma sinérgica el sentido del olfato y del gusto, la detección de las moléculas odorantes es llevada a cabo por las neuronas olfativas localizadas debajo del epitelio nasal, que se encuentra situado en la parte posterior de la cavidad nasal. En este lugar las moléculas odorantes que son liberadas durante la masticación de un alimento interactúan con las neuronas olfativas e inician la transducción de la señal olfativa. La información recolectada por las neuronas olfativas es enviada hacia el área especializada en el procesamiento de la información olfativa en la corteza cerebral, posteriormente la información es enviada a estructuras del sistema límbico que modulan los efectos emocionales de los olores (Stromann *et al.* 2009).

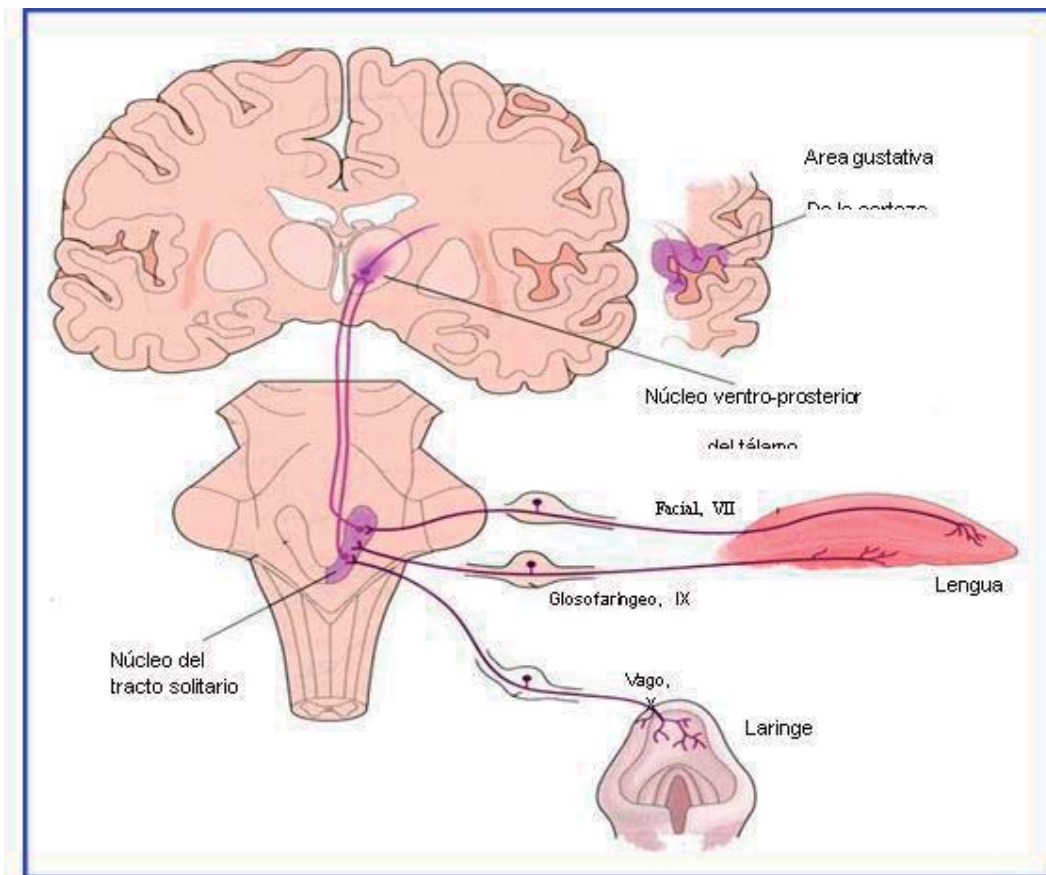
El papel que desempeña el sentido del gusto es de vital importancia en el mantenimiento del estatus de salud de los organismos, puesto que participa en la detección de posibles sustancias tóxicas contenidas en los alimentos y líquidos que son ingeridos, por ejemplo, la mayoría de las sustancias tóxicas en la naturaleza están asociadas a un gusto de tipo amargo, cabe hacer mención que existen sustancias amargas que son atractivas para los humanos como es

el caso del café. De forma similar, el sentido del gusto ayuda a determinar los alimentos ricos en energía al detectar los azúcares y cierto tipo de péptidos que son de carácter dulce, así mismo, discrimina alimentos altos en sales minerales y previene la ingestión de alimentos potencialmente peligrosos, los cuales han sido asociados a sabores de tipo ácido, pero al igual que ocurre con la modalidad amarga algunos alimentos de carácter ácido resultan atractivos para los humanos, como es el caso del limón.

El inicio de la transducción de la señal gustativa se presenta cuando las moléculas sápidas interactúan con un tipo de células especializadas, las cuales son llamadas células gustativas, estas se agrupan para formar corpúsculos gustativos, considerados como la unidad funcional del sistema gustativo. Estos corpúsculos a su vez forman las papilas gustativas las cuales están distribuidas a lo largo de la lengua y la parte alta de la faringe. Las papilas gustativas que se encuentran localizadas en la lengua se han clasificado atendiendo a su morfología en papilas caliciformes, papilas fungiformes y papilas foliadas (Zuker et al., 2006).

Una vez que las moléculas sápidas interactúan con las células gustativas se desencadena una serie de mecanismos moleculares que activan una red neuronal que se localiza en la lengua, el paladar y la faringe, esta red manda la información percibida a zonas específicas del sistema nervioso central donde es procesada la información. Los elementos que componen la red neuronal periférica son nervios provenientes de los pares craneales VII (facial), par craneal IX (glossofaríngeo) y par craneal X (vago) (Shiffman, 2000). Ciertos nervios implicados en la transmisión de las señales gustativas contienen fibras somatosensoriales, que establecen contacto sináptico en el epitelio lingual y en el tejido muscular que rodea a los corpúsculos gustativos, a estas fibras se les conoce como perigemales, a diferencia de las fibras que inervan a los corpúsculos que son llamados intergemales (Buck, 2000; Lindemann, 2001).

Todos los nervios que establecen sinapsis con las células gustativas convergen a nivel de la región dorsal del núcleo del tracto solitario, considerado como el primer punto de procesamiento de la señal gustativa. Posteriormente, la información se envía hacia el núcleo ventro-postero-medial del tálamo (Buck, 2000; Lindemann, 2001), que a su vez envía la información hacia la parte anterior del lóbulo cortical temporal, esta zona de la corteza es considerada como la zona de procesamiento final de la información gustativa, es donde finalmente toma lugar la percepción consciente del gusto (Guyton, 1996; Buck, 2000). De la misma manera las fibras perigemales convergen en el núcleo del tracto solitario; además, existe también un área cortical ubicada en la corteza orbitofrontal, que responde a diversas combinaciones de estímulos olfativos, visuales, gustativos y somatosensoriales, esta región podría representar el centro cerebral del sabor (fig. 1).



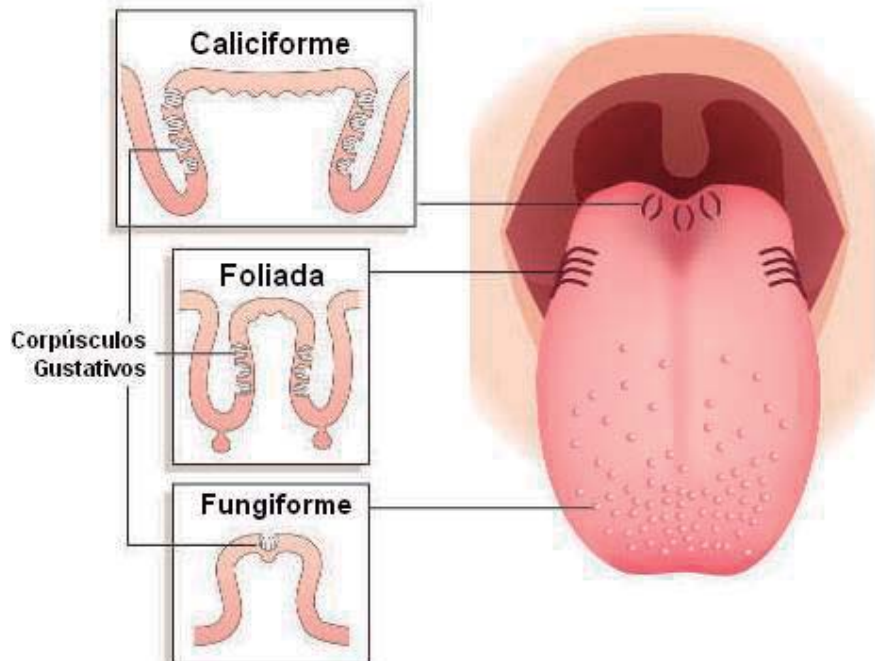
**Figura 1.** Neuroanatomía del sistema gustativo en mamíferos. Se muestran las redes neuronales implicadas en la percepción del sabor a nivel del epitelio lingual y la faringe.

### III.1.1.- PAPILAS GUSTATIVAS

Existen células especializadas en la detección de las moléculas sápidas, conocidas como células gustativas, estas células se agrupan en corpúsculos gustativos, que a su vez forman las papilas gustativas. Estas se encuentran distribuidas en zonas específicas del epitelio lingual y del epitelio del paladar (fig. 2). Se han clasificado, atendiendo su morfología, en papilas caliciformes, foliadas y fungiformes (Buck, 2000).

Las papilas fungiformes son las de menor tamaño presentando forma de hongo, se encuentran ubicadas preferencialmente en las dos terceras partes anteriores de la lengua, por lo general solo presentan un corpúsculo gustativo en roedores aproximadamente el 30% de los corpúsculos gustativos totales de las papilas gustativas están contenidos en las papilas fungiformes. La inervación de las papilas fungiformes es derivada del nervio facial, la cuerda del tímpano y el nervio petrosal (Sugita, 2006; Suzuki, 2007). Las papilas foliadas son de forma alargada, se encuentran ubicadas en la parte postero-lateral de la lengua, se ha descrito que las papilas foliadas llegan a contener decenas de corpúsculos gustativos teniendo un 30% del total de los corpúsculos, la inervación de las papilas foliadas proviene de fibras nerviosas que derivan del nervio glossofaríngeo (Suzuki, 2007).

Las papilas caliciformes son las de mayor tamaño se encuentran ubicadas en la parte posterior de la lengua, como su nombre lo menciona tienen forma de cáliz, pero también se les puede encontrar con el nombre de papilas circunvaladas o en forma de botón. En cuanto al número de papilas este es variable dependiendo de la especie, por ejemplo, en humanos puede haber de 9 a 12 papilas y en roedores existe solamente una. En general en todas las especies las papilas caliciformes contienen centenares de corpúsculos gustativos teniendo el 40% del total de los corpúsculos, las papilas caliciformes al igual que las papilas foliadas están inervadas por fibras nerviosas provenientes del nervio glossofaríngeo (Buck, 2000; Sugita, 2006; Suzuki, 2007).



**Figura 2.-** Esquema representativo de la localización de las papilas gustativas en el epitelio lingual (tomado de Zuker *et al.*, 2006).

### III.1.2.- CORPÚSCULOS GUSTATIVOS.

El corpúsculo gustativo es la unidad funcional del sistema gustativo periférico (fig. 3), así mismo, se ha descrito que el corpúsculo gustativo está integrado por un grupo especializado de células a las cuales se les conoce como células gustativas. se ha descrito que Este grupo de células se encuentra integrado por al menos cuatro tipos celulares diferentes, que al ser evaluadas por microscopia electrónica se clasificaron en células oscuras o de tipo I, células de bajo brillo o de tipo II, células intermedias o de tipo III y células Merkel o de tipo IV, actualmente tiene mayor aceptación nombrar a las células gustativas por el tipo, es decir, células de tipo I, II, III y IV, que por su densidad electrónica (Suzuki, 2007).

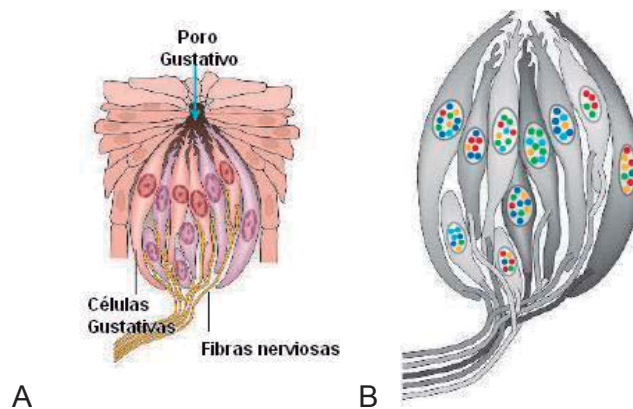
Las células gustativas trabajan en conjunto pero teniendo diversas funciones cada una, de tal manera que las células de tipo IV son denominadas células basales las cuales se observan en la parte inferior del corpúsculo y tienen forma redonda, tienen la función de dar origen a las demás células presentes



en el corpúsculo, es decir, las células basales son equivalentes a las células pluripotenciales que se encuentran en medula ósea (Buck, 2000).

Por otro lado las células de tipo I presentan una forma alargada, al igual que las células de tipo II y III. Se ha propuesto que las células de tipo I tienen la función de mantener la integridad del corpúsculo gustativo, es decir, dan sostén a las demás células y mantienen las condiciones osmóticas del medio (Miura et. al., 2006). Con respecto a las células de tipo II se propone que son las células que expresan los receptores para las diversas moléculas sápidas, así como expresan la maquinaria molecular para el inicio de la transducción de la señal gustativa (Roper, 2006; Suzuki, 2007).

Las células de tipo III, además de estar en contacto con las células de tipo II, establecen contacto sináptico con las fibras nerviosas aferentes y tienen la capacidad de almacenar y liberar neurotransmisores como el glutamato, la acetilcolina, adenosin trifosfato, adrenalina y serotonina. En las células de tipo III se ha reportado la expresión de receptores para serotonina como los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>3</sub> en ratas adultas (Herness et. al., 2004; Suzuki, 2007).



**Figura 3.-** Esquema representativo de un corpúsculo gustativo. (A) estructura funcional del corpúsculo, donde se observa el poro gustativo y las fibras nerviosas. (B) esquema propuesto para el orden de las células gustativas al interior del corpúsculo gustativo (tomado de Zuker *et al.*, 2006).

### III.1.3.- MECANISMO MOLECULAR DE LA DETECCIÓN DE LAS MODALIDADES GUSTATIVAS

El panorama general de la transducción de la señal gustativa inicia idealmente con la interacción de una molécula sávida con el receptor específico expresado en la célula de tipo II, luego esta se comunica con la célula de tipo III, mediante procesos que aun no están totalmente elucidados, la célula de tipo III libera neurotransmisores hacia la hendidura sináptica que son reconocidos por sus receptores específicos en la neurona postsináptica (Roper 2006). De esta forma la información gustativa es enviada hacia el núcleo del tracto solitario y después se distribuye en las zonas específicas de la corteza cerebral.

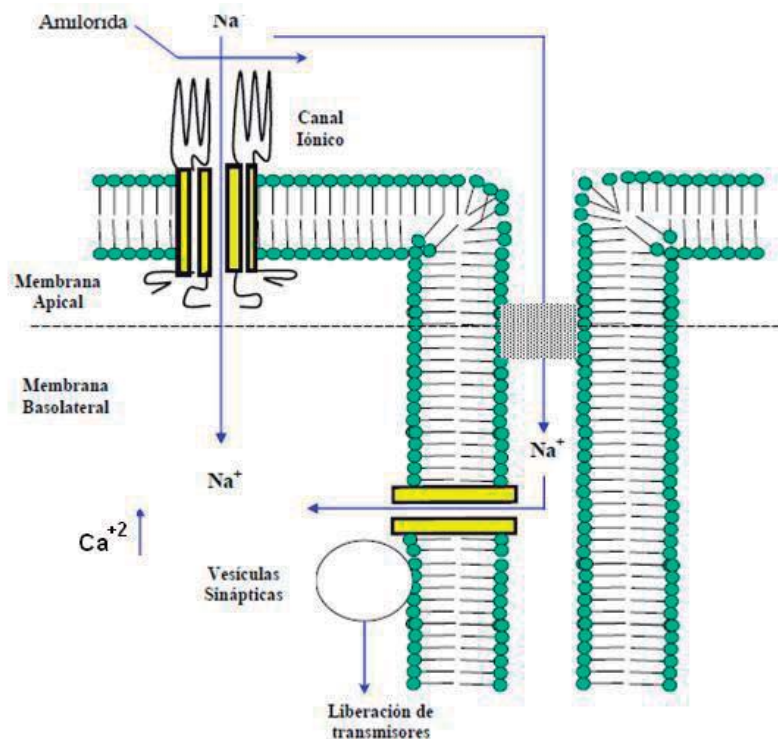
Regresando al interior del corpúsculo una vez que son liberados los neurotransmisores por las células de tipo III, en esta transducción de la señal las condiciones osmóticas al interior del corpúsculo cambian, existiendo un exceso de transmisores y cambios en la concentración de iones como  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , es necesario que estos metabolitos sean retirados del medio para evitar posibles daños celulares. Son las células de tipo I las encargadas de restablecer las condiciones osmóticas y también se encargan de recapturar los neurotransmisores que fueron liberados, restableciendo de esta manera las condiciones osmóticas (Roper 2006). Teniendo un panorama general de lo que pasa en relación a la transducción de la señal gustativa, a continuación se describen con más detalle los procesos anteriormente mencionados.

### MECANISMO MOLECULAR DE LA DETECCIÓN DE LA MODALIDAD SALADA Y ÁCIDA

Todos los vertebrados poseen la capacidad de reaccionar ante saborizantes salados y ácidos, cuando la estimulación es débil produce una sensación agradable, pero cuando se presenta una fuerte estimulación la sensación se vuelve repulsiva, en el caso de las modalidades salada y ácida los estudios actuales indican que la transducción de estas modalidades esta mediada por el ingreso de iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) en el caso de el gusto salado y iones hidrogeno

( $H^+$ ) para el caso del gusto ácido, a través de canales membranales ubicados en la parte apical de las células de tipo II (Zuker et al. 2006).

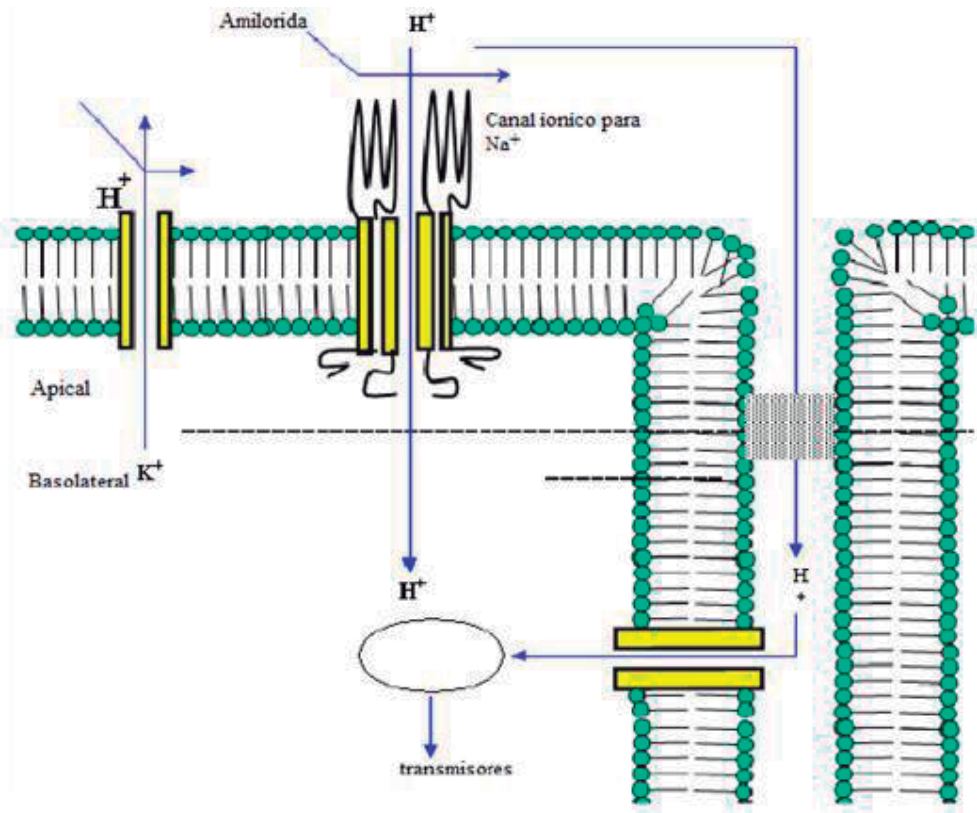
Para el caso del gusto salado (fig. 5), en roedores los iones  $Na^+$  interactúan con el canal sensible a la amilorida el cual es bloqueado por los iones  $Na^+$  produciendo incremento del calcio intracelular ( $Ca_i^{+2}$ ) y desencadenado la transducción de la señal de tipo salado (Lindemann, 2001). En humanos el canal sensible a la amilorida es expresado en forma menor que en los roedores, lo cual sugiere que por lo menos existe otro mecanismo en la transducción del gusto salado (Lindemann, 2001; Zuker et al. 2006).



**Figura 4.-** Mecanismo molecular propuesto para la detección del gusto salado, donde los iones  $Na^+$  bloquean los canales de amilorida, produciendo incremento en la concentración de  $Ca^{+2}$  y posteriormente la liberación de los transmisores.

Para el caso del gusto ácido (fig. 5) se han propuesto un amplio número de mecanismos y de receptores implicados, en la transducción de la señal, entre los cuales figuran canales sensibles a iones ácidos (ASICs), canales de potasio (K2P), canales de nucleótidos cíclicos (HCN) (Zuker *et al.* 2006) Actualmente se ha sugerido que los principales mediadores de la respuesta al gusto amargo son los canales de la enfermedad poliquística del riñón (PKD2L1), de forma

paralela no se ha descartado la posibilidad de que los  $H^+$  al modificar el pH extracelular de la célula de tipo II en la membrana basolateral inicie la transducción, cuando es inhibida la expresión del receptor PKD2L1 con el uso de la toxina diftérica, se pierde totalmente la percepción del sabor ácido, sin embargo, las percepción de las demás modalidades no se altera (Lindemann, 2001; Bradbury, 2004; Zuker et al., 2006).



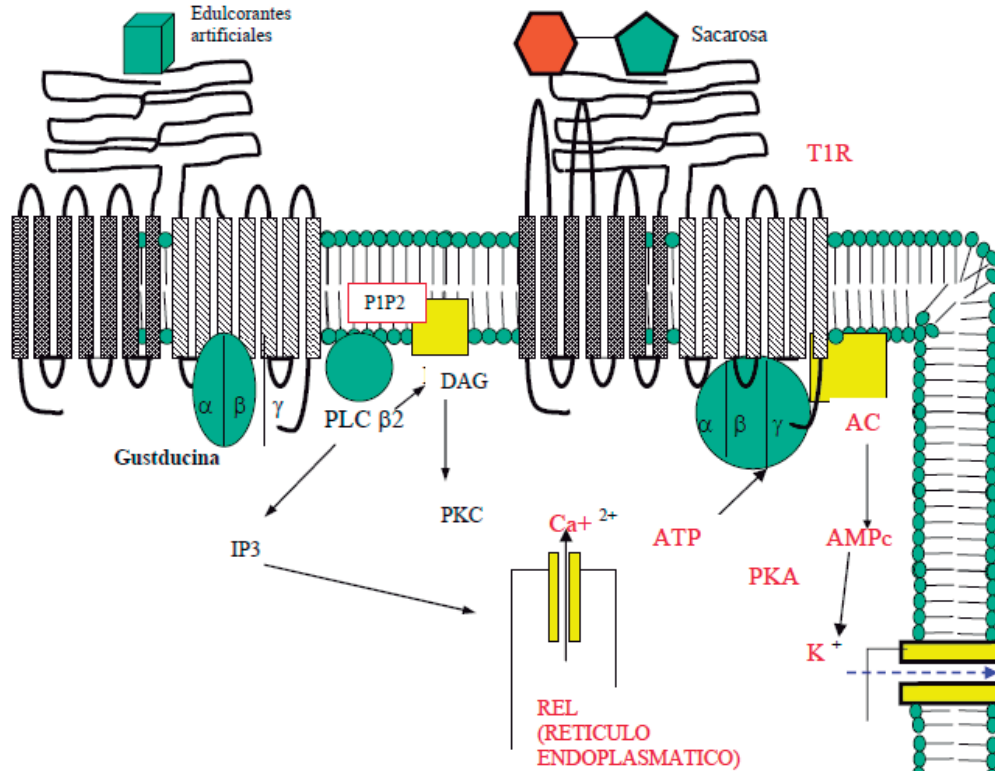
**Figura 5.-** Mecanismo propuesto para la transducción del gusto ácido donde los iones  $H^+$  bloquean los canales de  $K^+$ , produciendo la despolarización de la célula gustativa.

#### MECANISMO MOLECULAR DE LA DETECCIÓN DE LAS MODALIDADES DULCE Y UMAMI

La transducción del gusto dulce (fig. 6) es de vital importancia, sin dejar a un lado que las demás modalidades gustativas tienen la misma importancia, puesto que en los mamíferos ayuda a discriminar alimentos con alto contenido en energía en forma de carbohidratos. El inicio de la transducción está mediada a través de la activación de receptores acoplados a proteína G (GPCRs), denominados como la familia de receptores T1R; la cual está compuesta por

los subtipos T1R1, T1R2 y T1R3. Todos los miembros de la familia T1R presentan la característica de tener un extremo aminoterminal largo el cual está expuesto hacia el exterior de la célula sirve como sitio de unión y reconocimiento para los saborizantes de tipo dulce (Zuker et al. 2006; Montmayeur y Matsunami 2002). Se ha demostrado que los saborizantes de tipo dulce activan heterodímeros presentes en las células gustativas los cuales están conformados por la combinación T1R2 + T1R3 (Zuker et al. 2006). Este heterodímero ha mostrado la capacidad de responder a edulcorantes naturales, artificiales, D-aminoácidos y proteínas de carácter dulce (Sugita, 2006).

Al realizarse la unión de la molécula edulcorante con el heterodímero desencadena la señalización la cual inicia con la activación de la gustducina, generando la subsecuente activación de la fosfolipasa C $\beta$ 2 (PLC $\beta$ 2), la activación de la fosfolipasa propicia la hidrólisis del 4,5-bifosfo-fosfatidilinositol generando inositol trifosfato (IP $_3$ ) y diacilglicerol (DAG), para continuar con la transducción de la señal de tipo dulce se abren los canales iónicos transitorios del tipo TRPM 5 y de forma paralela el IP $_3$  incrementa la concentración intracelular de Ca $^{+2}$  al activar el canal de Ca $^{+2}$  regulado por IP $_3$  que se encuentra en el retículo endoplasmático liso (Zuker *et al.* 2006). Se ha demostrado que el modelo anterior es congruente, puesto que usando ratones K.O. para la fosfolipasa C $\beta$ 2 o para TRPM5, se presenta un déficit en la capacidad de distinguir las modalidades amarga, dulce y umami (Zuker *et al.* 2006).



**Figura 6.-** Mecanismos propuestos para la transducción del gusto dulce, en el caso de los edulcorantes artificiales la vía propuesta requiere la activación de la gustducina, posteriormente se incrementa la concentración de IP<sub>3</sub> lo cual trae como consecuencia el incremento de Ca<sup>2+</sup> produciendo así la liberación de los transmisores. En el caso de los azúcares, sacarosa, se presenta un incremento de la concentración de AMPc produciendo despolarización de la célula y liberación de los transmisores.

En el caso del gusto umami, es la modalidad más recientemente reconocida y fue descrita en Japón a principios del siglo XX, es generado por la presencia de sales de glutamato, principalmente por el L-glutamato monosódico, que es ampliamente utilizado en la cocina asiática, también es generado por algunos otros aminoácidos (aspartato) y por algunos péptidos. Se han sugerido varios tipos de receptores para la transducción del gusto umami, uno de ellos es una forma trunca en el extremo N-terminal del receptor metabotrópico glutamatérgico de tipo 4 (mGluR4t) (Lindemann, 2001).

Por otro lado usando un modelo de expresión in vitro se demostró que las células gustativas que responden a la estimulación con glutamato expresan el heterodímero T1R1 + T1R3, al realizar la inactivación para la expresión del heterodímero se elimina totalmente las respuestas celulares y conductuales



caracterizadas para la modalidad umami (Zuker et al., 2006), por tal motivo en la actualidad es aceptado que los receptores encargados de la detección de la modalidad umami es el heterodímero formado por los receptores T1R1 + T1R3.

En cuanto a la transducción del gusto umami se han propuesto dos vías, en la primer vía el receptor esta acoplado de forma negativa a la adenilato ciclasa, generando disminución del adenosín monofosfato cíclico (AMPc), la segunda vía postula la participación del la gustducina y la PLC $\beta$ 2. Ambas vías tienen como finalidad incrementar la concentración de Ca<sup>+2</sup> generando de este manera la transducción de la señal de la célula de tipo II a la de tipo III (Lindemann, 2001).

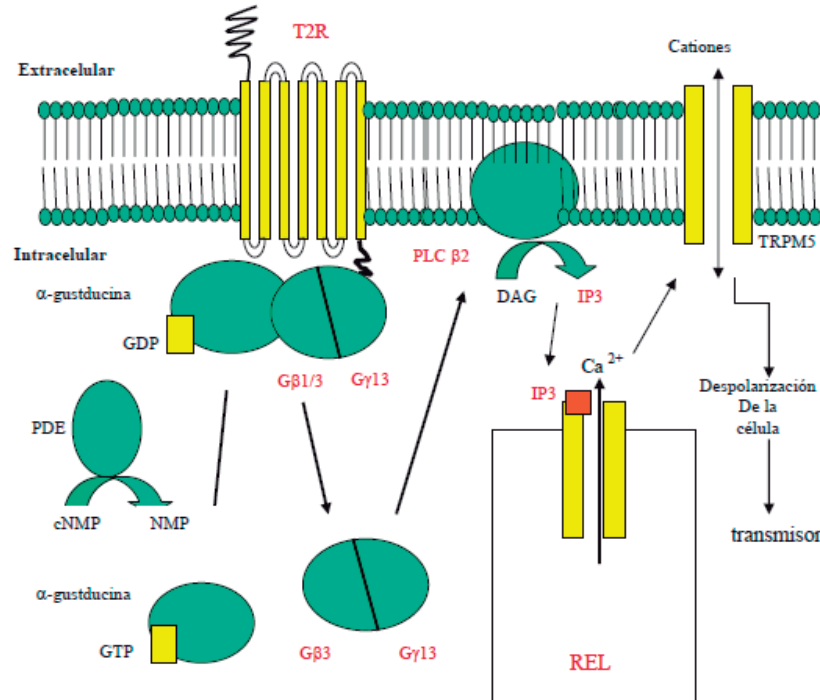
#### MECANISMO MOLECULAR DE LA DETECCIÓN DE LA MODALIDAD AMARGA.

La modalidad amarga se encarga de reconocer a las sustancias potencialmente toxicas, puesto que en la naturaleza la mayor parte de los venenos existentes presentan un gusto amargo, cabe aclarar que esta aseveración no es del todo válida puesto que existen moléculas de carácter amargo que para los humanos nos resulta sumamente agradable, como es el caso de la cafeína.

Los receptores que están implicados en la detección del gusto amargo son denominados como T2R la familia se encuentra compuesta de 40 a 80 diferentes tipos de receptores, dependiendo de la especie, todos los receptores de la familia T2R presentan en común un dominio amino-terminal corto el cual está expuesto hacia el exterior de la célula, el cual sirve como sitio de unión de las moléculas amargas (Parry *et al.*, 2004; Lindemann 2001; Chandrashekar, *et al.*, 2000).

El mecanismo por el cual se inicia la transducción del gusto amargo (fig. 7) es mediante la activación de la gustducina, incrementando la concentración intracelular de Ca<sup>+2</sup> (Parry *et al.*, 2004). Actualmente existe controversia en el mecanismo específico de la transducción del gusto amargo, puesto que se ha

demostrado que existen células de tipo II que expresan los receptores T2R pero no existe la coexpresión de la gustducina, y viceversa, esto ha llevado a plantear que existen otros mecanismos para la transducción del gusto amargo (Lindemann, 2001).



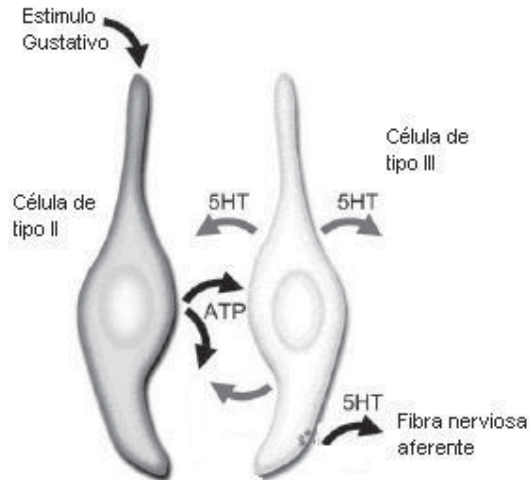
**Figura 7.-** Mecanismo propuesto para la detección del gusto amargo, la interacción entre la molécula sávida y el heterodímero activa la PLCβ<sub>2</sub>. Produciendo incremento en la concentración de IP<sub>3</sub> y la liberación de los transmisores.

### III.1.4.- COMUNICACIÓN CELULAR EN LOS CORPÚSCULOS GUSTATIVOS

Los corpúsculos gustativos están en constante actividad, reciben a las moléculas sápidas presentes en los alimentos y en la saliva que se encuentra en la boca, la información recolectada es enviada hacia el sistema nervioso central, de forma paralela, las células gustativas se comunican con las demás células del corpúsculo (Lindemann, 2001). El modelo actual de la comunicación de los corpúsculos gustativos propone que la célula de tipo II al realizar la unión del receptor con la molécula sávida, se desencadenan una serie de procesos que conducen a la célula gustativa de tipo II a comunicarse con la célula de tipo III (fig.8), la cual establece el contacto sináptico con las fibras nerviosas aferentes, para finalmente enviar la señal gustativa hacia el sistema nervioso



central. La comunicación entre la célula de tipo II y la célula de tipo III se ha propuesto que puede ser de tipo eléctrico mediante las denominadas gap junction o mediante la liberación de transmisores químicos (Roper, 2006).



**Figura 8.-** Modelo de comunicación entre las células gustativas de tipo II y tipo III, usando como mensajeros a la serotonina (5HT) y al ATP (tomado de Huang *et al.* 2009).

Los transmisores que se han propuesto tienen participación en la comunicación celular son el adenosin trifosfato (ATP) [Suzuki, 2007], la noradrenalina (NA), acetilcolina (ACh), glutamato y péptidos como la colecistoquinina (CCK), péptido vasoactivo intestinal (VIP) [Herness *et al.* 2002; Suzuki, 2007], de la misma manera se ha postulado la participación de la serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT). Al mismo tiempo que la célula de tipo III establece el contacto sináptico con las fibras nerviosas, las células de tipo I se encargan de restablecer el equilibrio osmótico al interior del corpúsculo gustativo, el escenario que plantea este mecanismo es mediante la expresión de diversos tipos de receptores los cuales pueden presentar función de receptores posinápticos o de autoreceptores (Roper, 2006; Huang *et al.* 2009).

### III.1.5.- RECAMBIO CELULAR EN EL CORPÚSCULO GUSTATIVO

Los procesos de linaje y recambio celular en el corpúsculo gustativo a nivel molecular no están del todo elucidados, mediante marcaje con bromo uridina y timidina radioactiva se ha descrito que las células gustativas tienen un tiempo de vida de 10 a 14 días (Miura *et al.*, 2006). Las células se diferencian a partir de las células basales (tipo IV), produciendo poblaciones heterogéneas en el corpúsculo gustativo (Roper, 2006). Actualmente se sugiere que las diversas células gustativas ya estén predeterminadas desde un inicio, es decir, las células de tipo I siempre serán de tipo I, las células de tipo II siempre serán células de tipo II (Miura *et al.*, 2006). Estas aseveraciones se han obtenido mediante el estudio de las células gustativas con técnicas de Inmunohistoquímica, por ejemplo: las células basales expresan proteínas de tipo Sonic hedgehog (Shh), las células de tipo II son inmunoreactivas para el receptor T1R3, así mismo las células de tipo III son inmunoreactivas para la proteína NCAM (Stone *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 2006).

Aunado a los datos anteriores, la inervación es fundamental para el mantenimiento de los corpúsculos gustativos, cuando se realiza una denervación los corpúsculos gustativos desaparecen a los 10 días y viceversa cuando se realiza una reinervación se presenta una regeneración de los corpúsculos gustativos. Lo anterior sugiere que los corpúsculos gustativos son mantenidos por medio de la secreción de factores tróficos provenientes de las fibras nerviosas, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (Hosley *et al.*, 1987).

### III.2.- DESARROLLO DEL SISTEMA GUSTATIVO

El desarrollo del sistema gustativo periférico en ratas inicia en etapas embrionarias tempranas y concluye en la etapa adulta, cuando es considerado un sistema gustativo funcional. Cronológicamente el inicio del desarrollo del sistema gustativo en la rata (tabla I) comienza entre el día embrionario 9.5 y 10 (E9.5-10) cuando se induce la formación de la placa epibranchial, en el periodo

comprendido entre E11 y E12.5 ocurre la delimitación de las estructuras que darán origen a la boca, tráquea, lengua, etc. seguida por un incremento en la división celular y el inicio del crecimiento axonal. En E13.5 aparece la lengua como una estructura reconocible (Krimm, 2007).

La inervación de la lengua se desarrolla de forma conjunta con su desarrollo cronológico, es decir, el crecimiento axonal y la delimitación de la lengua inician hacia E13.5 es en este día cuando los axones provenientes de los ganglios petrosal y genicular envían proyecciones neuronales hacia la lengua (Krimm 2006). Las estructuras primarias de las papilas fungiformes y caliciformes aparecen entre E14.5 y E15.5, seguidas por el establecimiento de la inervación, pero durante esta etapa se producen errores en los cuales algunas papilas fungiformes no son inervadas. Así mismo, existen zonas donde no están presentes papilas fungiformes pero se presenta inervación, en E19 la inervación en la lengua presenta una morfología similar a la edad adulta. Posteriormente se presenta un reordenamiento de la inervación en el día postnatal 25, teniendo ya la inervación definitiva (Krimm, 2007; Lopez and Krimm, 2006).

Hacia E16.5 aparece el total de papilas fungiformes, el desarrollo de la lengua continua durante el resto de la gestación diferenciándose el epitelio lingual de la misma manera se presenta la diferenciación y delimitación de las papilas filiformes, que son las encargadas de percibir estímulos de tipo somatosensoriales como temperatura, astringencia, presión, entre otros. Los primeros contactos sinápticos entre las neuronas del núcleo del tracto solitario y las fibras nerviosas provenientes de la lengua se presentan hacia E17 y las primeras vesículas presinápticas se observan en E19 (Zhang *et al.*, 2001). El inicio de la diferenciación de los corpúsculos gustativos se presenta hacia E20.5, cuando las células gustativas son inmunoreactivas para la gustducina, pero el corpúsculo gustativo es funcional hasta después del nacimiento, los poros gustativos aparecen en los primeros días de vida. Finalmente en la etapa adulta se tiene el número total corpúsculos gustativos (Krimm, 2007).

Tabla I.- Desarrollo cronológico del sistema gustativo periférico en rata (Tomado de Krimm 2007).

E9.5-10	E11-12	E13.5	E14.5-15.5
Inducción de la placa epibranchial.	Delimitación de las estructuras primarias de la boca, faringe, tráquea.	Aparición de la lengua.	Aparecen las estructuras primarias de las papilas fungiformes y caliciforme.
E16.5	E20.5	Posnatal	Adulto
Se presenta el total de las papilas fungiformes.	Inicia la diferenciación de los corpúsculos gustativos.	Apertura de los poros gustativos.	Número total de corpúsculos gustativos.

### III.3.- FACTORES MOLECULARES QUE PARTICIPAN EN EL DESARROLLO DEL SISTEMA GUSTATIVO PERIFÉRICO.

El desarrollo del sistema gustativo es orquestado por un número considerable de factores moleculares los cuales presentan diferentes perfiles de expresión temporal, estos le permiten a las células, incluidas las neuronas, migrar hasta establecerse de forma definitiva. Algunas las moléculas presentan características de factor trófico y de forma por demás interesante algunos de los factores moleculares que participan en el desarrollo del sistema nervioso central, también están involucrados en el desarrollo del sistema gustativo (Krimm, 2007). Durante el desarrollo de los ganglios genicular y petrosal se expresan los factores de transcripción Six<sup>1/2</sup>, Six<sup>4/5</sup> y Eya1, cuando se bloquea la expresión de estos factores conduce a un desarrollo anormal (Zou *et al.* 2004). En el caso de Eya1 la alteración produce inicialmente un estado de arresto celular y posteriormente conduce a apoptosis (Zou *et al.*, 2004; Krimm, 2007). A diferencia de los efectos causados por el bloqueo de la expresión de los factores de tipo Eya, los efectos causados por mutaciones o bloqueo de la expresión de los factores de tipo Six presentan una menor intensidad en la alteración, disminuyendo la proliferación celular (Zou *et al.*, 2004).

Los neuroblastos presentes en los ganglios genicular y petrosal inician su diferenciación, migración y establecimiento bajo el control de factores transcripcionales como la neurogenina 2 (Ngn2), cuando se bloquea la acción de Ngn2 se observa que la delimitación y migración de los ganglios falla (Xu *et al.*, 2004). Adicionalmente se expresan moléculas señaladoras como la proteína morfogénica de hueso (BMP) específicamente BMP7 la cual participa activamente en la formación de la placa epibranquial. Además de BMP7 se ha reportado la presencia del factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT3) y neurotrofina 4 (NT4/5) (Krimm, 2007).

A Pesar de que se conocen los eventos de desarrollo del sistema gustativo existe poca información sobre la dependencia que tiene el desarrollo del sistema gustativo con los factores moleculares, puesto que existen poblaciones de neuronas que son dependientes de uno o más factores, es decir, existen poblaciones de neuronas que son exclusivamente dependientes de BDNF, otras neuronas son exclusivamente dependientes de NT3 o NT4, pero existen poblaciones de neuronas las cuales son dependientes tanto de BDFN y de NT4 (Krimm, 2007, Zou *et al.*, 2004). Otra molécula que recientemente se ha propuesto que participa en el desarrollo del sistema gustativo periférico es la 5-Hidroxitriptamina (5-HT o serotonina) [Ortiz *et al.*, 2006].

### III.4.-SEROTONINA

#### III.4.1.- SISTEMA SEROTONINÉRGICO.

La serotonina (5-Hidroxitriptamina o 5-HT) es un neurotransmisor que participa en los mamíferos en la regulación de múltiples funciones esenciales, actuando a nivel del SNC en la regulación de los ciclos de sueño y vigilia, conducta alimenticia, conducta sexual, sistema de termorregulación. Así mismo se ha asociado a procesos de ansiedad, depresión e hiperactividad, cuando la regulación endógena falla. Se ha demostrado su participación en procesos de aprendizaje y memoria (Cook *et al.*, 2000). En los sistemas periféricos participa activamente en la regulación de los movimientos peristálticos del intestino delgado, así como también participa en la homeostasis primaria, además de regular el tono vascular (Cook *et al.*, 2000). El nombre de serotonina fue dado por Page al describir que esta molécula se encuentra presente en las plaquetas y al ser liberada produce reducción de la luz de los vasos sanguíneos (Page, 1976).

#### III.4.2.- SÍNTESIS.

La 5-HT está presente tanto en vertebrados como en invertebrados. En mamíferos la síntesis de serotonina es llevada solamente en las células enterocromafines del intestino y a nivel del sistema nervioso central en las neuronas serotoninérgicas que se encuentran ubicadas en los núcleos del Rafe. El precursor inicial de la serotonina es el aminoácido esencial L-triptófano, la serotonina es sintetizada en un proceso que requiere de dos etapas (fig. 9):

1. La hidroxilación del L-triptófano a 5-hidroxitriptófano, esta reacción es llevada a cabo por la triptófano-5-hidroxilasa (TPH), esta reacción es la reacción limitante de la vía serotoninérgica. De la TPH se han descrito dos isoformas la TPH1 y TPH2 (Walther, 2009).

2. La segunda reacción es la descarboxilación del 5-hidroxitriptófano para generar la 5-hidroxitriptamina o serotonina, esta reacción es llevada a cabo por la descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos (MAO A), la MAO se comparte en la biosíntesis de la serotonina y la vía de biosíntesis de las catecolaminas (Noradrenalina y Adrenalina).

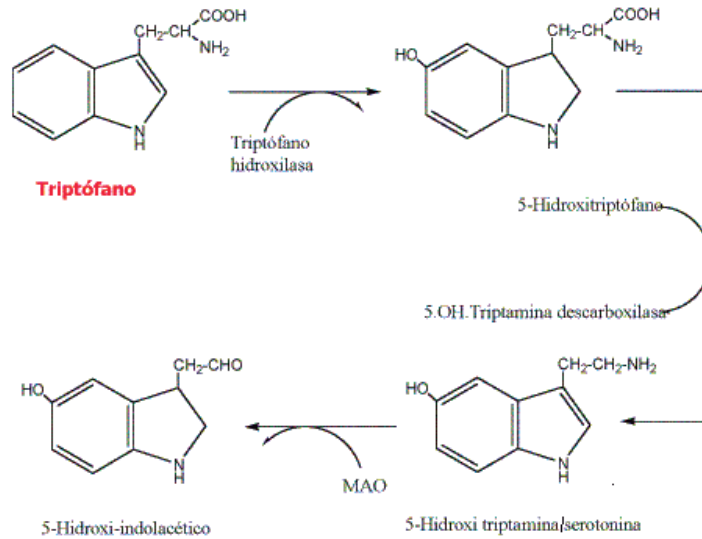


Figura 9.- Esquema de la biosíntesis de la serotonina.

La serotonina liberada al espacio sináptico activa a los diferentes receptores serotoninérgicos; se conoce que existen varios mecanismos para mantener en equilibrio la concentración de serotonina en el espacio sináptico, uno de ellos es la recaptura del neurotransmisor por la proteína transportadora de serotonina (SERT o 5-HTT), posteriormente la serotonina puede seguir dos caminos, uno es la descarboxilación oxidativa, por la monoamino oxidasa A (MAO A) para formar el ácido 5-hidroxiindolacético y el otro camino es ser reciclada y almacenada en vesículas para posteriormente ser liberada de nuevo (Walther *et al.*, 2009).

En los mamíferos la síntesis de serotonina se realiza en dos sitios anatómicos, a nivel periférico en las células enterocromafines del intestino, donde se sintetiza el 90% de la serotonina del organismo y a nivel del sistema nervioso central en las neuronas serotoninérgicas ubicadas en los núcleos de Rafe,

donde es sintetizado el 10%. La principal diferencia entre los dos sistemas serotoninérgicos es la isoforma de la TPH que es expresada, en el sistema serotoninérgico periférico se expresa la TPH1 y en el sistema serotoninérgico central es expresada la TPH2. Así mismo entre las isoformas de TPH existen diferencias en lo que respecta a sus parámetros enzimáticos como la constante de Michaelis (Km) y la velocidad máxima de reacción (Vmax) (Walther *et al.*, 2009).

Los neurotransmisores y los neuromoduladores al igual que las hormonas actúan mediante la activación de sus receptores específicos. Estos receptores son proteínas que están insertas en las membranas celulares. Todas las neuronas y en general todas las células tienen por lo menos un tipo de receptor presente en su membrana, de la variedad de los receptores presentes dependerá la respuesta a diversos estímulos (Lodish *et al.*, 2005). En la naturaleza y de forma sintética existen moléculas que tienen la capacidad de imitar la acción del neurotransmisor endógeno, con una cinética enzimática muy parecida por tener una estructura similar a la molécula endógena, a estas moléculas se les denomina agonistas. Pero también existen moléculas capaces de bloquear los efectos de la molécula endógena, los cuales presentan afinidad por el receptor, se unen al receptor pero no desencadenan los efectos, a estas moléculas se les llama antagonistas (Gilman *et al.*, 1996).

La serotonina actúa a través de sus receptores específicos, los cuales han sido denominados genéricamente como receptores serotoninérgicos, a través estudios farmacológicos mediante agonistas y antagonistas serotoninérgicos y con estudios bioquímicos, fisiológicos y de biología molecular se han admitido a la fecha 7 familias de receptores serotoninérgicos y 15 subtipos (Ponimaskin *et al.*, 2003; Varnäs, 2005). Los receptores serotoninérgicos pueden ser del tipo canal iónico o acoplado a cascadas de segundos mensajeros. En la tabla 1 se muestra la clasificación y algunas de las características de los receptores serotoninérgicos.



Tabla 2.- Clasificación de los receptores serotoninérgicos.

Receptor	Tipo de señalización	Expresión (SNC)
5-HT <sub>1A</sub>	AC (-)	Corteza/ Hipocampo
5-HT <sub>1B</sub>	AC (-)	Corteza
5-HT <sub>1D</sub>	AC (-)	Ganglio basal
5-HT <sub>1E</sub>	AC (-)	Corteza/ Hipocampo
5-HT <sub>1F</sub>	AC (-)	Corteza/ Hipocampo
5-HT <sub>2A</sub>	PLC (+)	Zonas corticales
5-HT <sub>2B</sub>	PLC (+)	Cerebelo/ Hipotálamo
5-HT <sub>2C</sub>	PLC (+)	Plexo coroideo/ Hipocampo
5-HT <sub>3</sub>	Canal iónico	Núcleo del tracto solitario
5-HT <sub>4</sub>	AC (+)	Hipocampo
5-HT <sub>5A</sub>	AC (-)	Corteza/ Cerebelo
5-HT <sub>6</sub>	AC (+)	Corteza
5-HT <sub>7</sub>	AC (+)	Hipocampo/ Hipotálamo

AC = Adenilato ciclasa; PLC = Fosfolipasa C (Modificado de Varnäs, 2005).

La familia de los receptores 5-HT<sub>2</sub> está compuesta por tres subtipos 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>, la familia comparte la característica de estar acoplados a cascadas de segundos mensajeros, al unir la serotonina todos activan a la PLC (Varnäs, 2005). Específicamente el receptor 5-HT<sub>2B</sub> en el SNC se expresa en cerebelo y en el Hipocampo, pero a nivel periférico es expresado en el intestino, corazón y estomago (Fiorica-Howells, *et al.*, 2000; Negbil, *et al.*, 2000; Choi y Morateaux, 1996).

### III.4.3.- PARTICIPACIÓN DE LA SEROTONINA EN PROCESOS DE DESARROLLO.

Aunado a las funciones que ya se comentaron de la serotonina, también se ha reportado su acción como factor trófico, ya que ha sido detectada durante la división de cigoto, gastrulación y neurogénesis de los embriones de pollo, erizo de mar y rana. La presencia de la serotonina y algunos de sus receptores durante el desarrollo embrionario, aunado a la capacidad para interferir con el desarrollo que tienen algunos agentes farmacológicos específicos para la serotonina, sugiere que embriones primitivos usan serotonina para regular la proliferación celular y/o movimientos morfogénicos (Lauder, 1988; Colas *et al.*, 1999).

Se conoce que en mamíferos la 5-HT está presente en etapas tempranas del desarrollo cerebral, a los 12 días de gestación aparecen células con fenotipo serotoninérgico en el cerebro de fetos de rata (Fujimiya *et al.*, 1986). Mediante la administración de L-triptófano se demostró incremento en la actividad de la TPH2 en cerebro fetal de rata de 15 días de gestación (Chagoya y Hernández, 1983). De forma complementaria se reportó que al agregar 5-HT a cultivos neuronales se presenta un efecto inhibitorio en la movilidad de los conos de crecimiento axonal y a la par se presenta la formación de la sinapsis (Haydon *et al.* 1984). Mediante el uso de técnicas de unión a ligando específico e inmunohistoquímica se pone de manifiesto que en los conos de crecimiento axonal existe la presencia de receptores serotoninérgicos, sistema de transporte y liberación de la 5-HT dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  al día 17 de gestación en la rata, sugiriendo la presencia de un sistema serotoninérgico funcional inherente a los conos de crecimiento axonal en los fetos de rata (Mercado y Hernández, 1992). Actualmente se sabe que el receptor 5-HT<sub>1A</sub> es esencial para el desarrollo de la corteza cerebral, así mismo, se encuentra presente en los conos de crecimiento axonal donde se relaciona con la axogénesis y la sinaptogénesis (Mercado y Hernández, 1992; Manjarrez *et al.*, 2003).

Usando técnicas de biología molecular, como es la reacción de retro-transcripción (RT) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se documenta que los receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub> presentan diferentes perfiles de expresión en las neuronas motoras del tallo cerebral, teniendo que en los días próximos al nacimiento solo se expresan los receptores 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>2B</sub>, posterior a la primer semana de vida existe reducción de la expresión de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>2A</sub>, pero se expresa mayoritariamente el receptor 5-HT<sub>2A</sub>, posterior a los 21 días postnatales ya se presenta una coexpresión de los receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>. Estos cambios en la expresión de los receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub> están relacionada con los cambios en la conducta alimenticia del animal (Volgin *et al.*, 2003).

Mediante la administración de para-Cloro-Fenilalanina (PCPA) la cual es inhibidor de la síntesis de 5-HT se ha puesto de manifiesto la participación de la 5-HT en los procesos de desarrollo de la corteza cerebral, específicamente se observa alteraciones en la migración y diferenciación neuronal, trayendo como resultado reducción en las proyecciones piramidales y reducción en la longitud de las dendritas en las capas III y V de la corteza somatosensorial de la rata. El mecanismo de acción de la PCPA es interferir con la traducción del RNA mensajero que codifica para la THP, en la cadena polipeptídica se integra PCPA en lugar de fenilalanina (Vitalis *et al.*, 2007). Se ha reportado disminución en la reacción de inmovilidad audiogénica, así como disminución en la locomoción en ratas recién nacidas administradas con 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT) vía intracisternal, La 5,7-DHT es un neurotóxico específico para neuronas serotoninérgicas (Hard *et al.*, 1983). Estos datos ayudan para entender el papel de la 5-HT en diversos procesos conductuales.

Además de la participación de la 5-HT en los procesos de diferenciación a nivel del sistema nervioso central, se ha descrito que la 5-HT participa ampliamente en los procesos de diferenciación y morfogénesis en sistemas periféricos, como es el caso del corazón e intestino. El receptor 5-HT<sub>2B</sub> es requerido para el desarrollo del corazón puesto que cuando se realizó un ratón Knockout (K.O.) para este receptor se presenta una alta tasa de mortalidad en las etapas embrionarias y neonatales, asociadas a defectos cardiacos, específicamente,

se presenta una reducción de la trabecula acompañada de una reducción en los niveles de expresión del receptor para tirosincinasa los resultados anteriores sugieren que el receptor 5-HT<sub>2B</sub> esta acoplado a la vía de la tirosina cinasa para la diferenciación en el tejido cardiaco. En los animales K.O. que sobrevivieron a la gestación se presento a nivel histológico que los miocitos estaban desorganizados, así como, una dilatación ventricular (Nabigil *et al.*, 2000). Se ha reportado que en pacientes con síndrome carcinoideas cardiacos, presentan una mayor producción de serotonina la cual produce enfermedades valvulares cardiacas (Dessap *et al.*, 2008) al generar un ratón K.O. para el transportador de serotonina (5-HTT) observan en los ratones 5-HTT K.O. una marcada hiperplasia valvular y fibrosis prominente en estudios histológicos. Mediante ecografía se revela un incremento en el diámetro del lumen del ventrículo los resultados anteriores vinculan directamente a la 5-HT con el desarrollo de fibrosis cardiaca y valvulopatía (Nabigil *et al.*, 2000).

En lo referente a la participación de la 5-HT en el desarrollo del intestino se ha puesto en evidencia que la serotonina promueve la diferenciación de las neuronas entéricas en embriones de rata, al administrar agonistas para los receptores 5-HT<sub>2</sub> se presenta incremento en la diferenciación de neuronas entéricas (Fiorica-Howells *et al.*, 2000), de forma paralela al administrar antagonistas de los receptores 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub> disminuye la diferenciación. Los datos anteriores sugieren que la serotonina participa en los procesos de desarrollo del intestino mediante la activación de los receptores 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub>. (Fiorica-Howells *et al.*, 2000).

#### III.4.4.- SEROTONINA Y SISTEMA GUSTATIVO.

La serotonina es el neurotransmisor más ampliamente estudiado en los procesos de señalización gustativa, se ha puesto de manifiesto que la 5-HT está presente en los corpúsculos gustativos de diversas especies como en el ajolote, ratón, rata, conejo y mono, en la cuales se ha demostrado que las células basales y las células de tipo III presentan la capacidad de almacenar y liberar serotonina (Nada and Hirato, 1975; Fujimoto *et al.*, 1987; Kim and Roper, 1995; Yee *et al.*, 2001; Nagai *et al.*, 1998; Zancanaro, *et al.*, 1995).

Mediante el empleo de técnicas de biología molecular se ha desmotado la expresión del transportador para serotonina (5-HTT) en células gustativas de rata (Ren et al., 1999). Específicamente en la rata se demostró la expresión de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> expresado en células gustativas y 5-HT<sub>3</sub> expresado en fibras nerviosas afrentes (Herness *et al.*, 2004). Estas evidencias han llevado a asociar la transducción de la señal gustativa con la serotonina, ya sea mediante mecanismos de comunicación convencional o mediante comunicación paracrina (Roper, 2006).

En humanos se ha asociado a la 5-HT en la transducción de las modalidades amarga y dulce, puesto que al administrar inhibidores del 5-HTT se observa reducción en los umbrales de detección para las modalidades dulce y amarga (Heath et al., 2006). Así mismo se ha reportado que en pacientes con depresión sufren trastornos en la percepción de los sabores, en general los pacientes con depresión y/o anorexia refieren que los alimentos tienen un sabor desagradable, así mismo los pacientes con ansiedad sufren de trastornos en la percepción del los sabores (Kaye *et al.*, 2009).

Nuestro grupo de investigación ha puesto en evidencia la expresión de las dos isoformas de la TPH durante etapas clave del desarrollo de la papila caliciforme en el ratón, mediante PCR cuantitativa se puso de manifiesto que la TPH2 presenta un perfil de expresión mayor que la TPH1 en las etapas estudiadas (15 y 17 días de gestación y recién nacido), al realizar inmunohistoquímica para la TPH se observa que en las etapas prenatales la enzima se localiza en las células gustativas, pero al nacimiento la TPH se localiza en las fibras nerviosas y en el tejido epitelial que rodea a la papila (Ortiz et al., 2006). El hallazgo de la expresión de la TPH conduce a pensar que la serotonina participa en los procesos de desarrollo de la papila caliciforme, mediante la activación de receptores serotoninérgicos específicos.

Hasta el momento no se conoce que tipos de receptores serotoninérgicos se expresan durante el desarrollo de la papila caliciforme, así como, tampoco se conoce el perfil de expresión que presentan estos receptores. En base a la evidencia de la participación de la serotonina como factor trófico y al papel que

tiene el receptor 5-HT<sub>2B</sub> en los procesos de desarrollo y diferenciación celular, pensamos que el receptor 5-HT<sub>2B</sub> puede estar presente durante el desarrollo de la papila caliciforme y que la serotonina modula su expresión, por el cual planteamos la siguiente:

#### **IV.- HIPÓTESIS.**

Durante la Neurontogenia del receptor 5-HT<sub>2B</sub> la serotonina modula su expresión y el número de corpúsculos gustativos en la papila caliciforme de la rata.

#### **V.- OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar el efecto de la inhibición de la síntesis de serotonina, sobre la expresión del receptor 5-HT<sub>2B</sub> y el número de corpúsculos gustativos durante el desarrollo de la papila caliciforme de la rata.

#### **VI.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Determinar la expresión del receptor 5-HT<sub>2B</sub> durante el desarrollo de la papila caliciforme en ratas control.
2. Evaluar el efecto de la inhibición de la síntesis de serotonina sobre la expresión del receptor 5-HT<sub>2B</sub> en la papila caliciforme de la rata.
3. Evaluar el efecto de la inhibición de la síntesis de serotonina sobre el número de corpúsculos gustativos durante el desarrollo de la papila caliciforme.
4. Evaluar el efecto de la inhibición de la síntesis de serotonina sobre la morfología de la papila caliciforme.

## VII.- MATERIALES Y MÉTODOS.

### VII.1.- ANIMALES.

En el presente trabajo se seleccionaron ratas hembras nulíparas de la cepa Wistar con un peso de  $200 \pm 20$  g de peso, las cuales fueron mantenidas en el bioterio de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, siguiendo los protocolos vigentes para el uso de animales de investigación. Con alimento comercial Purina Chow y agua ad-libitum, ciclos de luz y oscuridad de 12 h (7-19 h), temperatura promedio de 24° C y humedad relativa de 50%. Al término del periodo de adaptación las ratas fueron apareadas con ratas macho, se vigilo la aparición del tapón vaginal, este día se consideró como día embrionario 0 (E0). El día de nacimiento de las crías se considero como día posnatal 0 (P0).

### VII.2.- TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO.

La administración de la para-clorofenilalanina (PCPA) con fines de inhibición de la síntesis de serotonina de forma reversible ha sido empleada desde la década de los 70's, el primer modelo implementado se uso con fin de describir la participación de la 5-HT en la gestación de la rata (Moore y Hampton, 1974). Recientemente en el 2007 se administró la PCPA para evaluar el efecto que tiene la inhibición de la síntesis de 5-HT en el desarrollo de la corteza cerebral (Vitalis *et al.*, 2007). Por nuestra parte decidimos emplear el mismo esquema de administración que se uso para evaluar los efectos de la inhibición de 5-HT en el desarrollo de la corteza cerebral, brevemente es el siguiente.

A los 12.0 días de gestación al grupo de ratas en tratamiento, se les administró una dosis inicial de 300 mg/kg de peso corporal de PCPA (clorhidrato de 4-cloro-DL-fenilalanina metil ester, SIGMA) disuelta en buffer salino de fosfatos a pH 7.4, con un volumen no mayor de 0.3 mL por vía intraperitoneal, posteriormente se administro una dosis diaria de 100 mg/kg del día 13.0 al 17.0 de gestación. Al grupo control se le administró el vehículo siguiendo el



esquema mencionado anteriormente, el esquema anterior fue repetido tres veces.

### VII.3.- OBTENCIÓN DE LAS PAPILAS CALICIFORMES

En el presente trabajo se utilizó la papila caliciforme, la cual se obtuvo a partir de dos etapas: la etapa embrionaria a los 15 (E15) y 17 (E17) días de gestación y la etapa posnatal la cual comprendió el día postnatal 0 (P0), 7 (P7), 14 (P14), 21 (P21) y 60 (P60). En el caso de las muestras para las etapas embrionarias (E15 y E17), las ratas gestantes fueron anestesiadas con pentobarbital sódico en dosis de 40 mg/Kg de peso, administrado vía intraperitoneal. Posteriormente se realizó cesárea para obtener los fetos, los cuales fueron colocados en buffer salino de fosfatos (PBS) a pH 7.4 y mantenidos en placa fría. Posteriormente se realizó disección de la papila caliciforme de los fetos. Para las etapas postnatales de P0 a P60, los animales fueron sacrificados mediante decapitación y se procedió a realizar disección de la lengua, la cual se colocó en solución PBS fría. Posteriormente se realizó la disección de la papila caliciforme sobre hielo. En el caso de las muestras para RT y PCR se realizó una mezcla de mínimo tres papilas por etapa y para el caso del conteo de corpúsculos gustativos se analizaron mínimo tres papilas por etapa.

### VII.4.- EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

Los ácidos nucleicos fueron extraídos mediante el método de fenol-cloroformo con el reactivo TRI Reagent (SIGMA), se aisló el RNA total siguiendo las recomendaciones, el procedimiento fue el siguiente: se procedió a homogeneizar aproximadamente 100 mg de tejido en 500  $\mu$ L de TRI Reagent, posteriormente se centrifugó con cloroformo y se recuperó la fase superior la cual fue mezclada con isopropanol lo que produjo que los ácidos nucleicos precipitaran. Posteriormente mediante centrifugación se formó una pastilla en el fondo del tubo, a continuación se lavó la pastilla con etanol y se resuspendió en agua estéril y libre de nucleasas. Posteriormente el RNA total fue tratado con DNasa para eliminar el DNA genómico residual. Seguido del tratamiento con

DNAsa se realizo la cuantificación de RNA total por medio de la medición de absorbencia a 260 nm, de manera paralela se realizo el análisis de pureza mediante el coeficiente 260/280. Cuando el coeficiente 260/280 fue mayor o igual de 1.7 se considero que el RNA era de alta pureza. Para el análisis de integridad del RNA se realizó electroforesis en gel de agarosa en condiciones nativas, se determino que el RNA total se encontraba en buenas condiciones cuando se observan las bandas correspondientes a los RNA ribosomales.

### VII.5.- REACCIÓN DE RETRO-TRANSCRIPCIÓN (RT)

Una vez que se determinó que el RNA fuera de alta pureza se procedió a realizar la reacción de RT mediante el kit M-MLV transcriptasa reversa (SIGMA). Esta reacción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, paralelamente se realizaron controles negativos, en los cuales las condiciones de reacción fueron idénticas a los controles positivos, pero no se adiciono la enzima transcriptasa reversa a la reacción. Con el fin de disminuir la variación debía a la cantidad de RNA mensajero presente en cada muestra en el presente estudio se procedió a colocar 10 µg de RNA total por reacción positiva y de forma similar en los tubos de reacción negativa, en la tabla 2 se muestran las condiciones de reacción para el control positivo y negativo.

Tabla 3.- Condiciones de reacción para la RT.

	Control positivo	Control negativo
RNA Total	cbp 10 µg	cbp 10 µg
Oligo de T [1mM]	1.0 µl	1.0 µl
H <sub>2</sub> O	cbp 16 µl	cbp 17 µl
	70°C x 10 minutos	70°C x 10 minutos
dNTP's [5mM]	2.0 µl	2.0 µl
Buffer 10X	2.0 µl	2.0 µl
Enzima	1.0 µl	-----
	37°C x 1 h	37°C x 1 h
Vol. Final.	20 µl	20 µl

cbp: Cuanto baste para.

## VII.6.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

El DNA complementario obtenido de la reacción de RT fue usado como molde para la amplificación de las secuencias de interés del receptor 5-HT<sub>2B</sub> y para el gen de β-actina la cual fue tomada como gen de referencia. La reacción fue realizada siguiendo las recomendaciones del fabricante del Kit para PCR (SIGMA), usando oligonucleótidos específicos para el receptor 5-HT<sub>2B</sub> y para la β-actina, en todos los experimentos se realizó el control positivo partiendo de los productos de reacción de RT positiva, de forma paralela se realizó en control negativo partiendo de los productos de reacción de RT negativa. La secuencia de los oligonucleótidos se muestra en la tabla 4, la tabla 5 muestra las condiciones de reacción para la PCR y los volúmenes usados para la PCR se presentan en la tabla 6. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos para el receptor 5-HT<sub>2B</sub> y β-actina.

Oligonucleótido	Secuencia	Posición	Tamaño del producto
5-HT <sub>2B</sub> sentido	5'AGGGAAGACTCATCCTT3'	1132-1148	207
5-HT <sub>2B</sub> antisentido	5'GGCACCACATAAGCAG3'	1339-1324	
β-actina sentido	5'AGCGCTTCCGGTGTCCAG3'	832-849	199
β-actina antisentido	5'GGCTGTGATCTCCTTCT3'	1015-1031	

Tabla 5.- Condiciones de reacción para PCR.

Etapas	Temperatura/ tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95°C/ 4 min	1
Desnaturalización	95°C/ 45 seg	38
Alineamiento: 5-HT <sub>2B</sub>	55.5°C/ 1 min	
β-actina	64°C/ 1 min	
Síntesis	72°C/ 5 min	
Extensión	72°C/ 5 min	1

Tabla 6.- Volúmenes usados para la PCR

	Control positivo	Control Negativo
cDNA	2.0 µl	2.0 µl
Buffer 10X	2.0 µl	2.0 µl
MgCl <sub>2</sub> [25mM]	1.2 µl	1.2 µl
dNTP's [5mM]	0.8 µl	0.8 µl
Oligo sentido [1mM]	0.5 µl	0.5 µl
Oligo antisentido [1mM]	0.5 µl	0.5 µl
Polimerasa	0.5 µl	0.5 µl
H <sub>2</sub> O	12.5 µl	12.5 µl
Vol. Final	20 µl	20 µl

Los productos de PCR fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa (1%). Al término de la electroforesis las bandas se visualizaron con luz UV usando como intercalador el bromuro de etidio, se usó de referencia el marcador de tamaño molecular  $\Phi$ X174 Hae III Digest de 100 pares de bases (SIGMA).

#### VII.7.- ANÁLISIS DE DENSITOMETRÍA

El análisis de la expresión del receptor 5-HT<sub>2B</sub> se realizó mediante densitometría, en la cual se midió la densidad óptica de las bandas obtenidas en los geles de agarosa usando como referencia la expresión del gen de  $\beta$ -actina, el empleo de un gen de referencia minimiza los errores atribuibles a la cantidad de muestra presente en cada tubo y además de que permite la comparación de la expresión del receptor 5-HT<sub>2B</sub> en animales control y tratados con PCPA, el programa que se utilizó para realizar las densitometrías fue ImageJ 1.42.

#### VII.8.- TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA

Para evaluar el efecto de la inhibición de la síntesis de serotonina sobre el número de corpúsculos gustativos se procedió a realizar una tinción de hematoxilina-eosina. Las etapas estudiadas fueron divididas en etapas embrionarias a los 15 y 17 días y en etapas postnatales, 0, 7, 14, 21 y 60 días postnatales, la metodología que se empleó fue la siguiente.

Posterior al sacrificio de la rata, se realizó disección de la lengua la cual fue colocada en solución de paraformaldehído (PAF) al 4% durante 24 h, posteriormente se procedió a deshidratar la lengua en solución de sacarosa al 10% durante 24 h, posteriormente se procedió a colocar la lengua en solución de sacarosa al 20% durante 24 h y finalmente la lengua fue colocada en solución de sacarosa de 30% durante 24 h. Una vez terminado el procedimiento de deshidratación se procedió a disecar la papila caliciforme la cual fue cortada en un criostato marca Beckman, obteniendo cortes de 16  $\mu\text{m}$  de grosor. Posteriormente los cortes fueron teñidos mediante la técnica de tinción de hematoxilina-eosina. El criostato fue gentilmente proporcionado por el laboratorio de patología del hospital civil de Morelia, Dr. Miguel Silva.

#### VII.9.- CONTEO DE CORPÚSCULOS GUSTATIVOS

Los corpúsculos gustativos fueron contados usando el método modificado de Bradley *et al.*, 1980, revisando cada papila en corte secuencial y por triplicado, es decir, de animales control y tratados con pCPA.

#### VII.10.- ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA

El análisis de morfología se realizó empleando el programa ImageJ 1.42. Las medidas tomadas fueron la longitud de la papila caliciforme y la amplitud de la trinchera, las etapas estudiadas fueron E17, P0, P7, P14, P21 y P60, para animales control y tratados con pCPA.

#### VI.11.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de las densitometrías, del conteo de los corpúsculos y del análisis de la morfología fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism 3.0, calculando la media  $\pm$  error estándar. Se empleó la prueba de "t" de student para determinar si las diferencias entre los datos fueron estadísticamente significativas.

## VIII.- RESULTADOS

### VIII.1.- VALIDACIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS PARA EL RECEPTOR 5-HT<sub>2B</sub> Y LA $\beta$ -ACTINA

La figura 10 muestra los productos de amplificación de RT-PCR, utilizando los oligonucleótidos para el receptor 5-HT<sub>2B</sub> y para la  $\beta$ -actina. El carril 1 muestra el marcador de tamaño molecular. En el carril 2 corresponde al control positivo para el receptor 5-HT<sub>2B</sub> en el cerebelo de ratas control adultas. El carril 3 corresponde al control negativo de la reacción de RT para el receptor 5-HT<sub>2B</sub> en cerebelo. En el carril 4 y 5 se observan los productos de amplificación de RT-PCR usando los oligonucleótidos para la  $\beta$ -actina en cerebelo de ratas adultas, obteniendo la banda específica a la talla esperada en el carril 4(positivo) y el carril 5 está libre de bandas (negativo). Los experimentos fueron realizados por triplicado, con una mezcla de mínimo 3 animales.

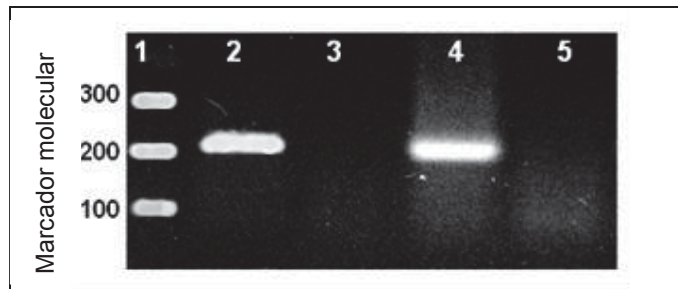


Figura 10.- Imagen representativa que muestra los productos de amplificación para el receptor 5-HT<sub>2B</sub> y la  $\beta$ -actina en el cerebelo de ratas adultas. 1.- marcador molecular. 2.- reacción positiva para el receptor 5-HT<sub>2B</sub>. 3.- Reacción negativa para el receptor 5-HT<sub>2B</sub>. 4.- Reacción positiva para  $\beta$ -actina. 5.- reacción negativa para la  $\beta$ -actina. los experimentos fueron realizados por triplicado, con una mezcla de mínimo 3 animales por muestra.

## VIII.2.- VALIDACIÓN DEL CONTROL INTERNO

La figura 11 muestra los productos de amplificación del gen de  $\beta$ -actina en la papila caliciforme de animales control (A) y tratados con PCPA (B). Tanto en el panel A como en el panel B el carril 1 muestra el marcador de tamaño molecular, del carril 2 al 8 se muestra los productos de amplificación de E15 a P60 para el gen de la  $\beta$ -actina. En los carriles 2 a 8 aparece la banda esperada, que es de un tamaño aproximado de 200 pb. De forma paralela se realizaron las reacciones de RT negativa en las cuales no se presentaron bandas ni señales de amplificación (datos no mostrados), los experimentos fueron realizados por triplicado con una mezcla de mínimo 3 animales por etapa. Los datos obtenidos de la densidad óptica sirvieron para realizar el análisis de la expresión relativa del receptor 5-HT<sub>2B</sub> en relación a  $\beta$ -actina.

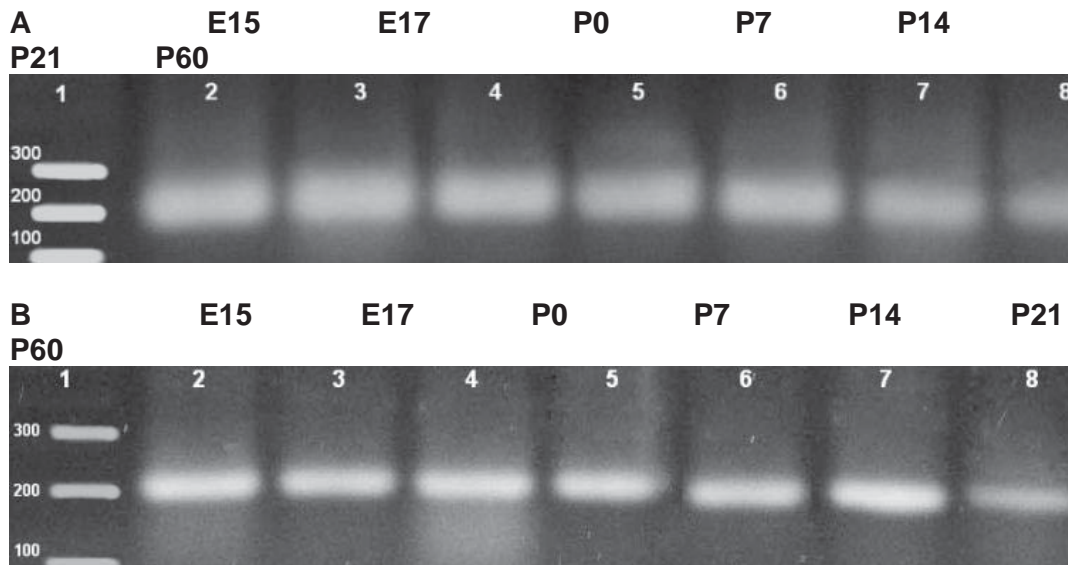


Figura 11.- Imágenes representativas que muestran los productos de amplificación para  $\beta$ -actina de la papila caliciforme de animales control (A) y animales tratados con PCPA (B). En ambos casos el carril 1 marcador molecular; carril 2) productos en E15; carril 3) productos en E17; carril 4) productos en P0; carril 5) productos en P7; carril 6) productos en P14; carril 7) productos en P21; carril 8) productos en P60. Los experimentos fueron realizados por triplicado con un mínimo de 3 papilas por etapa

VIII.3.- EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 5-HT<sub>2B</sub> EN LA PAPILA CALICIFORME.

La figura 12 muestra los productos de amplificación para el receptor 5-HT<sub>2B</sub> en la papila caliciforme de animales control (A) y tratados con PCPA (B). En ambos paneles (A y B) el carril 1 muestra el marcador de tamaño molecular, de los carriles 2 a 8 se muestran los productos de amplificación para el receptor 5-HT<sub>2B</sub> de E15 a P60, en los carriles 2 a 8 aparece la banda correspondiente al receptor 5-HT<sub>2B</sub> con un tamaño aproximado de 200 pb. De forma paralela se corrieron reacciones de control negativo para la RT, en las cuales no se presentaron bandas ni señales de amplificación (datos no mostrados). Los experimentos fueron realizados por triplicado con una mezcla de mínimo tres papilas por etapa.

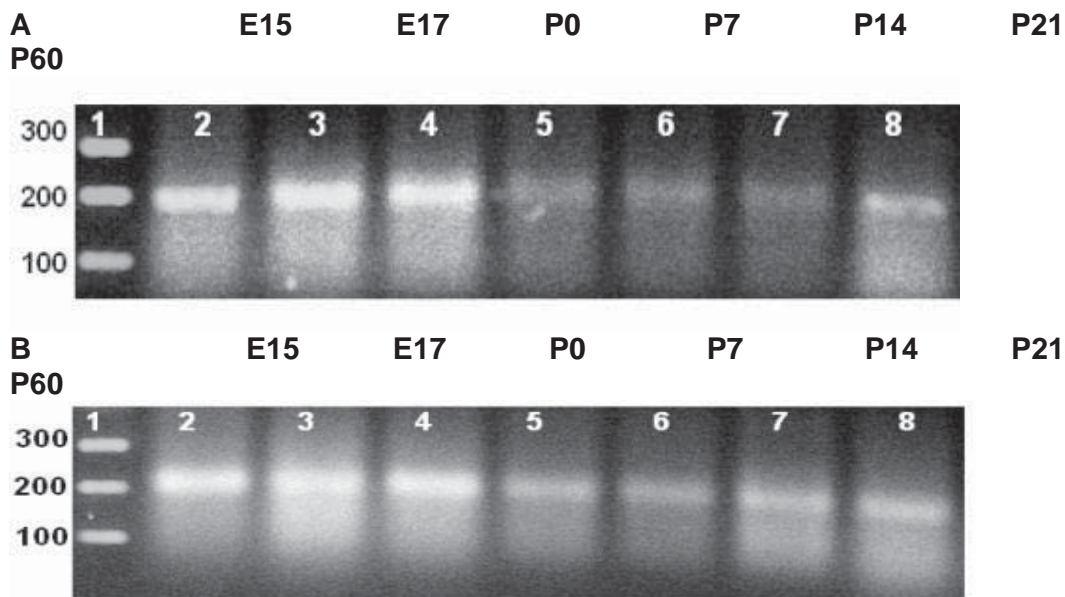


Figura 12.- Imágenes representativas que muestran los productos de amplificación para el receptor 5-HT<sub>2B</sub> en la papila caliciforme de ratas control (A) y tratadas con PCPA (B). En ambos casos en el carril 1) marcador molecular; carril 2) productos en E15; carril 3) productos en E17; carril 4) productos en P0; carril 5) productos en P7; carril 6) productos en P14; carril 7) productos en P21 y carril 8) productos en P60. Los experimentos fueron realizados por triplicado, con una mezcla de mínimo 3 animales por etapa



La figura 13 muestra el análisis de densitometría para la expresión del receptor 5-HT<sub>2B</sub> en la papila caliciforme de animales control y tratados con PCPA. Para el caso de los animales control, se presentó una curva de ontogenia con incremento de la expresión en E17, en P0 y en P60. En los animales tratados con PCPA el pico máximo de expresión se presentó en E17, posteriormente la expresión del receptor presentó tendencia a disminuir.

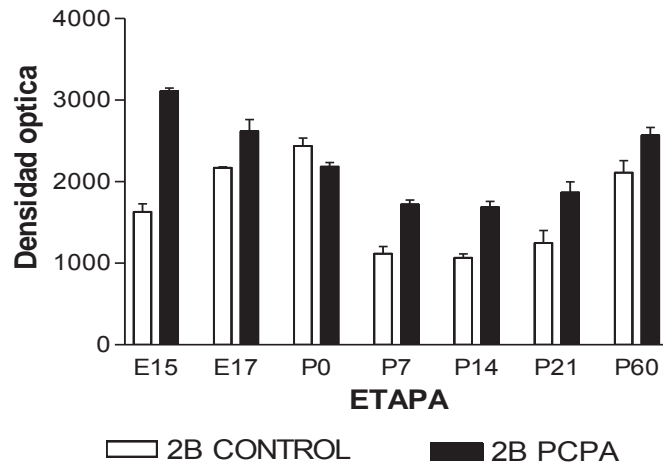


Figura 13.- Expresión del receptor 5-HT<sub>2B</sub> en la papila caliciforme de animales control y tratados con pCPA, se muestra  $X \pm E.E.$

#### VIII.4- EXPRESIÓN RELATIVA DEL RECEPTOR 5-HT<sub>2B</sub> EN LA PAPILA CALICIFORME DE ANIMALES CONTROL Y TRATADOS CON PCPA.

Para evaluar los cambios en la expresión del receptor 5-HT<sub>2B</sub> debido a la inhibición de la síntesis de serotonina, en el presente trabajo se procedió a realizar un análisis de expresión relativa del receptor 5-HT<sub>2B</sub> tomando como gen de referencia la expresión del gen de  $\beta$ -actina. En la figura 14 se muestran los porcentajes de expresión del receptor 5-HT<sub>2B</sub> en relación a la expresión del gen de  $\beta$ -actina. Los resultados fueron en E15 24.43 vs 52.58, en E17 44.16 vs 50.31, en P0 46.18 vs 46.03, en P7 25.13 vs 32.17, en p14 18.68 vs 28.31, en P21 23.16 vs 32.42 y en P60 42.87 vs 53.46 (control vs PCPA).

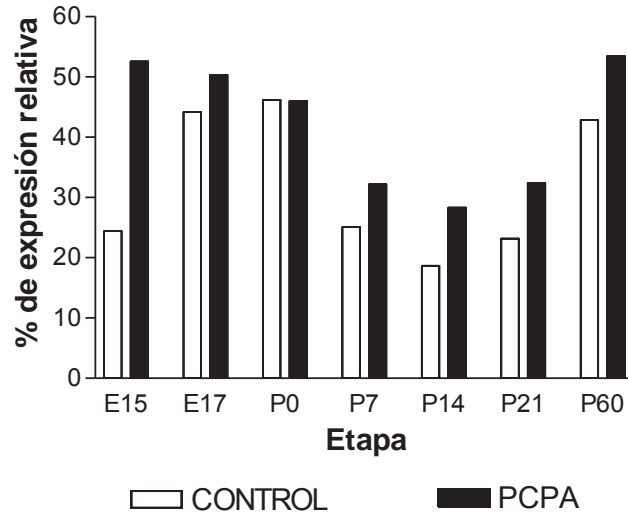


Figura 14.- Porcentaje de expresión relativa del receptor 5-HT<sub>2B</sub> en la papila caliciforme de animales control y tratados con PCPA.

#### VIII.5.- NÚMERO DE CORPÚSCULOS DE LA PAPILA CALICIFORME

A la par del análisis de la expresión del receptor 5-HT<sub>2B</sub>, en el presente trabajo se realizó el conteo de corpúsculos gustativos en la papila caliciforme, para evaluar el efecto que tiene la inhibición de la síntesis de serotonina causada por la administración de la PCPA en el número de corpúsculos gustativos. El análisis del número de corpúsculos gustativos fue realizado a partir de P0, debido a que los corpúsculos gustativos aparecen hasta el día fetal 20 (Krimm, 2007). Como se puede ver en la figura 15 se muestra el número de corpúsculos gustativos en animales control y tratados con pCPA, se observó una disminución significativa del número de corpúsculos gustativos, a excepción de la etapa P7. En P0 existió una reducción del 60.6%, en P14 se observó una disminución del 28.5%, en P21 existió una reducción del 50.84% y en P60 demostró una disminución del 26.36%.

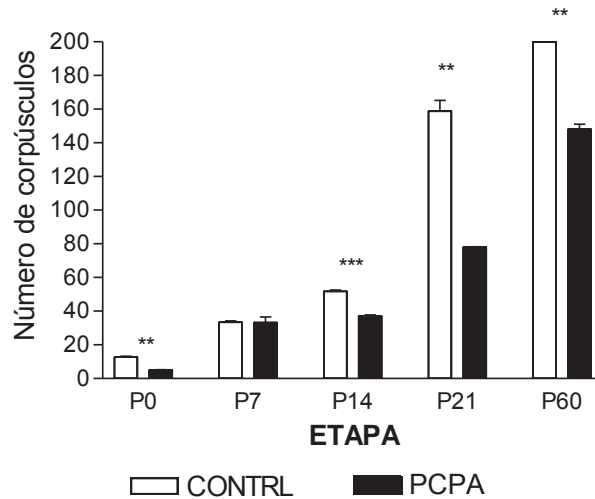


Figura 15.- Número de corpúsculos gustativos en la papila caliciforme de animales control y tratados con pCPA.  $\bar{X} \pm E.E.$  de tres papilas medidas por tres observadores independientes. \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .

#### VIII.6.- MORFOLOGÍA DE LA PAPILA CALICIFORME DE ANIMALES TRATADOS CON PCPA

Para evaluar el efecto de la inhibición de la síntesis de serotonina, sobre la morfología de la papila caliciforme, en el presente trabajo se tomaron las siguientes medidas: Longitud de la papila, amplitud de la trinchera y grosor del epitelio. La figura 16 muestra las fotomicrografías tomadas (40X) de cortes de las papilas caliciformes en E17. Animales control (B) y (B) animales tratados PCPA, en los animales tratados con PCPA se observó un engrosamiento epitelial (flechas largas) y se un adelgazamiento de la parte media de la papila (flechas cortas), en comparación con los animales control.

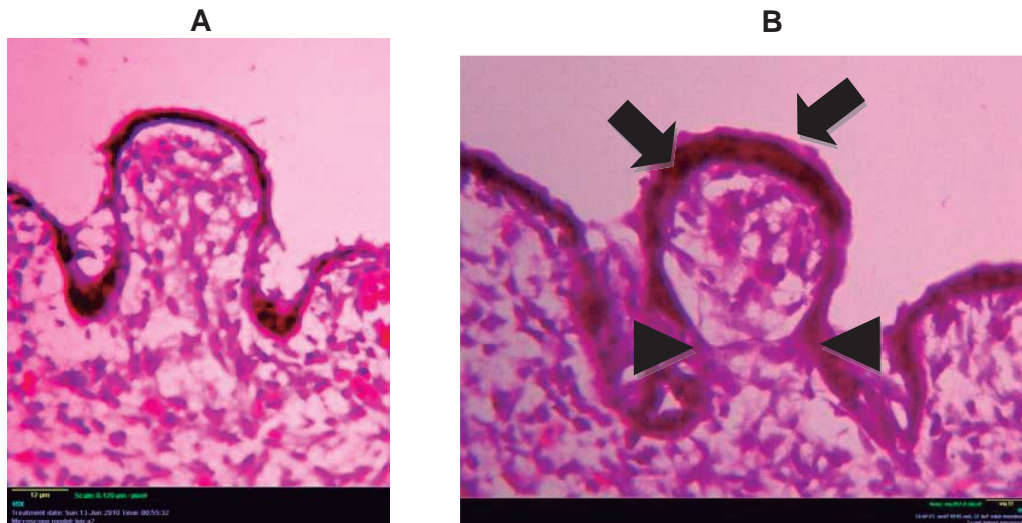


Figura 16.- Fotomicrografías tomadas (40X) de la papila caliciforme en E17. (A) Animales control y (B) animales tratados con PCPA. Las flechas largas señalan el epitelio y las flechas cortas indican la reducción de la parte media.

Los cambios observados en P0 se presentan en la figura 17 en la cual se muestran las fotomicrografías tomadas (10X) de la papila caliciforme en animales control (A) y tratados con PCPA (B). En el caso de los animales tratados con PCPA se observó un engrosamiento epitelial (flechas largas), el círculo señala el corpúsculo gustativo. En la papila control las flechas cortas señalan los corpúsculos gustativos.

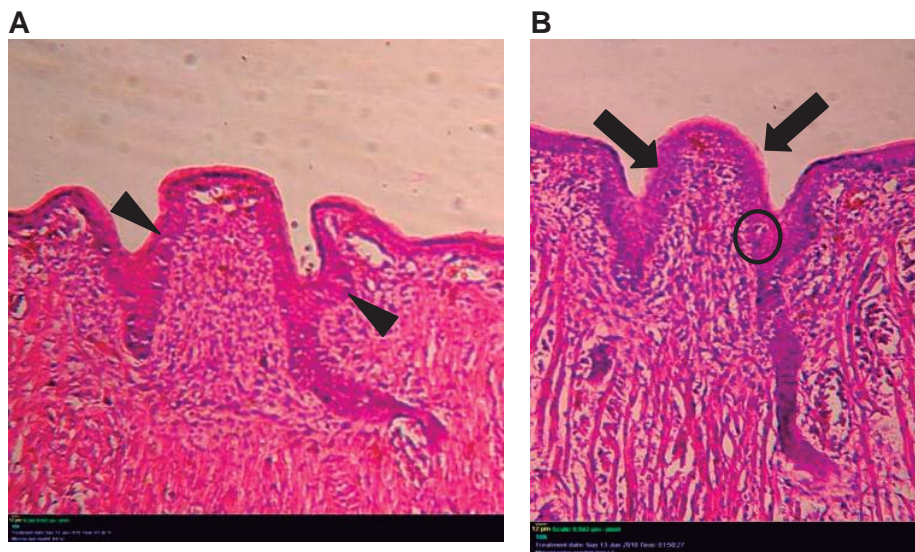


Figura 17- Fotomicrografías tomadas (10X) de la papila caliciforme en P0 control (A) y tratados con PCPA (B), las flechas largas indican un

engrosamiento epitelial, círculo y flechas cortas indican los corpúsculos gustativos.

La figura 18 muestra las fotomicrografías tomadas (10X) de la papila caliciforme de animales control (A) y tratados con PCPA (B). En el caso de los animales tratados con PCPA se presentó un incremento en la amplitud de la papila (líneas negras), de forma similar se presento disminución epitelial (flechas negras) en relación con las papilas control en P7

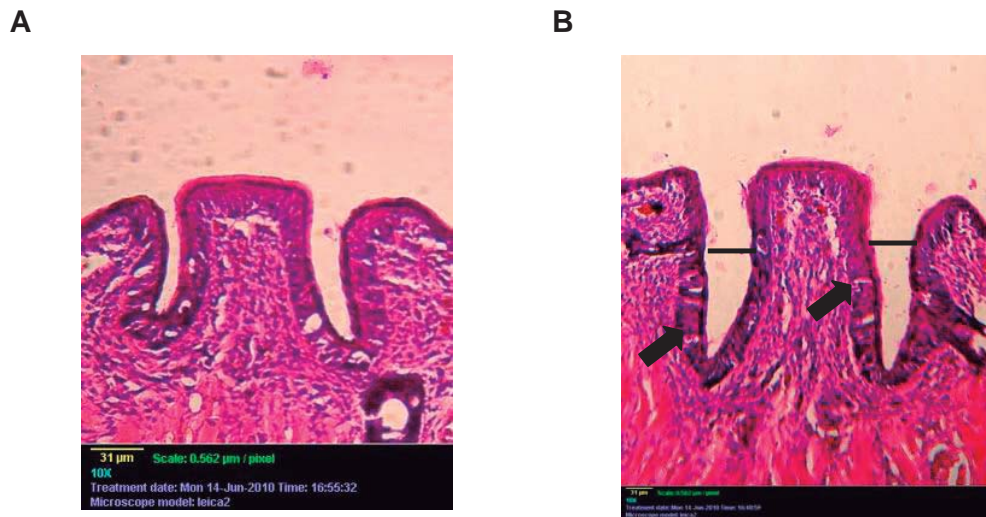


Figura 18.- fotomicrografías tomadas (10X) de la papila caliciforme en P7 control (A) y tratado con pCPA (B); La líneas indican la trinchera y las flechas indican el epitelio.

En la figura 19 aparecen las fotomicrografías tomadas (10X) de la papila caliciforme en P14, en el panel A aparece la papila del animal control y en el panel B aparece la papila del animal tratado con PCPA. En los animales tratados con PCPA se presentó una disminución en la amplitud de la trinchera (líneas negras), así como, se observó una reducción epitelial (flechas negras) en relación con los animales control.

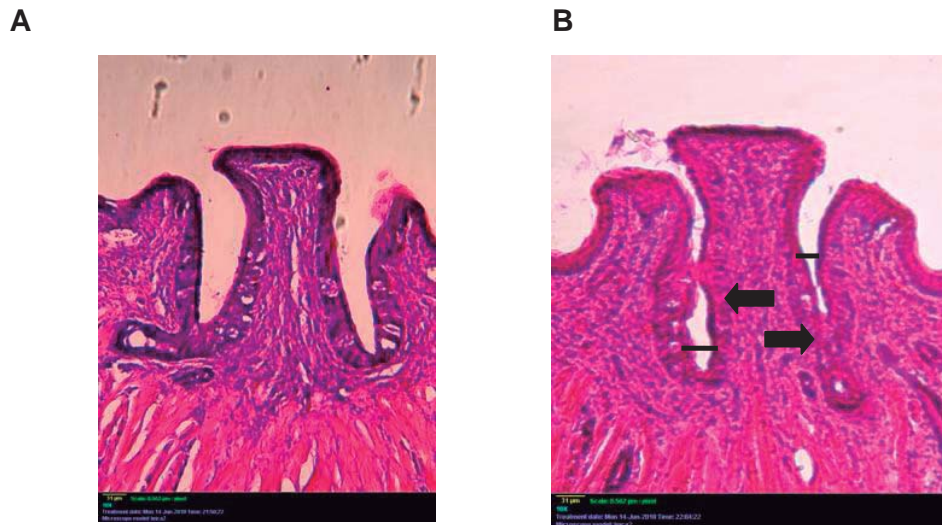


Figura 19.- Fotomicrografías de la papila caliciforme en P14. Controles (A) y tratados con PCPA (B). Las líneas negras indican la amplitud de la papila y las flechas negras indican la disminución epitelial.

La figura 20 muestra las fotomicrografías de la papila caliciforme en P21, tomada (10X) animales control (A) y tratados con PCPA (B). En los animales tratados con PCPA se presentó una reducción en la longitud (línea discontinua), se observó una reducción en la amplitud de la trinchera (línea continua), reducción epitelial (flechas largas) y un adelgazamiento de la parte media de la papila (flechas cortas) con respecto a los animales control.



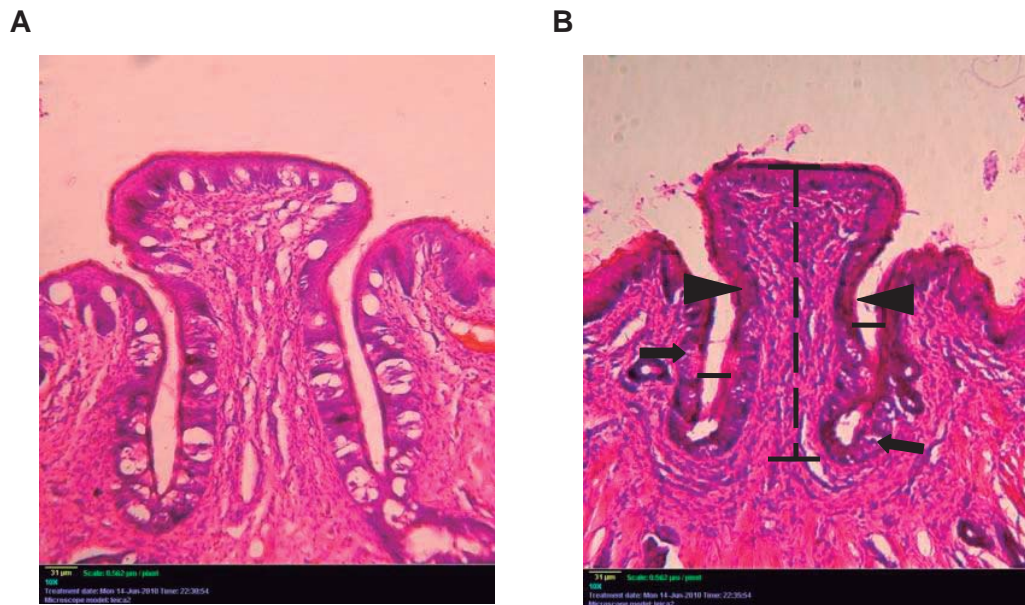


Figura 20.- Fotomicrografías tomadas (10X) de la papila caliciforme en P21. (A) Animal control, (B) animal tratado con PCPA. La línea discontinua indica la longitud, la línea continua indica la trinchera, las flechas largas indican el epitelio y las flechas cortas indican la parte media.

En la figura 21 se muestran las fotomicrografías tomadas (10X) de la papila caliciforme a P60. Animales control (A) y tratados con PCPA (B). En los animales tratados con PCPA se observó una reducción en la longitud de la papila (línea discontinua), además se presentó reducción en la amplitud de la trinchera (línea continua) y una reducción epitelial (flechas) con respecto a los animales control.

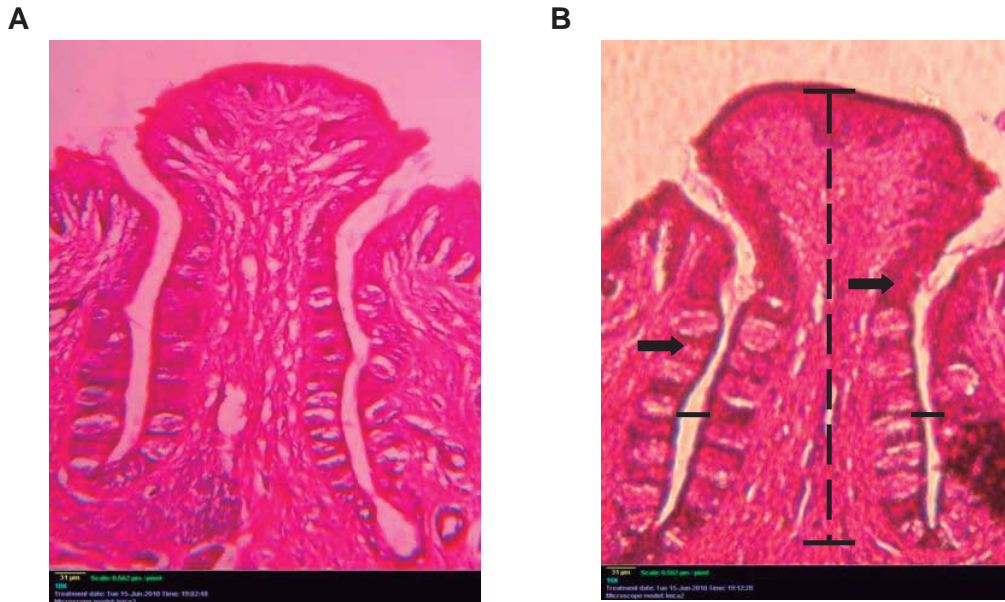


Figura 21.- Fotomicrografías tomadas (10X) de la papila caliciforme en P60, (A) animal control, (B) animal tratado con PCPA. La línea discontinua indica la longitud, la línea continua indica la trinchera y las flechas indican el epitelio.

En la figura 22 se muestra el análisis de la longitud medida en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) de la papila caliciforme de animales control y tratados con PCPA. Se presento un incremento significativo en la longitud de la papila en los animales tratados con PCPA en E17 y en P60 en relación al control. En P21 lo animales tratados con PCPA mostraron una disminución significativa de la longitud.

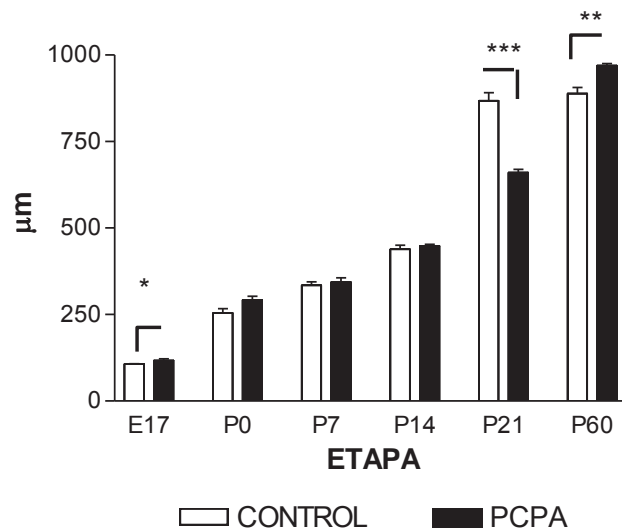


Figura 22.- Longitud de la papila caliciforme de animales control y tratados con PCPA. Se muestra  $\bar{X} \pm \text{E.E.}$  de 5 papilas medidas. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .



El análisis de la amplitud de la trinchera de animales control y tratados con PCPA, se muestra en la figura 23. Se observó una disminución significativa de la amplitud en P14, P21 y P60 en los animales tratados con PCPA en relación a los animales control. En cambio se presentó un incremento significativo en la amplitud en P0 y P7 en los animales tratados con PCPA en relación a los animales control.

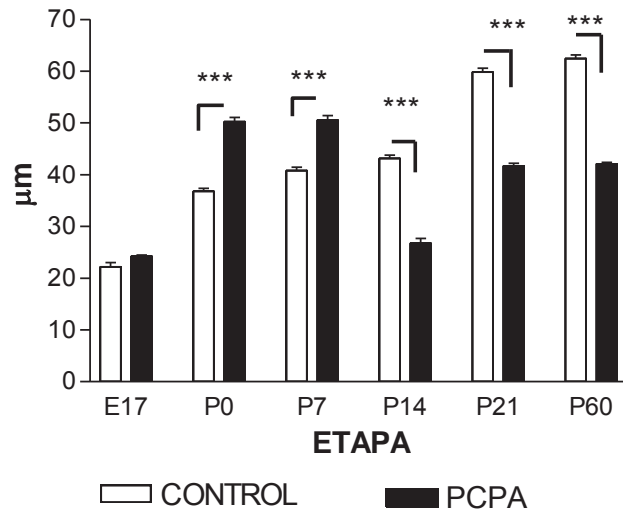


Figura 23.- Amplitud de la trinchera de la papila caliciforme de animales control y tratados con PCPA. Se muestra  $\bar{X} \pm E.E.$  de 5 papilas medidas. \*\*\*  $p < 0.0001$ .

En la figura 24 se muestra el análisis del tejido epitelial, medido en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ), de la papila caliciforme de animales control y tratados con PCPA. Se presentó un incremento significativo del epitelio en E17 y P0 en los animales tratados con PCPA con respecto a los animales control. En P7, P14, P21 y P60 se observó una disminución epitelial significativa en el caso de los animales tratados con PCPA en relación con los animales control.

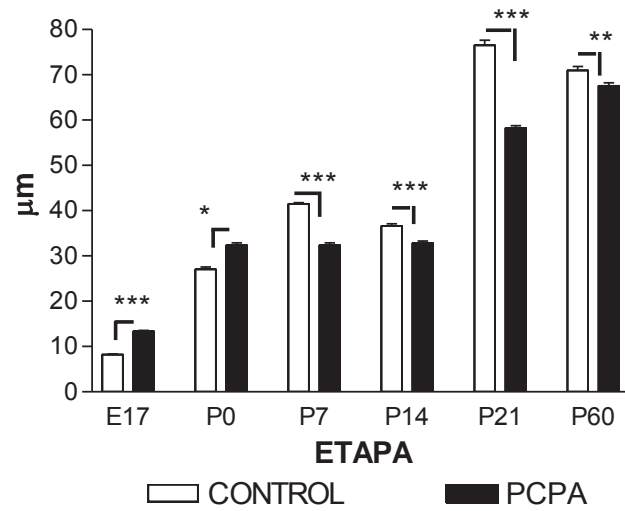


Figura 24.- Tejido epitelial de la papila caliciforme de animales control y tratados con pCPA. Se muestra  $\bar{X} \pm E.E.$  de 5 papilas medidas. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .

## VI.- DISCUSIÓN

Los objetivos del presente trabajo fueron determinar la expresión del receptor 5-HT<sub>2B</sub> durante el desarrollo de la papila caliciforme, evaluar el efecto de la inhibición de la síntesis de serotonina sobre la expresión del receptor 5-HT<sub>2B</sub>, evaluar el número de corpúsculos gustativos y las alteraciones morfológicas durante el desarrollo de la papila caliciforme de la rata. Se ha descrito que durante el periodo de administración de la PCPA (E12-E17), empleado en el presente trabajo, ocurren procesos importantes para la funcionalidad del sistema gustativo, tales procesos comprenden la formación del tejido epitelial lingual, el crecimiento axonal que posteriormente generara la inervación de la lengua y de las papilas gustativas, la formación de las estructuras primarias de la papilas y la diferenciación celular que formara las papilas gustativas y el epitelio lingual (Krimm, 2007).

La administración de la PCPA con fines de inhibir la síntesis de serotonina y de esta forma describir el papel como factor trófico que presenta la serotonina en diversos procesos del desarrollo, ha sido empleada desde la década de los 70's, donde se demostró que la serotonina participa activamente en el desarrollo embrionario de las ratas (Moore y Hampton, 1974). En 2007 se demostró que la serotonina participa en el desarrollo de la corteza somatosensorial de la rata y de manera paralela en el mismo estudio se demostró que la administración de PCPA es el método farmacológico mas específico y práctico que existe para inhibir la síntesis de serotonina, puesto que atraviesa la placenta, inhibe la actividad de la TPH1 y de la TPH2 de los embriones (Vitalis *et al.*, 2007). Administrando PCPA se logra una disminución de la concentración de serotonina del 50% a las 6 h de la primera administración y a las 72 h la concentración de serotonina se ve disminuida un 97% con relación al control, otra ventaja que presenta la administración de PCPA es que la inhibición es reversible por lo tanto los animales tratados con PCPA tienen un periodo de vida mayor que los animales K.O. y que los animales tratados con neurotóxicos específicos para células serotoninérgicas. Una de las limitantes que presenta la administración de PCPA son los efectos que puede producir al metabolismo de las catecolaminas, las cuales pueden

tener participación durante el desarrollo del sistema gustativo (Vitalis *et al.*, 2007).

Actualmente se ha descrito la participación de la serotonina como uno de los mediadores de la transducción de la señal gustativa en animales adultos, se ha puesto en evidencia la existencia de un sistema de recaptura y degradación de la serotonina en los corpúsculos gustativos, la capacidad de almacenamiento de las células gustativas (Ren *et al.*, 1999; Kim, y Roper, 1995; Yee *et al.*, 2001), además de que en la papila de la rata adulta se expresan los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>3</sub> (Herness *et al.*, 2003). Actualmente se conocen los procesos de desarrollo del sistema gustativo pero existe poca información sobre la participación de la serotonina durante la ontogenia de las papilas gustativas, se ha demostrado que la TPH es expresada en células gustativas de fetos de ratón (Ortiz *et al.*, 2006), en ese sentido el presente trabajo es pionero puesto que mediante las técnicas de RT y PCR se demostró que el receptor 5-HT<sub>2B</sub> se esta expresado durante la ontogenia de la papila caliciforme, su expresión presenta un máximo en las etapas perinatales (E17 y P0), quizá sea debido al estímulo gustativo proveniente de la leche materna, este estímulo activa diversos mecanismos moleculares para que el corpúsculo gustativo sea funcional. Posteriormente se observó una disminución (P7 a P21), pero en P60 se presenta un incremento de la expresión del receptor, este incremento puede deberse a que el animal ya es adulto y los mecanismos que implican la transducción de la señal gustativa y la dinámica del recambio celular al interior del corpúsculo ya están totalmente establecidos. A la par de la expresión del receptor 5-HT<sub>2B</sub> el presente estudio es el primero que analiza el número de corpúsculos gustativos desde el nacimiento (P0) hasta el animal adulto (P60), los resultados mostraron que el número de corpúsculos va en ascenso conforme el animal va creciendo, obteniendo de esta manera la ontogenia de los corpúsculos.

Por otro lado cuando se inhibió la síntesis de serotonina por acción de la PCPA la expresión del receptor se incremento en todas las etapas estudiadas, a excepción de P0 donde no se presento diferencia, este resultado refuerza la idea anteriormente planteada, de que el estímulo proveniente de la leche

materna produce un incremento en la expresión del receptor 5-HT<sub>2B</sub> lo cual conduce a que la papila caliciforme sea funcional. El incremento de la expresión observado cuando es inhibida la síntesis de serotonina sugiere un efecto conocido como “upregulation” ó regulación a la alta de receptor, el mecanismo de regulación a la alta se basa en el incremento de la expresión de los receptores cuando disminuye el ligando endógeno, este incremento en la expresión se presenta para asegurar la funcionalidad y/o supervivencia de la célula para la que es necesario el ligando (Sherwood, 2004). En el caso de la serotonina el efecto de regulación a la alta del receptor se ha observado cuando se realiza una lesión en las neuronas motoras que se localizan en la medula espinal, observándose un incremento en la expresión del receptor 5-HT<sub>2A</sub> (Kong *et al.*, 2010).

En relación con el número de corpúsculos y la inhibición de la síntesis de serotonina, los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron una reducción en el total de corpúsculos gustativos de los animales tratados con PCPA, a excepción de la etapa P7 donde no existieron diferencias, este incremento en el número de corpúsculos gustativos en P7 en el animal tratado con PCPA, se puede deber a la activación de por lo menos un mecanismo que intenta recuperar la cantidad de corpúsculos, pero este mecanismo no es suficiente y finalmente se presenta la reducción en las etapas posteriores. De forma conjunta a la disminución de los corpúsculos se presentaron alteraciones morfológicas en la papila gustativa de los animales a los que se inhibió la síntesis de serotonina, estas deformaciones en la morfología consistieron en cambios en la longitud de la papila y en el grosor epitelial, además de reducción en la amplitud de la trinchera. Eventualmente sería interesante determinar el grado de diferenciación celular al interior del corpúsculo gustativo y si la inhibición de la síntesis de serotonina produce un incremento en la muerte de las células gustativas.

La función que presenta la serotonina durante el desarrollo de la papila caliciforme aun no están del todo elucidado, pero el presente trabajo sugiere que la serotonina participa en el desarrollo de la papila caliciforme mediante la interacción con el receptor 5-HT<sub>2B</sub> y al disminuir la síntesis de serotonina se

presenta un incremento en la expresión de este receptor, disminución en el número de corpúsculos gustativos y alteraciones morfológicas. Las observaciones anteriores conducen a plantear la hipótesis de que la serotonina participa activamente en los procesos de establecimiento y diferenciación celular durante el desarrollo de la papila caliciforme; además de participar como molécula trasmisora de la señal gustativa, la serotonina también presenta un papel como factor trófico en la papila caliciforme en etapas postnatales..

Actualmente se conoce que la serotonina tiene la capacidad de despolarizar a neuronas aisladas de fibras nerviosas aferentes de la lengua, además de que se presenta la expresión de las dos isoformas de la TPH en embriones de ratón (Ortiz *et al.*, 2006) y en ratas adultas se presenta la expresión de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>3</sub> (Herness *et al* 2004), en el presente trabajo se muestra que el receptor 5-HT<sub>2B</sub> se expresa a los 15 días embrionarios y su perfil de expresión se incrementa en los animales recién nacidos, así como, el incremento de expresión que se presenta cuando es inhibida la síntesis de serotonina.

## **X.- CONCLUSIÓN.**

La serotonina participa en la modulación de la expresión del receptor 5-HT<sub>2B</sub> y en la plasticidad de los corpúsculos gustativos en la papila caliciforme de la rata.

## XII.- BIBLIOGRAFÍA

- Bradburu J. (2004) Taste perception: Cracking the code. *Plos biology*, 2: 295.
- Bradley, R.M., Cheal M.L., and Kim Y.H. (1980) Quantitative analysis of developing epiglottal taste buds in sheep. *J. Anat.*, 130: 25-32.
- Buck, L.B. (2000) Smell and taste : The chemical senses. In Kandel E.R, Schwartz, J.H. and Jessell, T.M (Ed) *Principles of Neuronal Science*. McGraw-Hill, New York. Pp. 625-647.
- Chagoya, G., and Hernández, R. J. (1983) L-tryptophan during gestation induces an increase in brain tryptophan 5-hydroxylase activity and serotonin synthesis. *Proc, West. Pharmacol.* 26:369-372.
- Chandrashekar, J., Mueller L., Hoon M., Adler E., Zuker C., Feng L., Gou W. and Ryba N. (2000) T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell*. Vol. 100:703-711.
- Choi, D., and Maroteaux L. (1996) Immunohistochemical localization of the serotonin 5-HT<sub>2B</sub> receptor in mouse gut, cardiovascular system and brain. *FEBS* 391: 45-51.
- Colas, J.F., Launay, J.M., Vonesch, J.L., Hickel, P. and Maroteaux, L. (1999) L-Serotonin synchronises convergent extension of ectoderm with morphogenetic gastrulation movements in *Drosophila*. *Mech. Dev.* 87, 77–91.
- Cook, H., Anderson, M., and VanderWeele P. (2000) Pharmacogenetics and the serotonin system: initial studies and future directions. *Eur. J. Pharmacol.* 410: 165-181.
- Dessap, M., Brouri, F., Pascal, O., Lechat, P., Hanoun, N., Lanfumey, L., Seif I., Sigaux, B., Krisch, M., Hamon, M., Adnot, S. and Eddahabi, S. (2008) Deficiency of the 5-Hydrotryptamine Transporter Gene leads to cardiac Fibrosis and valvulopathy in mice. *Circulation*. 113: 81-83.
- Fiorica-Howells, E., Maroteaux, L., and Gershon, M. (2000) Serotonin and The receptor 5-HT<sub>2B</sub> in the development of Neuron Enteric. *J. Neuroscience*. 20:294-305.
- Fleischer J., Beer H., Stromann J., (2009) Mammalian Olfactory receptors. *Frontiers in cellular neuroscience.*, 03. 009. 2009.



- Fujimiya, M., Hosada, S., Kitahama, K., Kimura, H., and Meada, T. (1986) Early development of serotonin in the rat brain as studied by immunohistochemistry combined with tryptophan administration. *Brain Dep.* 8: 335-341.
- 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.
- Gilman, G. A., Ruddon, R. W., Molinoff, B. P., Limbird, E. L., (1996) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8 Ed (p. 31) US/ McGraw-Hill.
- Guyton A.C., (1996) *Précis de Physiologie Médicale*. Piccin Nuova Libreria, Padoue, Italie. 325-350.
- Hard, E., Ahlenius, A., and Engel, J. (1983) Effects of neonatal treatment with 5,7-Dihydroxytryptamine or 6-Hydroxydopamine in the ontogenetic development of the audiogenic immobility reaction in the rat. *Psychopharmacology*, 80: 269-274.
- Haydon, G., McCobb, P., and Kater, S. (1984) Serotonin selectivity inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurons. *Science* 226: 561-563.
- Health, P., Melichare K., Nutt, D., Melichar, K., (2006) Human Taste Thresholds are Modulated by Serotonin and Noradrenalin. *J Neurosci* 49: 12664-12671.
- Herness S., Zhao F.L., Lu S., Kaya N. and Shen T. (2002) Expression and physiological Actions of Cholecystinin in Rat Taste Receptor Cells. *J. Neuroscience* 22:10018–10029.
- Herness S., Zhao F-L., Shen T., and Kaya N. (2004) A paracrine role for serotonin in rat taste buds: expression and localization of serotonin receptor subtypes. *Am. J. Physiol.* 286: 649-658.
- Hosley M., Hughes S., Morton L., and Bruce Oakley. (1987) A sensitive period for the neural induction of taste buds. *J. Neuroscience* 7:2075-2080.
- 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.
- Kong Xiang-Yu, Wienecke J., Hultborn H. and Zhang M. (2010) Robust upregulation of serotonin 2A receptors after chronic spinal transection of rats: An immunohistochemical study. *Brain Research.* 1320: 60-68.

- Krimm R. (2207) Factors that regulated embryonic gustatory development. *Neuroscience* 8:180-198.
- Lauder J. M. (19988) Neurotransmitters as morphogenesis program. *Brain Res.* 73. 365–387.
- Lindemann B. (2001) Receptors and Transduction in Taste. *Nature* 413: 219-225.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, A. C., Matsudaira, P., (2005) *Molecular Cell Biology*, 5<sup>th</sup> Ed (p.534) New York, US/ Freeman and company.
- Lopez J.F. and Krimm R. (2206) Refinement of Innervation Accuracy following Initial Targeting of Peripheral Gustatory Fibers. *J. Neurobiol.* 66: 1033-1043.
- Manjarréz, G., Manuel, A. L., Mercado, C. R., and Hernandez, R. J. (2003) Serotonergic receptors in the brain of in utero undernourished rats. *Int. J. Devel. Neuroscience.* 21: 283-289.
- Mercado, C. R., Hernandez J. (1992) A molecular recognizing system of serotonin in rat fetal axonal growth cones: uptake and high affinity binding. *Develop. Brain Res.* 69: 133-137.
- Miura H., Kusakebe Y., and Shuitsu H. (2006) Cell lineage and differentiation in taste buds. *Arch. Histol Cytol.* 69: 209-225.
- Montmayeur J.P. and Matsunami H. (2002) Receptors for bitter and sweet taste. *Neurobiology* 12:366-371.
- Moore, W. T. and Hampton, J.K. (1974) Effects of Para-Chlorophenylalanina on pregnancy in the rat. *Biology of reproduction*, 11: 289-287.
- Nabigil, C., Choi D-S, Dierich, A., Hickel, P., Le Meur, M., Messaddeq, N., Launay J-M., and Maroteaux, L. (2009) serotonin 2B receptor is required for heart development. *PNAS.* 17: 9508-9513.
- 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 papila. *Histochemistry*, 43, 237-240.
- Nagai, T., Delay, R.J., Welton, J., and Roper, S.D. (1998) Uptake and release of neurotransmitter candidates, <sup>[3H]</sup>serotonin, <sup>[3H]</sup>glutamate, and <sup>[3H]</sup>gamma-aminobutyric acid, in taste buds of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. *J. Comput. Neurol.* 392: 199–208.
- Ortíz-Alvarado, R., Guzman-Quevedo, O., Mercado-Camargo, R., Heartle, T., Vignes, T. and Bolaños-Jimenez, F. (2206) Expression of Tryptophan

- Hydroxylase in developing mouse taste papillae. *FEBS Letters*, 580: 5371-5376.
- Page, I. H. (1976) The discovery of serotonin. *Perspect. Biol. Med.* 20: 1-8.
- Parry M. C., Erkner A., and le Coutre J. (2004) Divergence of T2R chemosensory receptor families in humans, bonobos, and chimpanzees. *PNAS*. 10: 14830-14834.
- Ponimaskin, E., Manzke, T., Wilken, B., and W., Richter. (2003) Serotonin receptors: guardians of stable breathing. *Trends in Molecular Medicine*. 9: 542-548.
- Ren, Y., Shimada, K., Shirai, Y., Fujimiya, M., and Saito, N. (1999) Immunocytochemical localization of serotonin and serotonin transporter (SERT) in taste buds of rat. *Brain Res. Mol. Brain Res* 74: 221–224.
- Responses to Apical Chemical Stimulation. *Juornal of Neuroscience* 21: 4931-4941 (2001).
- Roper S. D. (2006) Cell communication in taste buds. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 1494-1500.
- Schiffman S.S. (2000) Taste quality and neural coding: Implications from psychophysics and neurophysiology. *Physiology and Behavior* 69: 147-159.
- Sherwood, L. (2004). *Human Physiology From Cells to Systems*, 5th Ed (p. 680). Belmont, CA: Brooks/Cole-Thomson Learning
- Stone, L., Tan, S., Tam, P., Fringer T. (2002) Analysis of Lineage relationships in Taste Buds. *J. Nuerosci* 22: 4522-4529.
- Stroman, J., Fleischer, J. and Breer, H. (2009). Mammalian Olfactory Receptors. *Neuro*. Doi 10.3389.
- Sugita M. (2006) Taste perception and coding in the periphery. *Cell. Mol. Life. Sci.* 63: 2000-2015.
- Suzuki T. (2007) Cellular Mechanism in taste buds. *Bull Tokyo Dent.* 45: 151-161.
- Varnäs, K., (2005) *Distribution of Serotonin Receptors and Transporters in the Human Brain*. ISBN 91-7149-280-2 (p. 4).
- Vitalis, T., Cases, O., Passemard, S., Callebert, and Parnavelas, J. (2007) Embryonic depletion of serotonin affects cortical development. *Eur. J. Neuroscience*, 26: 331-344.

- Volgin, D., Fay, R. and Kubin, L. (2003) Postnatal development of serotonin 1B, 2A and 2C receptors in brainstem motoneurons. *Eur. J. Neuroscience*, 17: 1179-1188.
- Walther, J., Peter, J., Bashammakh, S., Hörtnagl, H., Voits, M., Fink, H. and Bader, M. (2009) Synthesis of Serotonin by a Second Tryptophan Hydroxylase Isoform. *Science*. 299: 76.
- Xu Y., Akio I and ryohachi A. (2004) Immunohistochemical localization of monoamine oxidase type B in the taste bud of rat. *Neurotoxicology* 25: 149-154.
- Yee, C.L., Yang, R., Bottger, B., Finger, T.E., and Kinnamon, J.C. (2001) "Type III" cells of rat taste buds: immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific enolase, protein gene product 9.5, and serotonin. *J. Comput. Neurol.* 440: 97–108.
- Zancanaro C., Sbarbati A., Bolner A., Accordini C., Piemonte G. and Osculati F. (1995) Biogenic amines in the taste organ. *CHEM. Senses* 20: 329-335.
- Zhang H., A. Gilbertson, J. Bougther and Smith D. (2001) Distribution of Gustatory Sensitivities in Rat Taste Cells: Whole-Cell. *J. Neuroscience* 21:4931-4941.
- Zou D, Silviu D, Fritsch B, Xu PX. (2004) Eya1 and Six1 are essential for early steps of sensory neurogenesis in mammalian cranial placodes. *Development*, 31:5561-5572.
- Zuker S.C., Ryba J.P., and Chandrashekar J. (2006) The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444:288-296.