



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Facultad de Químico Farmacobiología

**Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas
Área Temática: Biotecnología Alimentaria**

**“Expresión del ARNm de la triptófano hidroxilasa en la
papila caliciforme de la rata”**

TESIS QUE PRESENTA:

Q.F.B. BLANCA ESTELA JUÁREZ MUÑOZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR DE TESIS:

D. en .C. ROSALIO MERCADO CAMARGO

MORELIA, MICHOCÁN, AGOSTO DE 2011

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurobiología de la Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH, bajo la asesoría del D.C. Rosalio Mercado Camargo. Tesis parcialmente apoyada por CIC-UMSNH26 (2011). CONACYT: 30489

Dedicatoria

A mis padres:

Jaime Juárez Olvera y Bertha Alicia Muñoz Orozco por confiar siempre en mí y por apoyarme en todas mis acciones.

A mis hermanos:

Jaime, Jesús, Víctor y Mónica por estar siempre conmigo en los momentos más difíciles.

Agradecimientos:

Al D. en C. Rosalio Mercado Camargo, por su apoyo y asesoramiento para poder realizar este trabajo de tesis.

A mis sinodales: Alejandra Ochoa Zarzosa, Joel E. López, Héctor E. Martínez Flores y Daniel Gódinez Hernandez, por el tiempo que han dedicado en compartir sus conocimientos conmigo.

A mis compañeros del laboratorio: Angelica, Susana, Tavo, Jaime y Beto.

CONTENIDO

página

CONTENIDO.....	4
Índice de tablas.....	7
Lista de abreviaturas.....	8
Resumen	10
Abstract.....	11
I. INTRODUCCIÓN	12
I.1. Descubrimiento de la serotonina.....	12
I.2. Sistema Serotoninérgico	13
I.2.1. Biosíntesis de la serotonina	13
I.2.2. Triptófano Hidroxilasa	15
I.2.3. Degradación de la 5-HT	16
I.2.4. Participación de la 5-HT como factor trófico	17
I.3. Sistema gustativo	17
I.3.1. Neuroanatomía del sistema gustativo	17
I.3.2. Organización de las células gustativas	18
I.3.3. Desarrollo del sistema gustativo	22
I.3.4. Neurotransmisores implicados en la señalización gustativa	24
I.4. La serotonina y el sistema gustativo periférico	26
II. JUSTIFICACIÓN	27
III. HIPÓTESIS	28
IV. OBJETIVO GENERAL.....	29
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
VI.1 Animales y estrategia experimental	30
VI.1.1. Estimulación de la síntesis de serotonina.....	30
VI.1.2. Obtención de la muestra	31
VI.2. Análisis de la expresión genética de la TPH	32
VI.2.1. Extracción del ARN total.....	32
VI.2.2. Reacción de retrotranscripción (RT).....	32

VI.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	33
VI.3. Conteo de corpúsculos gustativos	34
VI.4. Análisis estadístico.....	35
VI.5. Análisis de expresión de la TPH.....	35
VII. Resultados.....	36
VII.1. Prueba de eficiencia de extracción	36
VII.2. Expresión del gen TPH en el tejido de control.....	37
VII.3. Expresión de la TPH en la papila caliciforme de rata.	38
VII.3.1. Expresión relativa para la isoforma del ARNm de la TPH1 al día E15.	39
VII.3.2. Expresión relativa para el ARNm de la TPH1 al día E17.....	40
VII.3.3. Expresión relativa para la el ARNm de la TPH1 al día P0.....	41
VII.3.4. Expresión relativa para el ARNm de la TPH1 al día P30.....	42
VII.3.5. Expresión relativa para el ARNm de la TPH1 al día P60.....	43
VII.3.6. Expresión de la TPH2 en papila caliciforme de rata.	44
VII.4. Número de Corpúsculos gustativos.	45
VIII. Discusión.....	47
IX. Conclusión	51
X. Bibliografía	52

Índice de Figuras	Página
Fig. 1. Estructura de la serotonina.	13
Fig. 2. Localización anatómica de la biosíntesis de la 5-HT.....	14
Fig. 3. Síntesis de 5-HT a partir del L-Trp.....	15
Fig. 4. Organización del sistema gustativo.	19
Fig. 5. A) Integración del corpúsculo.	21
Fig. 6. Neuroanatomía del sistema gustativo.....	22
Fig. 7. Señalización gustativa.....	25
Fig. 8. Lengua de rata que muestra la ubicación de la papila caliciforme.	31
Fig. 9. Frasco con lenguas de rata en solución de sacarosa.	34
Fig. 10. Productos de amplificación del gen β -actina.....	36
Fig. 11. Productos de amplificación del gen β -Actina durante el desarrollo de la papila caliciforme de rata.	37
Fig. 12. Productos de amplificación en tejido de expresión control.....	37
Fig. 13. Productos de PCR para el gen de la TPH1.....	38
Fig. 14. Expresión relativa del ARNm de la TPH1 en la papila caliciforme de la rata al día E15.....	39
Fig. 15. Expresión relativa del ARNm de la TPH1 en la papila caliciforme de la rata al día E17.	40
Fig. 16. Expresión relativa del ARNm de la TPH1 en la papila caliciforme de la rata al día P0.	41
Fig. 17. Expresión relativa del ARNm de la TPH1 en la papila caliciforme de la rata al día P30.	42
Fig. 18. Expresión relativa del ARNm de la TPH1 en la papila caliciforme de la rata al día P60.	43
Fig. 19. Amplificación de los productos de PCR para el gen de la TPH2 en la papila caliciforme de rata.	44
Fig. 20. Número de corpúsculos gustativos en etapas postnatales.	45
Fig. 21. Fotografía de papila caliciforme de rata adulta.....	46
Fig. 22. Fotografía de papilas caliciformes a P0.	46

Índice de tablas

Página

Tabla. 1. Oligonucleótidos específicos para las isoformas de la TPH y β -Actina.....	33
--	----

Lista de abreviaturas

5-HT	Serotonina
5-HTP	5-Hidroxitriptófano
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosin trifosfato
dNTPs	Desoxiribonucleótidos trifosfatados
D.E.	Desviación estándar
DLAA	Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
E0	Día embrionario cero
E15	Día embrionario quince
E17	Día embrionario diecisiete
Fig.	Figura
g	gramos
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G
h	horas
i.p.	Administración intraperitoneal
kg	Kilogramo
L-Trp	L-Triptófano
M	Molar
MAO	Monoamino oxidasa
mg	Miligramo
min	Minutos
ml	Mililitro
nm	Nanómetros
OCT	Por sus siglas en Ingles O ptimal C utting T emperature

pb	Pares de bases
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
P0	Primer día del nacimiento
P30	Día postnatal 30
P60	Día postnatal sesenta
PAF	Paraformaldehído
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
RT-PCR	Transcriptasa reversa-Reacción en cadena de la polimerasa
RT	Transcriptasa reversa
s	Segundos
SET	Transportador de serotonina
SNC	Sistema Nervioso Central
TPH	Triptófano Hidroxilasa
TPH1	Triptófano Hidroxilasa periférica
TPH2	Triptófano Hidroxilasa central
$\bar{X}$	Media
UV	Ultravioleta
μL	Microlitro
μg	Microgramo
$^{\circ}\text{C}$	Grados celcius

Resumen

La serotonina (5-hidroxitriptamina ó 5-HT) es un neurotransmisor clásico que participa en una gran variedad de funciones en el organismo, tales como: estado de ánimo, regulación del sueño, ingesta alimenticia, conducta sexual, además de su participación como factor trófico en diferentes eventos del desarrollo. La enzima responsable de su síntesis, a partir del aminoácido esencial L-triptófano (L-Trp), es la triptófano hidroxilasa (TPH), de la cual se han identificado dos isoformas: TPH1 y TPH2 de expresión tejido-específico. La TPH1 se expresa principalmente en células enterocromafines del intestino, glándula pineal, piel, páncreas y de forma discreta en el sistema nervioso central; mientras que la TPH2 se expresa exclusivamente en los núcleos del rafé a nivel de tallo cerebral. Estudios recientes han mostrado la expresión de ambas isoformas de la TPH en sistema gustativo lingual de ratón adulto y durante su desarrollo embrionario, así como la presencia de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, enzima que cataliza el paso final en la síntesis de serotonina, y la presencia de transportadores y receptores serotoninérgicos. Sin embargo, no es claro si existe expresión de la TPH en la papila caliciforme de la rata ni su ontogenia, además no se conoce si la administración de L-trp, modifica la expresión de la TPH y su influencia en el desarrollo del sistema gustativo, por lo cual en el presente estudio se planteo el objetivo de determinar cuál isoforma de la TPH se expresa en la papila caliciforme de la rata durante la etapa embrionaria y en la etapa adulta y si la administración de L-trp modifica la expresión de la TPH. Los resultados muestran que en la papila caliciforme de la rata, solamente se expresa la isoforma TPH1, la cual presenta regulación a la alta en E15 y P0 por la estimulación de la síntesis de 5-HT. En cuanto al número de corpúsculos gustativos, estos disminuyen en el grupo administrado con L-Trp. Estos datos apoyan un posible papel de factor trófico de la 5-HT durante el desarrollo de los corpúsculos gustativos.

Palabras clave: serotonina, corpúsculo gustativo, ontogenia.

Abstract

Serotonin (5-hidroxitriptamine or 5-HT) is a neurotransmitter that mediates a variety of functions in the body, such as: mood control, sleep regulation, food intake, and sexual behavior, also it has an important role as a trophic factor in different developmental events. The enzyme responsible for synthesis of 5-HT from amino acid L-tryptophan (L-Trp), is tryptophan hydroxylase (TPH), of which two isoforms are currently known to exist: TPH1 and TPH2. TPH1 is expressed mainly in enterochromaffin cells of the gut, pineal gland, skin and discreetly in the central nervous system, whereas, TPH2 is expressed exclusively at the raphe nuclei at the brainstem. Recent studies in developing and adult mice have shown the expression of both isoforms of TPH in lingual gustatory system in mouse, however, it's not clear whether there's expression of TPH in the circumvallate papillae of the rat and its ontogeny, also, it is not known whether administration of L-trp, modifies the expression of TPH and its influence on the development of the taste system, so, the aim of the present study was to determine which isoform of TPH is expressed into the circumvallate papillae of the rat during the embryonic and adulthood stage and whether the administration of L-trp changes the expression levels of the TPH. The results show that the papillae of the rat, expresses only the TPH1 isoform which presents an up-regulation on E15 and P0 in the group administrated with L-Trp. Regarding the number of taste buds, they decreased in the group administered with L-Trp. These data support a possible role of 5-HT as a trophic factor during development of taste buds.

Keywords: Serotonin, taste buds, ontogeny.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Descubrimiento de la serotonina

El descubrimiento de la serotonina (5-Hidroxitriptamina, 5-HT) fue hecho por varios grupos de investigadores. La historia comienza aproximadamente en 1930 con Vitorio Erspamer, quien trabajaba en el Instituto de Anatomía y Fisiología Comparativa en la Universidad de Pavia en Italia. Erspamer estaba interesado en la contracción del músculo liso y había encontrado varias aminas probablemente implicadas. Una sustancia específica en la cual él estaba interesado fue encontrada en las células enterocromafines del intestino, esta sustancia causaba la contracción del músculo liso del sistema gastrointestinal, llamó a esta sustancia enteramina.

Años más tarde, en el año de 1948 Irvin Page, interesado en la etiología y tratamiento de la hipertensión, creía que la hipertensión podría ser explicada por factores de constricción presentes en la sangre. Maurice Rapport y Arda Green en el laboratorio del Dr. Irvine Page fueron los que evidenciaron la presencia de una sustancia vasoconstrictora en el suero sanguíneo, la sustancia fue llamada serotonina.

En 1951 se realizó la síntesis de 5-HT y años después se estableció que la enteramina y la 5-HT tenían una estructura química idéntica. Finalmente en 1950, Betty Twarog, en colaboración con Irvine Page, demostraron la presencia de la 5-HT en el cerebro de mamíferos y sugirieron que la 5-HT actúa como un neurotransmisor (Sirek y Sirek, 1970; Whitaker, 1999).

I.2. Sistema Serotoninérgico

La serotonina es un neurotransmisor implicado en una amplia gama de procesos fisiológicos y patológicos (Nakamura y Hasegawa, 2009). Contiene un grupo amino ($-NH_2$) unido a un anillo aromático por una cadena de dos carbonos (Fig. 1). A nivel central, la 5-HT ha sido implicada en diferentes funciones fisiológicas como la regulación del dolor, la regulación de la temperatura corporal, la ingesta de comida y bebida, la ansiedad, el ciclo sueño-vigilia y la conducta sexual. A nivel periférico, la 5-HT participa en la regulación de la función cardiovascular, motilidad intestinal y agregación plaquetaria (Gershon *et al.*, 1990; Walther y Bader, 2003; Gershon, 2004; Gershon y Tack, 2007).



Fig. 1. Estructura química de la serotonina. Está compuesta de un anillo indol hidroxilado en la posición 5, y una cadena lateral etilamínica. (tomada de Walther y Bader 2003).

I.2.1. Biosíntesis de la serotonina

La síntesis de la 5-HT es llevada a cabo tanto en el sistema nervioso central (SNC) como a nivel periférico. A nivel central, es sintetizada en los núcleos del rafe (Fig. 2A), situados en la línea media del tallo cerebral, y a nivel periférico en las células enterocromafines del intestino (Fig. 2B), donde se produce más del 90% de la 5-HT (Gershon, 2004; Berger *et al.*, 2009).

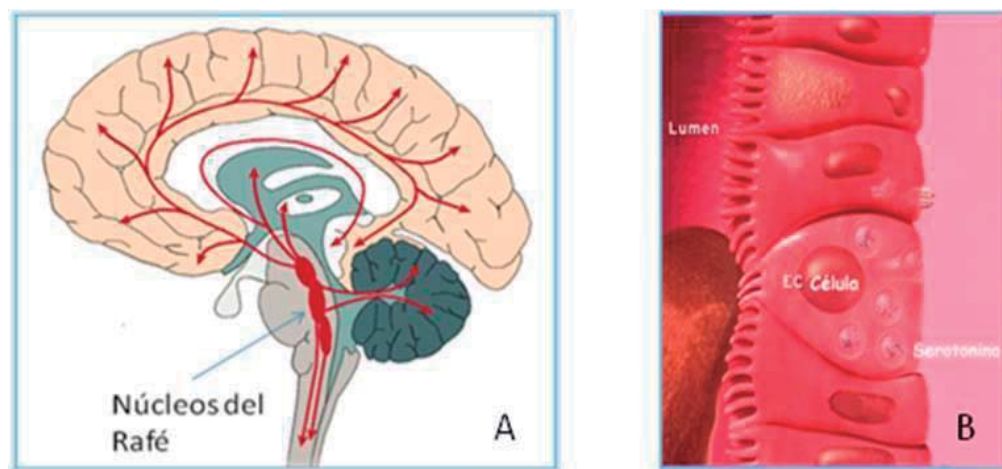


Fig. 2. Localización anatómica de las neuronas y células que sintetizan 5-HT.
A) SNC: neuronas serotonérgicas de los núcleos del rafé. B) SNP: células enterocromafines del intestino (tomado de Berger *et al.*, 2009).

Tanto en el cerebro como en el intestino, la serotonina es sintetizada a partir del aminoácido esencial L- Triptófano (L-Trp), el cual procede del torrente sanguíneo , y ya en las células es sintetizada por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH), de la cual existen dos isoformas, la TPH1 y la TPH2 (Walther y Bader, 2003; Nakamura y Hasegawa, 2007; Abumaria *et al.*, 2008). Esta enzima adiciona un grupo hidroxilo en la posición 5 del anillo pirrólico, formando así 5-hidroxitriptófano (5-HTP), en esta reacción se requiere oxígeno molecular y el cofactor biopteridina (BH4) (McKinney *et al.*, 2001). El siguiente paso lo realiza la enzima descarboxilasa de los L-aminoácidos aromáticos (DLAA), que transforma el 5-HTP en 5-HT (Fig. 3). En el cerebro, la disponibilidad de L-Trp está condicionado por su fijación a la albúmina plasmática, que impide su transporte a través de la barrera hematoencefálica y evita que en condiciones fisiológicas el transportador se sature. Así, ligeros cambios en la concentración del aminoácido en sangre provocan cambios en la síntesis de 5-HT.

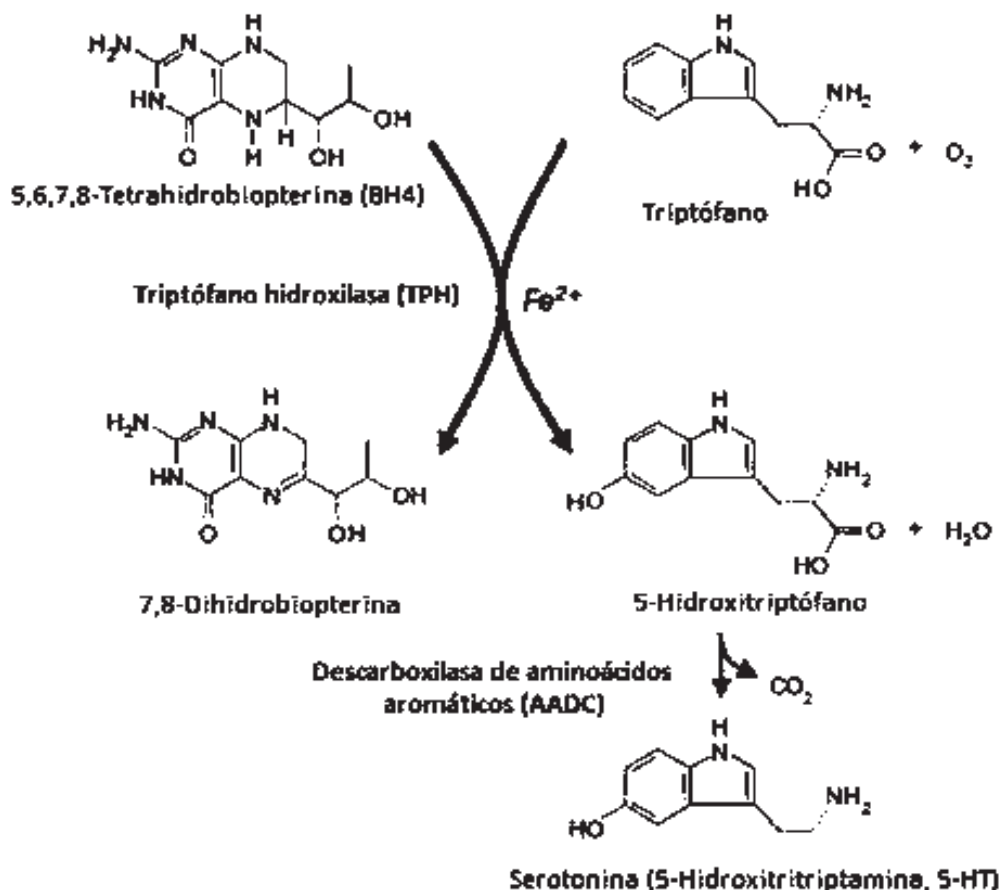


Fig. 3. Síntesis de 5-HT a partir del L-Trp.
(Tomado de Walther y Bader (2003).

I.2.2. Triptófano Hidroxilasa

El paso limitante para la biosíntesis de 5-HT es la hidroxilación de L-Trp, catalizado por la actividad enzimática de la TPH y la disponibilidad de sus sustratos: triptófano (Trp), oxígeno (O_2) y biopterina (BH_4) (Martínez *et al.* 2001; Walther y Bader 2003). La TPH pertenece a la familia de hidroxilasas de aminoácidos aromáticos dependientes de pteridina, la cual incorpora un átomo del

oxígeno molecular en el sustrato y reduce el otro átomo a agua (Fig. 3) (Nakamura y Hasegawa, 2009).

Por muchos años, se creyó que un solo gen codificaba para la TPH y parecía ser responsable para la biosíntesis de 5-HT en vertebrados. Sin embargo Walter y Bader (2003) al generar un ratón deficiente de TPH, revelaron que los órganos periféricos, intestino y glándula pineal, carecían de TPH y 5-HT, pero los niveles de 5-HT cerebral permanecían normales, demostrando así, la existencia de un segundo gen para TPH (TPH2) en múltiples especies, diferente al ya conocido (TPH1). Ambos genes muestran una secuencia de identidad del 71%.

De estas dos enzimas, la TPH1 es expresada en intestino, glándula pineal, y piel, mientras que la TPH2 es la responsable de la síntesis de 5-HT en el cerebro (Sugden, 2003; Walther y Bader, 2003; Abumaria *et al.*, 2008).

I.2.3. Degradación de la 5-HT

La TPH, la DLAA y la BH4 son los factores clave para producción de 5-HT. Tras su síntesis la 5-HT puede ser almacenada en vesículas sinápticas o bien degradada por la MAO, enzima mitocondrial encargado del primer paso de la degradación de las monoaminas, la cual convierte la 5-HT a 5-hidroxi-indolacetaldehído, y su producto es oxidado a ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA). Finalmente el 5-HIAA es excretado por la orina (Gershon, 2004; Berger *et al.*, 2009).

En caso de ser almacenada, la 5-HT entra en las vesículas a través de un transportador vesicular. Una vez en el interior de la vesícula, la 5-HT permanece unida a una proteína específica denominada en inglés *serotonin binding protein* o SBP (Gershon *et al.*, 1990; Erickson *et al.*, 1996).

I.2.4. Participación de la 5-HT como factor trófico

La 5-HT además de sus funciones como neurotransmisor, se ha implicado en eventos del desarrollo, ha sido detectada durante la división del cigoto, gastrulación y neurulación en embriones de erizo de mar, rana, pollo y *Drosophila*, así mismo, se encuentra presente en los conos de crecimiento axonal donde se relaciona con la axogénesis y la sinaptogénesis (Mercado y Hernández, 1992; Buznikov *et al.*, 2001; 2005). La presencia de 5-HT y sus receptores en la embriogénesis temprana y la habilidad que tienen ciertos agentes farmacológicos específicos de 5-HT para interferir con el desarrollo embrionario sugiere que los embriones usan 5-HT antes y después de la neurogénesis para regular la proliferación celular y/o movimientos morfogénicos (Lauder *et al.*, 1981; Colas *et al.*, 1999; Buznikov *et al.*, 2001; Vitalis *et al.*, 2007; Nakamura y Hasegawa, 2009).

I.3. Sistema gustativo

I.3.1. Neuroanatomía del sistema gustativo

Además de las funciones mencionadas de la 5-HT, también ha sido implicada en la transducción de las señales en el sistema gustativo.

El gusto es el sistema sensorial dedicado principalmente a la selección de los alimentos ya que previene la ingestión de sustancias tóxicas (Dvoryanchikov *et al.*, 2007). Estrictamente hablando, el gusto es la modalidad sensorial generada cuando algunos compuestos activan al corpúsculo gustativo y transmiten señales a regiones específicas del cerebro. Además es el encargado de percibir y transmitir las señales para las diferentes modalidades gustativas: dulce, salado, ácido, amargo y umami a las que se les conoce como modalidades gustativas básicas. Es probable la existencia de modalidades gustativas adicionales como grasas, metálicos y otros que también podrían ser considerados como sabores básicos. Cada una de estas modalidades gustativas se cree representa diferentes

requerimientos nutricionales. Así por ejemplo, el gusto por lo dulce parece ser esencial para la identificación de carbohidratos como fuente de energía, el umami permite reconocer los aminoácidos como glutamato, el cual da una sensación gustativa agradable y permite la detección de proteínas y aminoácidos contenidos en los alimentos. El gusto por lo salado garantiza el adecuado equilibrio de electrolitos en la dieta, el gusto por lo amargo es importante para detectar compuestos dañinos y el agrio sirve para detectar alimentos en mal estado, estas dos últimas modalidades median principalmente las señales aversivas (Chandrashekar *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2006; Chaudhari y Roper 2010). Sin embargo, las personas aprenden a tolerar e incluso buscar algunos compuestos de sabor amargo tales como cafeína y ácido cítrico, esto ha superado las respuestas innatas al gusto. Las variaciones en la preferencia del gusto pueden tener consecuencias importantes para la selección de alimentos, la nutrición y salud.

El gusto es comúnmente confundido con sabor, la combinación sensorial de la olfacción y gustación. También ha sido confundido con sensaciones somatosensoriales tales como el frío del mentol o lo caliente del chile. Para muchos mamíferos, la decisión de ingerir un alimento en particular no solo depende del gusto si no también su apariencia, olor, textura y temperatura (Chaudhari y Roper 2010).

I.3.2. Organización de las células gustativas

La percepción gustativa en los mamíferos es mediada por células gustativas, las cuales son agregados de células neuroepiteliales de forma compacta que detectan nutrientes y otros compuestos. Estas células están organizadas en corpúsculos gustativos y se distribuyen sobre la superficie de la lengua, unos pocos están presentes en el paladar blando, laringe, y epiglotis (Ueda *et al.*, 2006). A su vez los corpúsculos gustativos están agrupados en

papilas gustativas, que atendiendo a su morfología se clasifican en papilas caliciformes (forma de botón), papilas fungiformes (forma de hongo) y papilas foliadas (forma de crestas). Las papilas caliciformes se encuentran ubicadas en la parte posterior de la lengua, las papilas fungiformes se localizan en las dos terceras partes anteriores de la lengua y en el paladar, las papilas foliadas se localizan en la parte posterolateral de la lengua (Fig. 4) (Mistretta y Liu, 2006; Sugita, 2006).

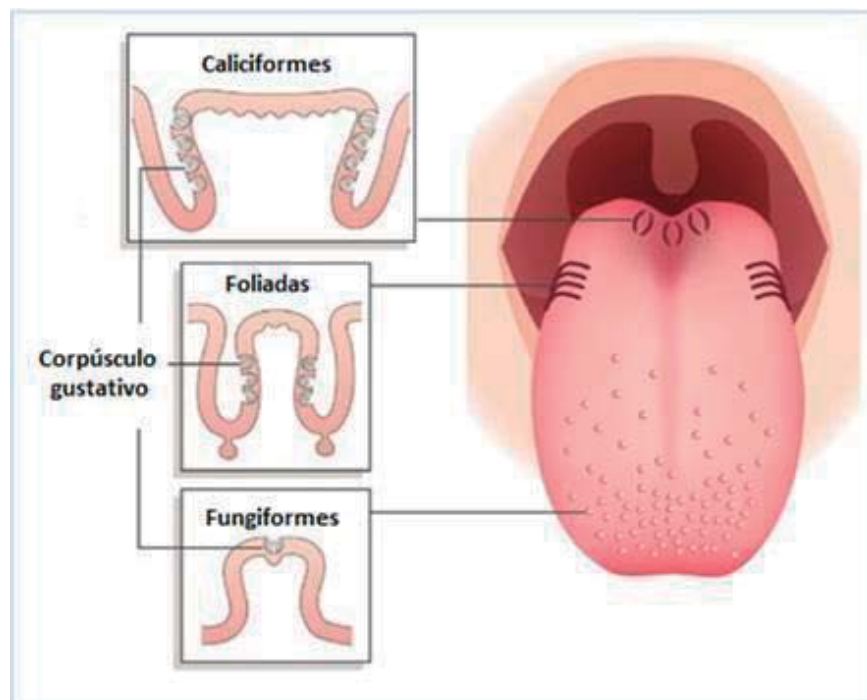


Fig. 4. Organización del sistema gustativo.
(Modificada de Chandrashekar *et al.*, 2006).

En los mamíferos las células gustativas han sido clasificadas en cuatro categorías con base en sus características morfológicas: tipo I, tipo II, tipo III y tipo IV (Fig. 5).

Las células de tipo I son las más abundantes en el corpúsculo gustativo, expresan GLAST, un transportador para glutamato, indicando que ellas pueden

estar involucradas en la captación de éste último. También expresan NTPDase2, una enzima que degrada ATP extracelular, el cual sirve como un neurotransmisor en el corpúsculo gustativo y glutamato también como un candidato a neurotransmisor. Se cree son células de soporte (Bigiani, 2001; Chaudhari y Roper, 2010), es decir, sirven de sostén al corpúsculo gustativo y controlan las concentraciones extracelulares de iones. Este tipo celular parece no estar involucrado en el proceso de señalización del gusto (Suzuki, 2007).

La célula de tipo II probablemente sea la célula receptora sensorial primaria, ya que esta célula expresa la maquinaria necesaria para la transducción de las señales gustativas por receptores acoplados a proteína G (GPCRs). Estas células tienen receptores de unión al sabor dulce, amargo y umami, y no existe evidencia que indique la presencia de sinapsis en procesos nerviosos, este tipo de célula gustativa también reciben el nombre de “célula receptora gustativa” y no parece estar directamente estimulado por el sabor ácido o salado (DeFazio *et al.*, 2006; Tomchik *et al.*, 2007).

Las células de tipo III, no tienen GPCRs, pero expresan proteínas relacionadas con la sinapsis, como son las proteínas asociadas al sinaptosoma (SNAP-25), y son las que establecen sinapsis con nervios gustativos aferentes. Debido a esta característica, este tipo celular recibe el nombre de “células presinápticas”. Las células receptoras secretan ATP, el cual estimula a las células presinápticas y las fibras aferentes sensoriales. Estas células responden a estímulos gustativos ácidos y soluciones carbonatadas y son las responsables para la señalización de estas sensaciones (Tomchik *et al.*, 2007; Chandrashekar *et al.*, 2009). Estas células expresan moléculas de adhesión de célula nerviosa (NCAM), una molécula de adhesión de superficie celular, enzimas para la síntesis de al menos dos neurotransmisores y canales de calcio asociados con la liberación del neurotransmisor. El origen de las fibras que hacen sinapsis con las células de tipo III y si ellas representan aferencias gustativas, aún no se ha dilucidado.

Las células gustativas tipo IV (basales) están localizadas en la base del corpúsculo. A partir de ellas se generan todas las células gustativas (Roper, 2006; Suzuki, 2007; Huang et al., 2009; Vandeneuch y Kinnamon, 2009).

Las señales gustativas son transmitidas vía sinapsis entre las células gustativas y los nervios aferentes, y también de una célula gustativa a otra (Roper, 2006; 2007; Huang et al., 2009).

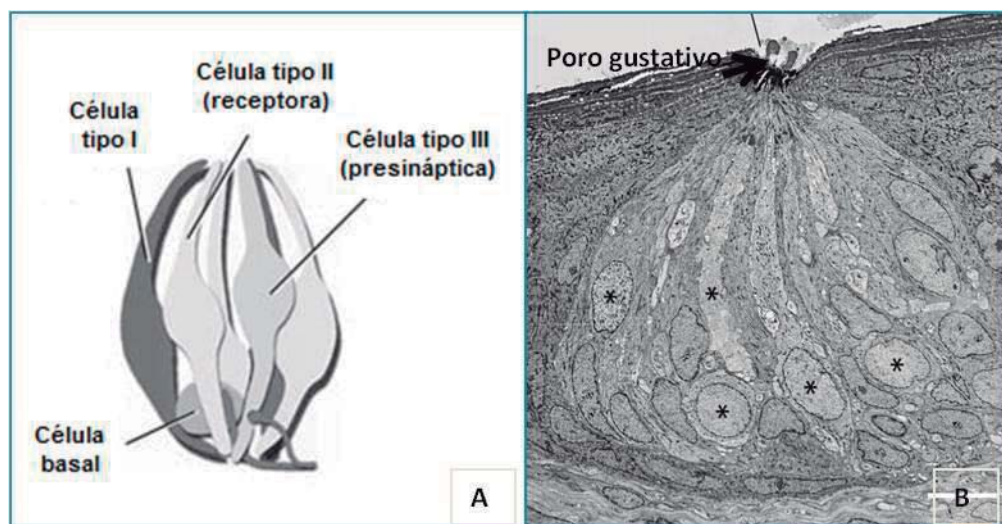


Fig. 5. A) Integración del corpúsculo.
(Tomado de Roper, 2006) **B) Micrografía electrónica del corpúsculo gustativo que muestra en asterisco las células de tipo II y el poro gustativo (tomado de Royer y Kinnamon, 1991).**

El proceso neurofuncional de acceso de la información gustativa al cerebro viene determinado por 3 pares craneales (Fig. 6): a) el par craneal VII (facial), por su inervación de los dos tercios anteriores de la lengua; b) el par craneal IX (glossofaríngeo), por su inervación de la parte posterior de la lengua, y c) el par craneal X (vago), por su inervación de regiones de la glotis, epiglotis y faringe. Las fibras sensoriales del nervio facial, a través de la cuerda del tímpano, transporta la información gustativa a la corteza cerebral proveniente de las papilas fungiformes, mientras que la información proveniente de las papilas caliciformes y foliadas es

transportada al cerebro vía el nervio glosofaríngeo. Finalmente, el nervio vago es el encargado de trasladar al cerebro la información proveniente de la faringe. Todos los nervios convergen a nivel de la región rostral del núcleo del tracto solitario (NTS) localizado en el tronco cerebral (Suzuki, 2007).

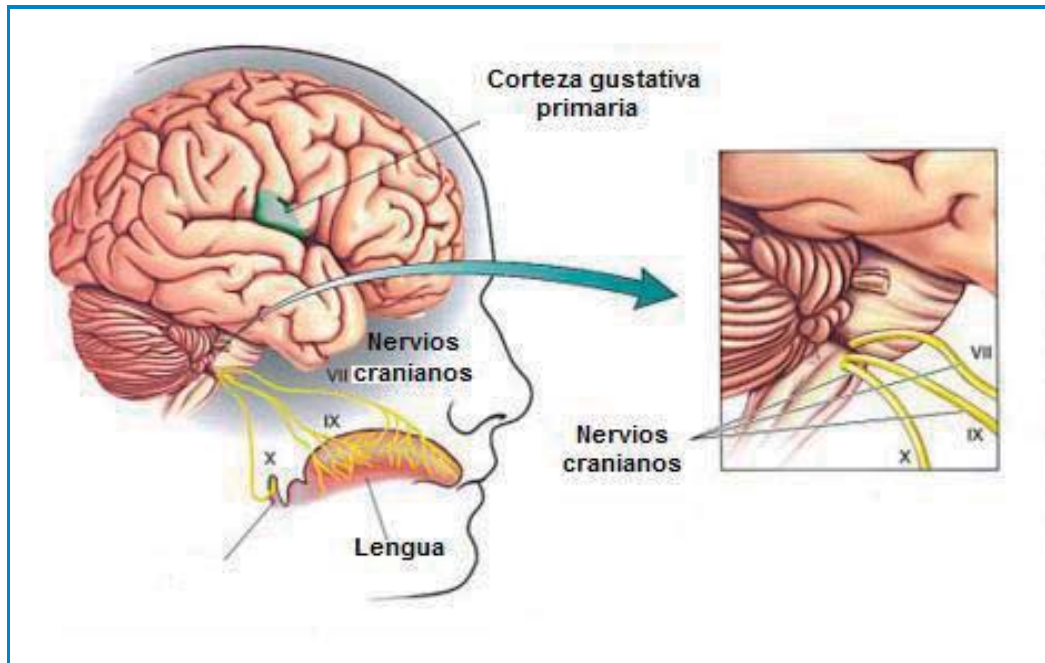


Fig. 6. Neuroanatomía del sistema gustativo.

La inervación por los nervios craneales permite transportar la información gustativa de las papilas a la corteza gustativa

(http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=1&materia_id=396&materiaver=1).

I.3.3. Desarrollo del sistema gustativo

En los mamíferos, los corpúsculos gustativos surgen del epitelio lingual, son mantenidos en una constante renovación celular y su integridad morfológica depende de su inervación. El promedio de vida de las células gustativas es de aproximadamente 10-14 días, esto significa que las células de las papilas

gustativas constantemente se desarrollan a partir de células progenitoras durante toda la vida, generando poblaciones de células heterogéneas (Miura *et al*, 2006).

En ratas, el desarrollo del sistema gustativo comienza entre el día embrionario 9.5 y 10 (E9.5-E10). Las papilas y corpúsculos gustativos provienen del endodermo, y su formación ocurre después de la aparición de las primeras fibras nerviosas en la lengua, al día embrionario 12.5 (E12.5). Sin embargo, los precursores de los corpúsculos gustativos en el epitelio lingual están presentes antes de la innervación (Mistretta *et al.*, 2005; Krim, 2007). Esto sugiere que este proceso no depende de las señales provenientes de las fibras nerviosas, ya que el corpúsculo gustativo desaparece progresivamente después de su denervación y reaparece seguido de la regeneración de las fibras nerviosas (Hamasaki *et al.*, 1998; Barlow, 1999). El proceso de innervación de las células gustativas comprende dos etapas, en la primera, los axones de las neuronas aferentes son orientados hacia la cavidad bucal. Después, las señales emitidas por los precursores de los corpúsculos gustativos controlan el sitio y desarrollo de las fibras sensoriales aferentes y las células gustativas. Las estructuras primarias de las papilas aparecen entre E14 y E15, comienzan a ser funcionales al nacimiento y termina de desarrollarse hasta que es adulto, la diferenciación del corpúsculo gustativo se da entre la etapa E16 y E20 y este comienza a ser funcional al nacimiento (Barlow, 1999; Krim, 2007).

Los factores de señalización involucrados en la morfogénesis epitelial en diversos tejidos son también expresados en la superficie de la lengua durante su desarrollo. Estos factores incluyen proteínas morfogénicas del hueso (Bmp), proteínas Noggin, factor de crecimiento para fibroblastos (FGF), Sox-2, entre otros. Otro factor recientemente propuesto en la participación del desarrollo del sistema gustativo es la 5-HT (Ortiz-Alvarado *et al.*, 2006).

I.3.4. Neurotransmisores implicados en la señalización gustativa

La participación de los neurotransmisores entre las células gustativas y las fibras nerviosas es complicada por varios factores. Cada corpúsculo gustativo contiene una variedad de tipos celulares, que probablemente se comuniquen unas con otras así como con las fibras nerviosas gustativas. Recientes estudios han sugerido la participación de algunos neurotransmisores a los cuales se les ha implicado en la señalización gustativa, como son: ATP y 5-HT (Finger *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005; 2009).

Se ha sugerido que la 5-HT es liberada en el corpúsculo gustativo y que el ATP juega un papel crucial para la comunicación del corpúsculo gustativo a los nervios gustativos al ser liberado por los corpúsculos gustativos en respuesta a un estímulo (Finger *et al.*, 2005; Chaudhari y Roper, 2010). Las células receptoras y células presinápticas liberan diferentes neurotransmisores. Las células receptoras se sabe liberan solo ATP, vía canales de panexina (Fig. 7), mientras que las células presinápticas por otro lado, secretan 5-HT y norepinefrina. La secreción de estas aminas biógenas parece ser una vía dependiente de Ca^{2+} .

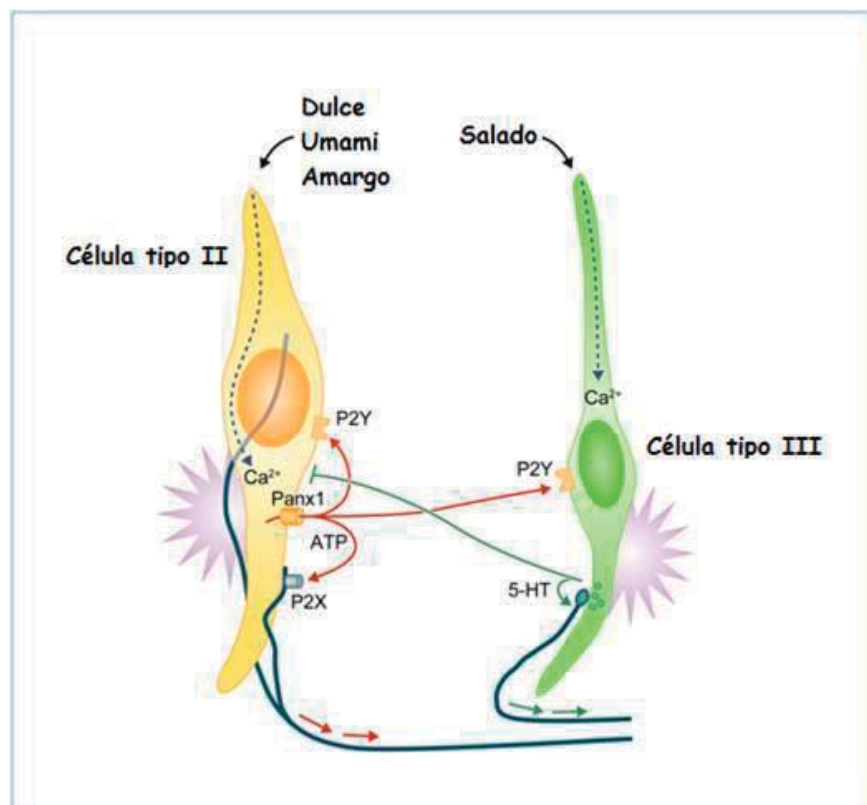


Fig. 7. Señalización gustativa.
(Modificada de Chandhari y Roper, 2010).

La estimulación gustativa inicia una secuencia de señales químicas en las células del corpúsculo gustativo. Cuando las células son estimuladas con moléculas dulces, amargas o umami, se secreta ATP de las células receptoras estimulando las fibras nerviosas aferentes gustativas. Al mismo tiempo, el ATP excita las células presinápticas adyacentes estimulando en ellas la liberación de 5-HT y/o NE. El ATP secretado durante la estimulación también tiene como objetivo actuar como un transmisor autocrino en las células receptoras aumentando su secreción y contrarrestando su degradación por ecto-ATPasas. Un efecto de la 5-HT es inhibir las células receptoras para que ya no se libere Ca^{2+} y por consiguiente ATP (Chaudhari y Roper, 2010).

I.4. La serotonina y el sistema gustativo periférico

En relación con el sistema gustativo, la presencia de 5-HT ha sido identificada en el órgano del gusto de los mamíferos. Técnicas de inmunohistoquímica han demostrado que la 5-HT está presente en células de tipo III de papilas foliadas y caliciformes en ratas, conejos y monos (Fujimoto *et al.*, 1987; Kim y Roper, 1995; Ren *et al.*, 1999; Seta, 2007; Suzuki, 2007), la cual se ha asociado a los procesos de transducción de la señal gustativa. Se encuentra también en células basales en corpúsculos gustativos de anfibios parece tener un papel trófico en el mantenimiento de la integridad morfológica del corpúsculo gustativo (Barlow *et al.*, 1996; Toyoshima *et al.*, 1999). Así mismo también se demostró la localización de la DLAA en el corpúsculo gustativo de ratón (Seta, 2007), enzima que participa en el paso final para la síntesis de 5-HT.

Usando anticuerpos específicos contra 5-HT en corpúsculos gustativos de la papila caliciforme de rata, se ha demostrado la localización del transportador de 5-HT (SET), se sugiere pueden jugar un papel modulador en el procesamiento de la información gustativa dentro del corpúsculo gustativo de ratón adulto (Ren *et al.*, 1999). Mediante técnicas de RT-PCR y de inmunohistoquímica se ha demostrado también la presencia de 5-HT y de los receptores serotoninérgicos en los corpúsculos gustativos de rata (Kaya *et al.*, 2004; Acosta, 2010). Estudios realizados en ratón en etapas embrionarias y en la adulta demuestran la presencia de la enzima limitante para la síntesis de 5-HT, la TPH (Ortiz-Alvarado *et al.*, 2006; Dvoryanchikov *et al.*, 2007). Todos estos antecedentes pudieran indicar la presencia de un sistema serotoninérgico en el sistema gustativo periférico.

II. JUSTIFICACIÓN

Evidencias experimentales han demostrado la presencia de 5-HT, de transportadores para la misma y enzimas que participan en su síntesis, en corpúsculos gustativos de diversas especies. Se ha propuesto que esta 5-HT en el corpúsculo gustativo participa en la transducción de señales gustativas para la percepción de las moléculas sápidas y probablemente, junto con otros factores, está participando como factor trófico en el desarrollo del sistema gustativo. Aun se desconoce el origen de la 5-HT, por lo que se propone que esta pueda ser sintetizada en células del sistema gustativo, de ser así, la enzima limitante para su síntesis, la TPH, estaría presente. Experimentos de RT-PCR en ratones, han demostrado la expresión de ambas isoformas de la TPH. Sin embargo actualmente se desconoce cuál isoforma de la TPH se expresa en la papila caliciforme de la rata así como su ontogenia, además, se desconoce si su expresión se modifica al estimular la síntesis de la serotonina mediante la administración de L-trp, y cuál sería su repercusión en los corpúsculos gustativos. Por lo cual planteamos la siguiente:

III. HIPÓTESIS

La papila caliciforme de la rata expresa el ARNm de la TPH y su expresión se modifica al estimular la síntesis de serotonina.

IV. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de estimular la síntesis de serotonina sobre la expresión del ARNm de la TPH en la papila caliciforme de la rata.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar cuál isoforma de la TPH está presente el corpúsculo gustativo de la rata.
- Determinar la expresión del ARNm de la TPH durante el desarrollo de la papila caliciforme de rata.
- Determinar si la estimulación de la síntesis de serotonina modifica la expresión del ARNm de la TPH en la papila caliciforme de la rata.
- Determinar si la estimulación de la síntesis de serotonina modifica la morfología y el número de corpúsculos gustativos de la papila caliciforme de la rata.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Animales y estrategia experimental

Se seleccionaron ratas hembras de la cepa Wistar, nulíparas, de dos meses de edad, las cuales se mantuvieron en ciclos de luz oscuridad de 12h (7-19 h), temperatura de 25°C, con agua y alimento *ad libitum*, estas fueron apareadas con machos control.

La mañana en la que a las hembras se les observó el tapón vaginal fue considerado como día embrionario 0 (E0) o inicio de la gestación. De las hembras que resultaron gestantes se formaron dos grupos, el grupo control y el grupo experimental. Durante la gestación ambos grupos se mantuvieron bajo condiciones ambientales y nutricionales estándar.

VI.1.1. Estimulación de la síntesis de serotonina

Para la administración del precursor de la 5-HT, L-Trp (sigma), el grupo experimental fue dividido a su vez en tres grupos. Al primer grupo se le administro 100 mg/kg de peso vía i.p. en dosis única al día embrionario 14 (E14), al día embrionario 15 se obtuvo la papila caliciforme de embriones para evaluar la expresión del ARNm de la TPH.

Al segundo grupo experimental se le administraron tres dosis de L-Trp en dosis de 100 mg/kg de peso vía i.p. recibiendo la primera dosis al día E14, la segunda al día E15 y la tercera al día E16 con 24 h de diferencia. La obtención de tejido para este grupo experimental fue el día 17 embrionario.

Al tercer grupo experimental se le administraron tres dosis de la misma manera que al segundo grupo. Las muestras fueron obtenidas para el día postnatal 30 (P30) y postnatal 60 (P60).

Al grupo control se le administró únicamente solución salina fisiológica.

VI.1.2. Obtención de la muestra

A los días E15, E17 de gestación las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical y fueron extraídos los embriones. Los embriones y ratas neonatas P0, y postnatales P30 y P60 fueron decapitados para obtener la lengua. A las lenguas obtenidas se les disecó por microdissección la papila caliciforme (Fig. 8), para determinar la expresión de las isoformas de la TPH mediante la técnica de RT-PCR en la papila caliciforme, tomando como control de expresión de las isoformas de la TPH al intestino (TPH1) y al tallo cerebral (TPH2).

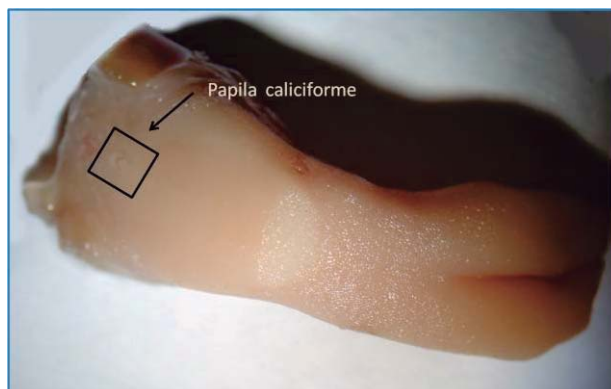


Fig. 8. Lengua de rata que muestra la ubicación de la papila caliciforme.

VI.2. Análisis de la expresión genética de la TPH

VI.2.1. Extracción del ARN total

Después de la disección, las papilas fueron introducidas en un tubo Eppendorf libre de ARNasas y ADNasas que contenía 1 ml del reactivo Trizol[®] (Invitrogen). El tejido fue homogeneizado y se adicionaron 200 µL de cloroformo por cada mililitro de Trizol[®] usado para homogeneizar. La mezcla se dejó reposando a temperatura ambiente por 15 min y se procedió a centrifugar a durante 15 min a 12,000 g a 4°C, el ARN fue separado de la fase acuosa y colocado en un tubo nuevo, al cual se le adicionó 500 µL de isopropanol por cada mililitro de Trizol[®]. Se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 10 minutos a 4°C. La muestra fue decantada y la pastilla depositada en el fondo se lavó con 1 mL de etanol al 75% y se centrifugo a 15,000 g durante 10 min a 4°C. Se eliminó el alcohol y se dejó secar el tubo durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente el ARN fue resuspendido en 20 µL de agua libre de ARNasas. El RNA obtenido fue digerido con DNasa I (sigma) para remover la contaminación por DNA, 1 unidad de DNasa por cada 8 µl de RNA total durante 30 minutos a 37°C. La concentración de ARN fue determinada por espectrofotometría a 260 y 280 nm en una dilución 1:100 con agua estéril.

VI.2.2. Reacción de retrotranscripción (RT)

Para la síntesis de DNAc se utilizaron tubos de 0.2 ml libres de nucleasa para un volumen final de reacción de 20 µl, al cual se adicionaron: 1 µl de Oligo (dT), 2 µl de dNTPs, 5 µg de RNA total, seguido por la adición de agua estéril para un volumen de 13 µl. La muestra fue calentada a 65°C por 5 min y posteriormente colocada en hielo. Después se adicionaron 4 µl de buffer 5x y 2 µl 0.1 M de DTT se mezclaron suavemente y fueron incubados 37°C por 2 min. Finalmente 1 µl de retrotranscriptasa fue adicionado, se mezcló y fue incubada a 37°C por 50 min. La

reacción fue inactivada a 70°C por 15 min. Para cada reacción se corrió un control en el cual la enzima transcriptasa reversa fue sustituida por agua, el cual fue identificado como RT negativo.

VI.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para determinar la expresión de la TPH, la reacción se llevó a cabo en un volumen total de 20 µL. En las reacciones donde se omitió la transcriptasa reversa se utilizaron como control en el análisis de expresión. Las condiciones usadas para la PCR fueron las siguientes: un paso inicial de activación de 5 min a 95°C, seguido por los siguientes pasos; desnaturalización por 45 s a 95°C, alineamiento por 45 s de 54°C a 59°C (54°C TPH1 y TPH2, 59°C actina) y extensión de 1 min a 72°C; estos pasos fueron repetidos por 38 ciclos, y un ciclo de 7 min a 72°C para inactivar la reacción.

En la tabla 1 se presentan los oligonucleótidos utilizados para amplificar fragmentos específicos de ambas isoformas de TPH y de actina utilizada como control interno.

Tabla. 1. Oligonucleótidos específicos para las isoformas de la TPH y β -actina.

Oligonucleótido	Secuencia
TPH1 (sentido)	5' CAA GGA GAA CAA AGA CCA TTC 3'
TPH1 (antisentido)	5' ATT CAG CTG TTC TCG GTT GAT G 3'
TPH2 (sentido)	5' TAA ATA CTG GGC CAG GAG AGG 3'
TPH2 (antisentido)	5' GAA GTG TCT TTG CCG CTT CTC 3'
Actina (sentido)	5' AGC GCT TCC GGT GTC CA 3'
Actina (antisentido)	5' GGC TGT GAT CTC CTT CT 3'

La talla esperada del fragmento amplificado para la TPH1 es de 208 pb, para la TPH2 es de 132 pb y para β -actina de 200 pb. Los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, en el cual se colocaron 9 μ L de los productos de la PCR y 2 μ L de buffer de corrida, el tiempo de corrida fue de 150 minutos a 80V. Las bandas obtenidas fueron observadas con luz UV, con un marcador de referencia de tamaño molecular de 100 pb por fragmento (Sigma).

VI.3. Conteo de corpúsculos gustativos

Los animales tratados con L-trp y controles fueron sacrificados mediante fracción cervical, realizando una perfusión con solución salina al 0.9%. Se les extrajo la lengua, la cual fue fijada en paraformaldehído (PAF) al 4% en solución de amortiguadora de fosfatos (PBS) durante 24 h a 4°C. Posteriormente se lavaron con PBS para eliminar los restos de PAF. Acto seguido se les colocó en una solución de sacarosa a concentraciones de 10, 20 y 30% diluida en PBS, cada lengua fue tratada durante 24 h para cada una de las concentraciones de sacarosa a una temperatura de 4°C (Fig. 9).

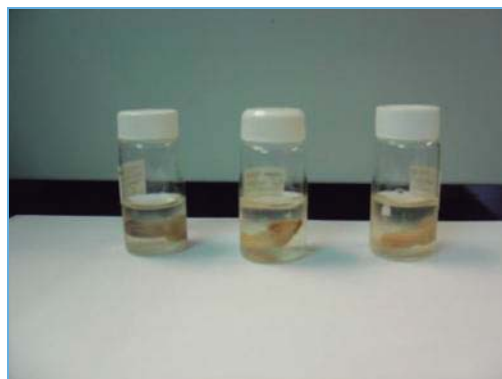


Fig. 9. Frasco con lenguas de rata en solución de sacarosa.

El paso siguiente fue disecar las papilas, se orientaron en OCT, un compuesto que se utiliza para fijar tejido en frío, y se almacenaron a -70°C , para después realizar los cortes en un criostato a $16\text{ }\mu\text{m}$ de espesor, los cuales fueron colocados en laminillas para ser teñidas por la técnica de hematoxilina-eosina. Se determinó el número de corpúsculos gustativos de la papila caliciforme por el método de Bradley *et al.* (1980).

VI.4. Análisis estadístico

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

VI.5. Análisis de expresión de la TPH

Para el análisis de expresión de la TPH se realizaron los experimentos de PCR por triplicado. El análisis se realizó mediante densitometría con el programa “Image J” 1.42, en la cual se midió la densidad óptica de las bandas obtenidas en los geles de agarosa usando como referencia la expresión de la β -actina.

VII. Resultados

VII.1. Prueba de eficiencia de extracción

Para probar si la extracción se realizó de una manera correcta utilizamos al gen constitutivo β -Actina, el cual al ser amplificado por PCR da un producto correspondiente a 200pb. Las bandas para β -Actina fueron detectadas después de 38 ciclos para tallo cerebral, intestino y papila (Fig. 10).

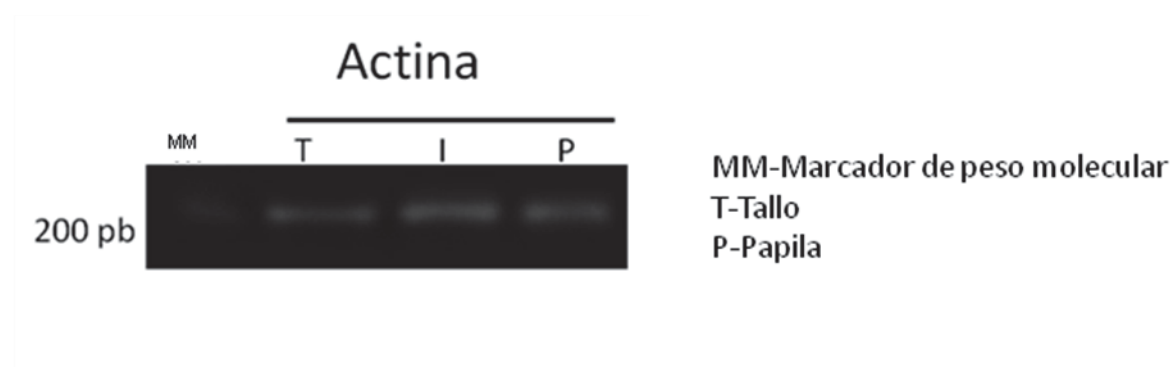


Fig. 10. Productos de amplificación del gen β -actina.

Además de esto, la expresión de β -Actina de las diferentes etapas de desarrollo empleadas en el experimento (Fig. 11) y en los tejidos de control de expresión no varió significativamente, lo que indica que el gen constitutivo β -Actina es adecuado para utilizarlo como un control interno de expresión.

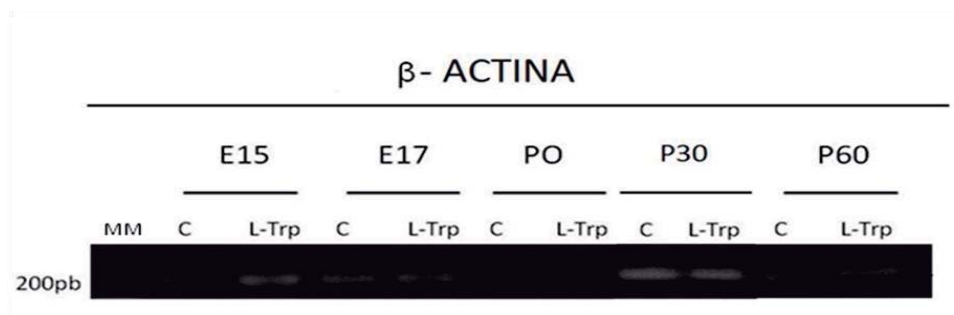


Fig. 11. Productos de amplificación del gen β -Actina durante el desarrollo de la papila caliciforme de rata.

VII.2. Expresión del gen TPH en el tejido de control

El gen de la enzima TPH se sabe que se expresa en dos isoformas, la TPH1 y TPH2, el tejido control de expresión usado para la isoforma de la TPH1 fue intestino y para la isoforma TPH2 se utilizó el tallo cerebral, esto es debido a que la primera isoforma se expresa en glándula pineal y células enterocromafines del intestino, mientras que la segunda es responsable de la síntesis de 5-HT en el SNC (Walther y Bader, 2003). Las bandas en el gel de electroforesis de los productos de amplificación fueron del tamaño esperado. Para el tallo (TPH2) de 132pb y para intestino (TPH1) 208pb. Los productos fueron corridos en un gel de agarosa al 1.5% (Fig. 12).

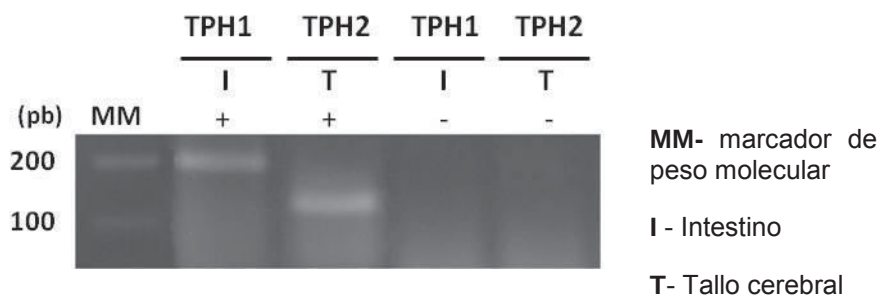


Fig. 12. Productos de amplificación en tejido de expresión control.

VII.3. Expresión de la TPH en la papila caliciforme de rata.

Para el análisis de expresión de la TPH se realizaron los experimentos de PCR por triplicado, los geles fueron analizados con el programa “Image J” para determinar si existe diferencia en la densitometria de las muestras administradas con L-Trp con respecto a su control.

La Figura 13 muestra los productos de amplificación de la PCR del grupo control y del grupo administrado con L-Trp. Se observo la expresión de la isoforma para el gen TPH1 en la papila caliciforme de rata desde el día E15 y se mantiene la expresión hasta la etapa adulta, teniendo un tamaño esperado de 208pb (Fig. 13).

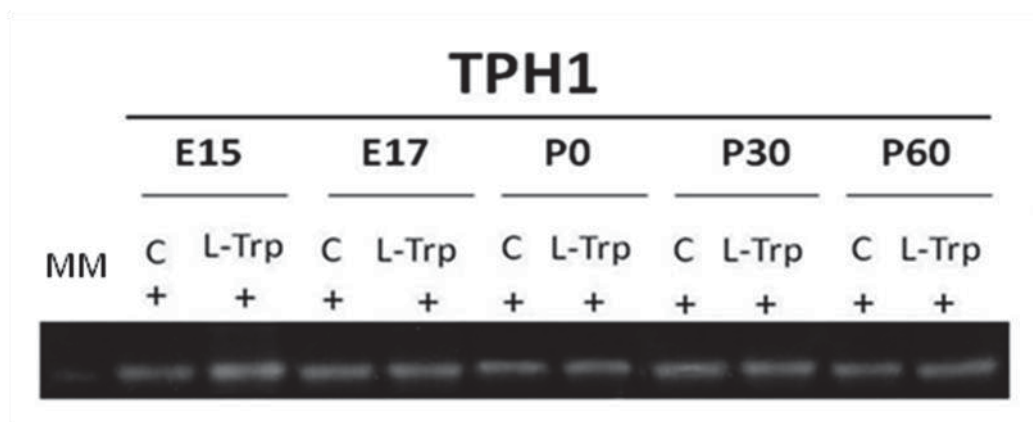


Fig. 13. Productos de PCR para el gen de la TPH1.

VII.3.1. Expresión relativa para la isoforma del ARNm de la TPH1 al día E15.

La Figura 14 Muestra la expresión del RNAm de la TPH1 en la papila caliciforme de la rata al día E15, es decir un día después de la primera administración de L-Trp. Se puede observar que a esta etapa del desarrollo la expresión de la TPH en el grupo administrado con L-Trp es mayor con respecto a su control (*P<0.05).

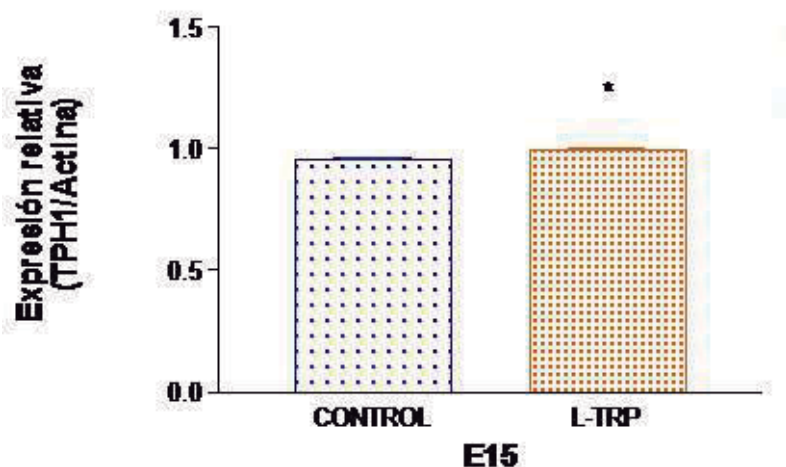


Fig. 14. Expresión relativa del ARNm de la TPH1 en la papila caliciforme de la rata al día E15.
 $\bar{X} \pm D.E.$ n=12/grupo.

VII.3.2. Expresión relativa para el ARNm de la TPH1 al día E17.

La Figura 15 Nos muestra la expresión relativa del RNAm de la TPH1 en la papila caliciforme de la rata al día E17, un día después de administrar la segunda dosis de L-Trp (día E15 primera dosis, día E16 segunda dosis). No existió diferencia estadísticamente significativa en la expresión de la TPH en el grupo administrado con L-Trp con respecto a su control.

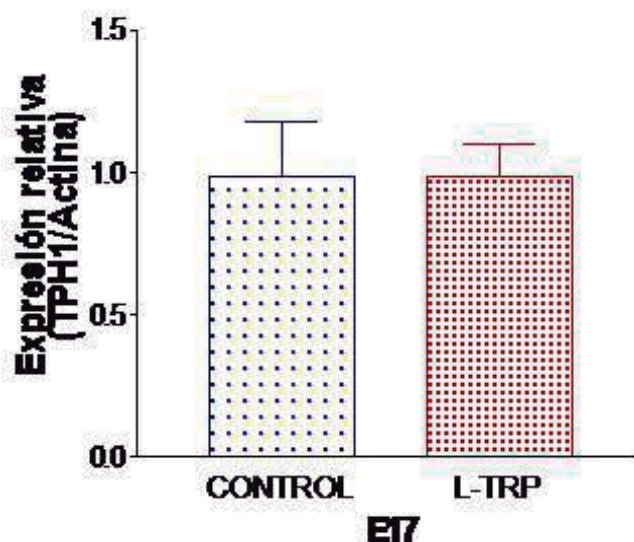


Fig. 15. Expresión relativa del ARNm de la TPH1 en la papila caliciforme de la rata al día E17.
 $\bar{X} \pm D.E.$ $n=10/\text{grupo}$.

VII.3.3. Expresión relativa para la el ARNm de la TPH1 al día P0.

Al día del nacimiento, las papilas de las crías recibieron el mismo procedimiento que las muestras anteriores para medir la expresión del RNAm de la TPH1 (Fig. 16), la densitometría para esta etapa del desarrollo mostró que existe una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de la TPH1 al día P0 del grupo administrado con L-Trp con respecto a su control (* $P < 0.0001$).

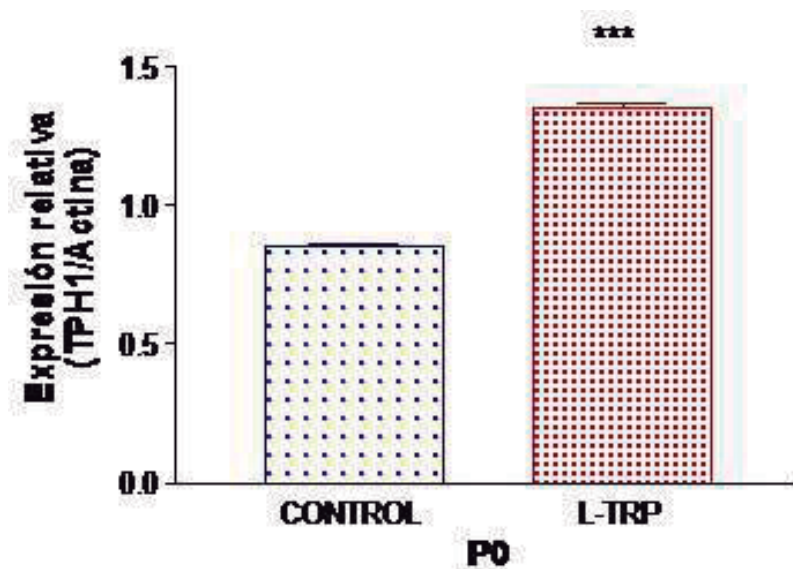


Fig. 16. Expresión relativa del ARNm de la TPH1 en la papila caliciforme de la rata al día P0.
 $\bar{X} \pm D.E.$ n=8/grupo.

VII.3.4. Expresión relativa para el ARNm de la TPH1 al día P30.

La expresión relativa de la TPH1 con respecto a β -Actina para el día postnatal 30 se muestran en la Figura 17, donde se puede observar que no hay diferencia en la expresión de la enzima. Estos valores parecen mantenerse hasta la etapa P60.

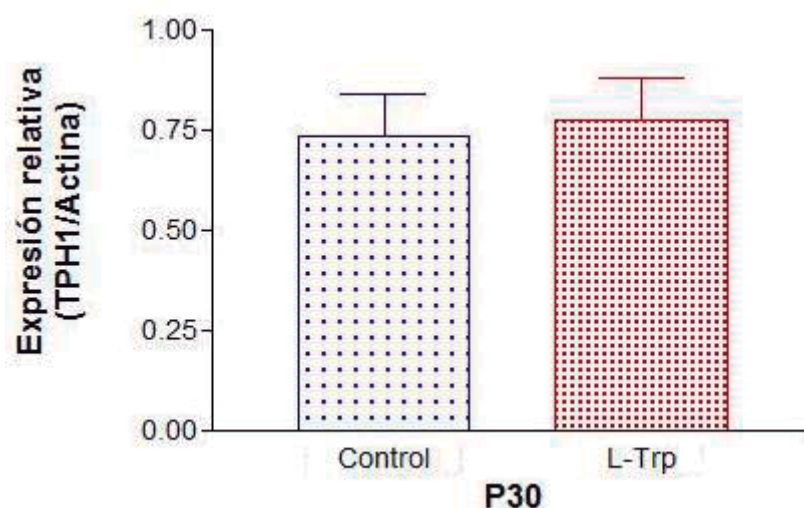


Fig. 17. Expresión relativa del ARNm de la TPH1 en la papila caliciforme de la rata al día P30.
 $\bar{X} \pm D.E.$ $n=6/\text{grupo}$.

VII.3.5. Expresión relativa para el ARNm de la TPH1 al día P60.

La expresión relativa para el ARNm de la TPH1 al día P60 en el grupo administrado con L-Trp no mostro diferencia estadísticamente significativa con respecto a su control (Fig. 18).

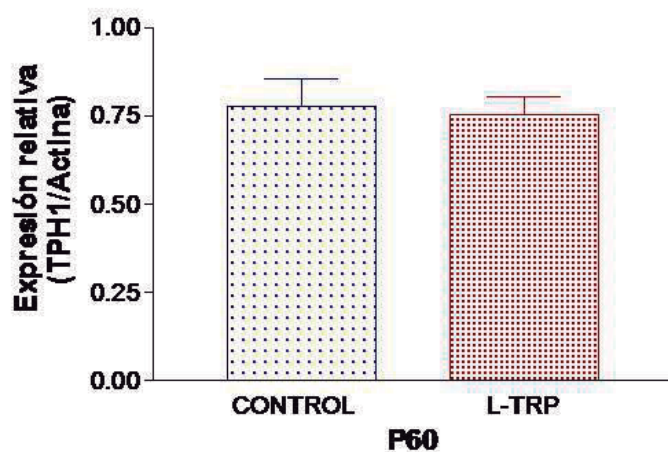


Fig. 18. Expresión relativa del ARNm de la TPH1 en la papila caliciforme de la rata al día P60.
 $\bar{X} \pm D.E.$ n=6/grupo.

VII.3.6. Expresión de la TPH2 en papila caliciforme de rata.

En relación a la expresión del RNAm de la TPH2 en la papila caliciforme de la rata los resultados obtenidos hasta ahora no muestran expresión del mismo (Fig. 18).

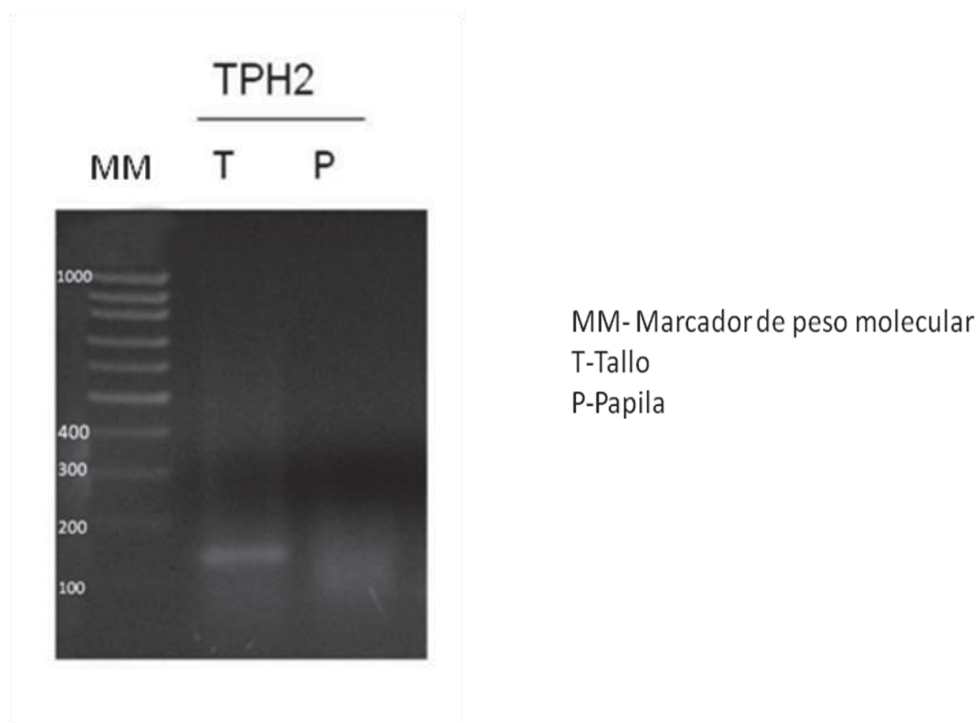


Fig. 19. Amplificación de los productos de PCR para el gen de la TPH2 en la papila caliciforme de rata.

VII.4. Número de Corpúsculos gustativos.

Si la 5-HT participa como un factor trófico en el sistema gustativo (existen otros factores además de la 5-HT), al administrar un precursor para su síntesis como el L-Trp y verse alterada su síntesis, pudiera existir un cambio en el desarrollo del sistema gustativo. Para evaluar tal efecto, se procedió a cortar las papilas gustativas en un criostato a 16µm de espesor y contar el número de corpúsculos gustativos según el método de Bradley (Bradley *et al.*, 1980).

Los resultados muestran una disminución en el número de corpúsculos gustativos en un 55% en P0, en P30 no hay diferencia, pero el valor en el grupo tratado con L-Trp se mantiene hasta P60 donde se observa una disminución de 23% (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$).

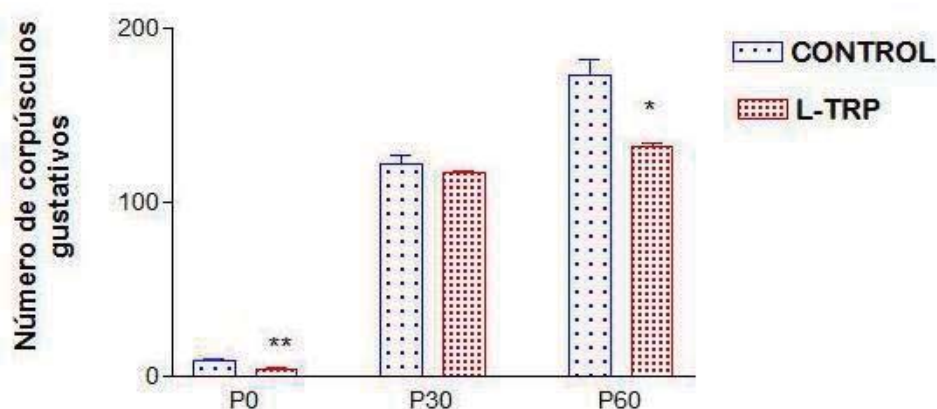


Fig. 20. Número de corpúsculos gustativos en etapas postnatales.

En las Figuras 21 y 22 se observa la papila caliciforme en la etapa adulta y en la etapa P0 respectivamente, con un acercamiento a los corpúsculos gustativos cuantificados mostrados en la figura 20.

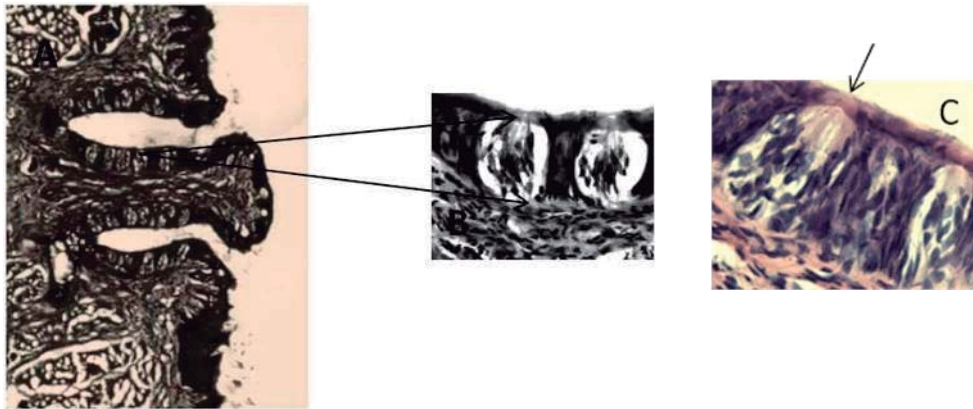


Fig. 21. Fotografía de papila caliciforme de rata adulta
A) Foto que muestra la ubicación de los corpúsculos gustativos B) Acercamiento a los corpúsculos gustativos C) El poro gustativo está indicado con la flecha.

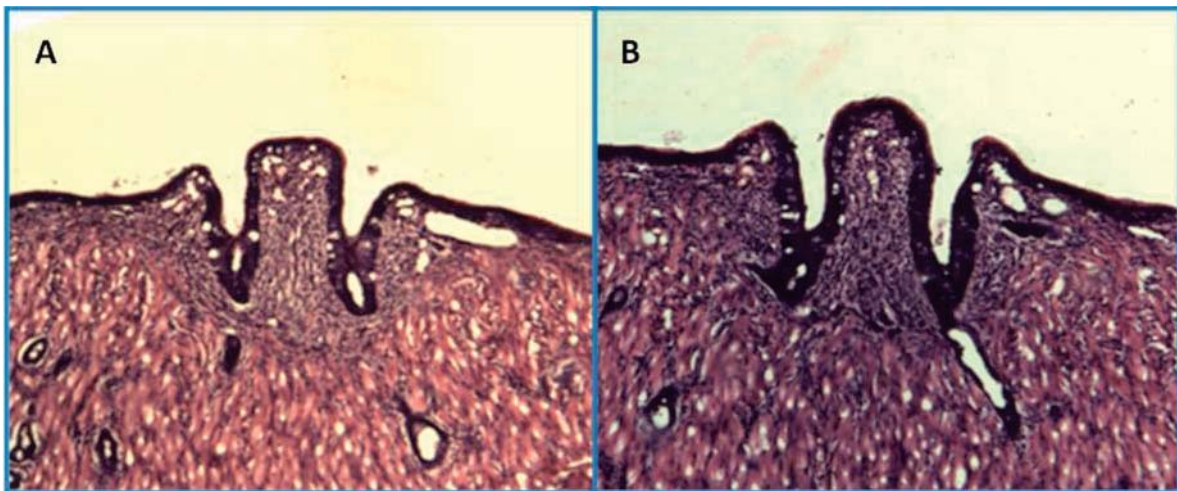


Fig. 22. Fotografía de papilas caliciformes a P0.
A) papila control. B) papila L-Trp

Con respecto a la morfología no se observaron cambios aparentemente.

VIII. Discusión

La TPH es la primera enzima en la síntesis de 5-HT. Esta enzima está presente en el organismo en 2 isoformas: TPH1 y TPH2. La primera isoforma se expresa en la glándula pineal y las células enterocromafines del intestino, mientras que la segunda es la responsable de la síntesis de 5-HT en el SNC (Walther y Bader 2003).

En este trabajo experimental se demostró la expresión de la TPH1 en etapas tempranas del desarrollo del sistema gustativo y en la etapa adulta en ratas Wistar y que esta expresión se modifica tras la administración de L-Triptófano en etapas claves del desarrollo del sistema gustativo.

Para determinar la expresión del gen de la TPH en el sistema gustativo periférico, específicamente en los corpúsculos gustativos, se empleó la técnica de RT-PCR. Los resultados muestran la expresión de la TPH1 desde el día embrionario número 15 y hasta alcanzar la etapa adulta (P60) tanto en el grupo control como en el administrado con L-Trp, mostrando un incremento significativo en la expresión de la TPH en el grupo administrado con el precursor de la síntesis de 5-HT, al día E15 y al día del nacimiento con respecto al grupo control. Se ha observado que en condiciones fisiológicas normales, la TPH no está totalmente saturada, por lo que la síntesis de 5-HT y la actividad de la enzima pueden ser incrementadas al administrar el precursor L-Trp (Chagoya y Hernández, 1983; Seta *et al.*, 2007). La presencia de esta enzima en los corpúsculos gustativos a etapas tempranas del desarrollo indica primero que existe síntesis de serotonina en el epitelio lingual, esto aunado a datos en la literatura que muestran la presencia de receptores serotoninérgicos (Kaya *et al.*, 2004; Acosta y Mercado, 2010), transportadores de serotonina (Ren *et al.*, 1999), apoya la hipótesis de la presencia de un sistema serotoninérgico inherente al epitelio lingual (Ortiz-Alvarado *et al.*, 2006), segundo, que la serotonina podría estar regulando el

proceso de desarrollo de los corpúsculos gustativos, tal como lo sugiere Barlow (1999), quien muestra que el desarrollo del corpúsculo gustativo es independiente de la innervación para su diferenciación. Hamasaki *et al.* (1998) sugieren que la 5-HT presente en células basales de los corpúsculos gustativos, es la responsable de mantener la integridad morfológica de los corpúsculos gustativos, ya que al administrar a un grupo de ranas *p*-clorofenilalanina (PCPA), un inhibidor de la TPH, observo la disminución o ausencia de la 5-HT, mientras que a otro grupo al cual le realizo una denervación cortando los nervios gustativos, observo presencia de 5-HT, además de cambios degenerativos en los corpúsculos gustativos del grupo administrado con PCPA. Experimentos realizados por Acosta y Mercado (2010) también muestran cambios morfológicos en la papila caliciforme de rata, tras la administración repetida de PCPA durante la etapa de gestación de la rata. Delay (1997) propone que la 5-HT tiene papel de factor trófico en las células basales de corpúsculos gustativos del *necturus*, estos datos apoyan la hipótesis de la 5-HT como factor trófico en el sistema gustativo periférico.

La 5-HT en el sistema gustativo, además de las funciones anteriores, actúa como neurotransmisor y como neuromodulador en la transducción de las señales para la percepción gustativa en la etapa adulta, la cual se lleva a cabo cuando la célula receptora (tipo II) es estimulada por las moléculas sápidas. Esa estimulación origina que secrete ATP, este ATP actúa en las fibras aferentes sensoriales así como en las células presinápticas (tipo III), causando la posterior liberación de 5-HT (fig. 7), la cual se ha propuesto es el neurotransmisor para la sinapsis en los corpúsculos gustativos, además de modular la liberación de ATP de las células presinápticas (Chaudhari y Roper, 2010; Roper, 2007). Estos antecedentes sugieren que la TPH expresada en etapas tempranas del desarrollo tiene un papel en la síntesis de 5-HT que participa como factor trófico, además de ser la responsable del mantenimiento de la integridad morfológica de los corpúsculos gustativos. Mientras que la TPH expresada en etapas postnatales podría indicar su participación en la síntesis de 5-HT como neurotransmisor y neuromodulador en la transducción de las señales para la percepción gustativa.

Experimentos realizados en ratones muestran la expresión de ambas isoformas (TPH1 y TPH2) en la papila caliciforme, y la enzima predominante es la TPH2 (Ortiz-Alvarado *et al.*, 2006; Dvoryanchikov *et al.*, 2007; Guzmán *et al.*, 2007). Interesantemente nosotros no encontramos la expresión de la TPH2 en la papila caliciforme de la rata.

Teniendo en cuenta el papel de la 5-HT como factor trófico en el sistema gustativo, se evaluó el número de corpúsculos gustativos de la papila caliciforme de rata para observar si existía alguna diferencia tras la administración de L-Trp en etapas claves del desarrollo del sistema gustativo.

Del estudio cuantitativo del número los corpúsculos gustativos, es evidente que aún cuando se observan corpúsculos gustativos al día del nacimiento, no se observa el poro gustativo, lo cual indica que aún son inmaduros, pero serán fortalecidos en su función por la leche materna tal como lo sugieren Rubio *et al.* (2011). Además, de que el número de corpúsculos gustativos en el grupo tratado con L-Trp siempre se mantuvo por debajo del grupo control. La disminución en el número de corpúsculos gustativos en el grupo tratado con L-Trp con respecto al grupo control y por lo tanto el incremento de 5-HT por la administración de L-Trp apoya la hipótesis de la participación de la 5-HT como neuromodulador del desarrollo de los corpúsculos gustativos.

En la etapa P30, el grupo control incremento el número de corpúsculos gustativos con respecto a P0, y aunque el corpúsculo gustativo parece ser maduro morfológicamente en esta etapa, continúa desarrollándose e incrementando en número hasta alcanzar la etapa adulta (Rubio *et al.*, 2011). Este incremento en el número de corpúsculos gustativos en el grupo control de P30 a P60 es normal, y podría deberse a que las crías, a partir del día 23 posnatal, entran en un periodo de transición entre la leche y la ingesta de alimento sólido, lo que permite que el sistema gustativo se desarrolle normalmente. No así en el grupo tratado con L-Trp, el cual desde P0 se mantiene por debajo del grupo control, aun cuando

incrementa de P0 a P30, mientras que de P30 a P60 no hay diferencia significativa en el número de corpúsculos gustativos (fig.20).

Con los resultados obtenidos podemos sugerir un mecanismo probable por el cual se disminuye el número de corpúsculos gustativos. Al administrar el L-Trp en etapas clave del desarrollo de la papila caliciforme de la rata, es de esperarse que incremente la síntesis de serotonina. Meneloga *et al.* (2004) observaron que ante un exceso de serotonina se inhibe la capacidad de diferenciación celular. El mecanismo probable es que sea a través del receptor 5-HT_{2B} el cual se sabe que participa en el desarrollo del corazón (Nabigil *et al.*, 2000) y está presente en la papila caliciforme de la rata en etapas tempranas del desarrollo del sistema gustativo (Acosta y Mercado, 2010).

En nuestro estudio, el desarrollo del corpúsculo gustativo, es diferente en el grupo en el cuál se estimulo la síntesis de 5-HT. En cuanto a los valores obtenidos en este grupo no existen referencias anteriores con los que se pudieran comparar.

IX. Conclusión

La papila caliciforme de la rata expresa solamente la TPH1 y la serotonina modifica su expresión y el número de corpúsculos gustativos.

X. Bibliografía

- Acosta, C.J. 2010. **Neurontogenia de los receptores serotoninérgicos en la papila caliciforme.** (Tesis de Maestría). Fac. De Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 67pp.
- Abumaria, N., Ribic, A., Anacker, C., Fuchs, E. and Flüggé, G. 2008. **Stress Upregulates TPH1 but not TPH2 mRNA in the Rat Dorsal Raphe Nucleus: Identification of Two TPH2 mRNA Splice Variants.** *Cell Mol Neurobiol.* 28:331-342.
- Barlow, L.A. 1999. **A taste for development.** *Neruron*, 22: 209-212.
- Barlow, L.A., Chien, C.B. and Northcutt, R.G. 1996. **Embryonic taste buds develop in the absence of innervation.** *Development*, 122: 1103–1111.
- Berger, M., Gray, J.A. and Roth, B.L. 2009. **The expanded biology of serotonin.** *Annu. Rev. Med.* 60: 355-366.
- Bigiani, A. 2001. **Mouse taste cells with glial like membrane properties.** *J. Neurophysiol.* 85, 1552-1560.
- 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.
- Buznikov, G.A., Lambert, H.W. and Lauder, J.M. 2001. **Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis.** *Cell Tissue Res.* 305: 177–186.
- Buznikov, G. A., Peterson, R.E., Nikitina, L.A., Bezuglov, V.V., and Lauder, J. M. 2005. **The pre-nervous serotonergic system of developing sea urchin embryos and larvae: pharmacologic and immunocytochemical evidence.** *Neurochem. Res.* 30:825-837.
- 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., Honn, M.A., Ryba, J.P. & Zuker, C.S. 2006. **The receptors and cell for mammalian taste.** *Nature*, 444: 288-294.
- Chandrashekar, J., Yarmolinsky, D. von Buchholtz, L. Oka, Y. Sly, W., Ryba, N.J. and Zuker, C.S. 2009. **The taste of carbonation.** *Science*, 326:443–445.

- Chaudhari, N. and Roper, S.D. 2010. **The cell biology of taste.** *J. Cell Biol.* 190 (3): 285–296.
- Colas, J.F., Launay, J.M., Vonesch, J.L., Hickel, P., and Maroteaux, L. 1999. **Serotonin synchronises convergent extension of ectoderm with morphogenetic gastrulation movements in *Drosophila*.** *Mech. Dev.* 87: 77–91.
- DeFazio, R.A., Dvoryanchikov, G., Maruyama, Y., Kim, J.W., Pereira, E., Roper, S.D. and Chaudhari, N. 2006. **Separate populations of receptor cells and presynaptic cells in mouse taste buds.** *J. Neurosci.* 26:3971–3980.
- Delay, R.T., Kinnamon, S.C., and Roper, S.D. 1997. **Serotonin modulates voltage-dependent calcium current in *Necturus* taste cells.** *J. neurophysiol.* 77:2515-2524.
- Dvoryanchikov, G., Tomchik, S. M. and Chaudhari, N. 2007. **Biogenic Amine Synthesis and Uptake in Rodent Taste Buds.** *J. Comp. Neurol.* 505:302-313.
- Erickson, J.D., Schafer MK, Bonner, T.I., Eiden, L.E. and Weihe, E. 1996. **Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter.** *Proc Natl Acad Sci* 93:5166-5171.
- Finger, T.E. Danilova, V., Barrows, J., Bartel, D.L., Vegers, A.J., Stone, L., Hellekant, G., Kinnamon, S.C. 2005. **ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves.** *Science*, 310:1495-1499.
- 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.
- Gershon, M.D. 2004. **Serotonin receptors and transporters-roles in normal and abnormal gastrointestinal motility.** *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20:3-14.
- Gershon, M.D., Sherman, D.L., Pintar, J.E. 1990. **Type-specific localization of monoamine oxidase in the enteric nervous system: relationship to hydroxytryptamine neuropeptides and sympathetic nerves.** *J. Comp. Neurol.*, 301:191-213
- Gerson, M. D. and Tack, J. 2007. **The Serotonin Signaling system: From basic understanding to drug development for functional GI Disorders.** *Gastroenterology*, 132:397-414

- Guzmán, Q.O., Hernández, G. Z. and Mercado, C. R. 2007. **Participación de la serotonina en el desarrollo de las papilas gustativas de ratones.** (Tesis de maestría. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 84pp.
- Hamasaki, K., Seta, Y., Yamada, K., and Toyoshima, K. 1998. **Possible role of serotonin in Merkel-like cells basal of the taste buds of the frog, *rana nigromaculata*.** *J. Anat.* 193: 599-610.
- Hansson, S.R., Mezey, E. and Hoffman, B.J. 1999. **Serotonin transporter messenger RNA expression in neural crest-derived structures and sensory pathways of the developing rat embryo.** *Neurosci.* 89: 243–265.
- Huang, Y.J., Maruyama, Y., Lu, K.S., Pereira, E., Plonsky, I., Baur, J.E., Wu, D., and Roper, S.D. 2005. **Mouse taste buds use serotonin as a neurotransmitter.** *J Neurosci.* 25:843-847.
- Huang, Y.J., Dando, R., and Roper, S.D. 2009. **Autocrine and Paracrine Roles for ATP and Serotonin in Mouse Taste Buds.** *J. Neurosci.*, 29(44):13909–13918.
- Kaya, N., Shen, T., Lu, S-G., Zhao, F-L. and Herness. S. 2004. **A paracrine signaling role for serotonin in rat taste buds: expression and localization of serotonin receptor subtypes.** *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286:R649-R658.
- Kim, D.J. and Roper, S.D. 1995. **Localization of serotonin in taste buds: a comparative study in four vertebrates.** *J. Comp. Neurol.* 353 (3): 364-370.
- Krim, R.F. 2007. **Factors that regulate embryonic gustatory development.** *BMC Neuroscience*, 8 (3):1-18.
- Lauder, J. M., Wallace, J. A., and Krebs, H. 1981. **Roles for serotonin in neuroembryogenesis.** *Adv. Exp. Med. Biol.* 133: 477–506.
- Martínez, A., Knappskog, P. M. and Haavik, J. 2001. **A structural approach into human tryptophan hydroxylase and its implications for the regulation of serotonin biosynthesis.** *Curr. Med. Chem.* 8, 1077-1091.
- McKinney, J., Teigen, K., Froystein, N.A., Salaun, C., Knappskog, P. M., Haavik, J. and Martínez, A. 2001. **Confirmation of the substrate and pterin cofactor bound to human tryptophan hydroxylase. Important role of Phe313 in substrate specificity.** *Biochemistry*, 40,15591-15601.

- Menegola, E., Broccia, M.L., Di renzo, F., Massa, V. and Giavini, E. (2004). **Effects of excess and deprivation of serotonin on in vitro neuronal differentiation.** *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 40:52-56.
- Mercado, C. R. and Hernández 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.
- Mistretta, C.M., Gringaliunas, A., and Liu, H. 2005. **Development of Gustatory Organs and innervating Sensory Ganglia.** *Chem. Senses*, 30:i52-i53.
- Mistretta, C.M. and Liu, H-L. 2006. **Development of fungiform papillae: Patterned lingual gustatory organs.** *Arch. Histol. Cytol.* 69(4): 199-208.
- Miura, H., Kusakabe, Y. and Harada, S. 2006. **Cell lineage and differentiation in taste buds.** *Arch. Histol. Cytol.* 69: 209-225.
- Nabigil, C., Choi D-S, Dierich, A., Hickel, P., Le Meur, M., Messaddeq, N., Launay J-M., and Maroteaux, L. 2000. **Serotonin 2B receptor is required for heart development.** *PNAS.* 17: 9508-9513.
- Nakamura, K., and Hasegawa, H. 2007. **Developmental Role of Tryptophan Hydroxylase in the Nervous System.** *Mol. Neurobiol.* 35: 45-53.
- Nakamura, K., and Hasegawa, H. 2009. **Role of Production and Degradation of serotonin During Development.** *Open Neurosci. J.* 3: 35-39.
- Ortiz-Alvarado R., Guzmán-Quevedo O., Mercado-Camargo R., Heartle T., Vignes T. and Bolaños-Jiménez, F. 2006. **Expression of Tryptophan Hydroxylase in developing mouse taste papillae.** *FEBS Letters*, 580: 5371-5376
- Ren, Y., Shimada, K., Shirai, Y., Fujimiya, M., and Saito, N. 1999. **Immunocytochemical localization of serotonin and serotonin transporter (SET) in taste buds of rat.** *Molecular Brain Research.* 74: 221-224
- Roper, S.D. 2006. **Cell communication in taste buds.** *Cellular and Molecular Life Science.* 63; 1494-1497
- Roper, S.D. 2007. **Signal transduction and information processing in mammalian taste buds.** *Eur J Physiol.* 454: 759-776.
- Royer, S.M., and Kinamon, J.C. 1991. **HVEM serial-section analysis of rabbit folate taste buds. I. Type III and their synapses.** *J. comp. Neurol.* 306:49-72.

- Rubio, N. L., Torrero, C., and Salas, M. 2011. **Basic brainstem taste responsivity: effects of perinatal influences.** *Revista eNeurobiología* 2(1):090511
- Seta, Y., Kataoka, S., Toyono, T. and Toyoshima, K. 2007. **Immunohistochemical localization of aromatic L-amino acid decarboxylase in mouse taste buds and developing taste papillae.** *Histochem Cell Biol.* 127:415-422
- Simon, S. A., Araujo, E.I., Gutierrez, R. and Nicolelis, M.A. 2006. **The neural mechanisms of gustation: a distributed processing code.** *Nature*, 7: 891-901
- Sirek, A. and Sirek, O. V. 1970. **Serotonin: A Review.** *C.M.A. Journal*, 102:846-849.
- Sugden, D. 2003. **Comparison of circadian expression of tryptophan hydroxylase isoform mRNAs in the rat pineal gland using real-time PCR.** *J. Neurochem.* 86: 1308-1311.
- Sugita, M. 2006. **Taste perception and coding in the periphery.** *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (17): 2000-2015.
- Suzuki, T. 2007. **Cellular Mechanisms in Taste Buds.** *Bull. Tokyo Coll.* 48:151-161.
- Tomchik, S.M., Berg, S., Kim, J.W., Chaudhari, N., and Roper S.D. 2007. **Breadth of tuning and taste coding in mammalian taste buds.** *J. Neurosci.* 27:10840–10848.
- Toyoshima, K., Seta, Y., Toyono, T. and Takeda, S. 1999. **Merkel cells are responsible for initiation of taste organ morphogenesis in the frog.** *J. Comp. Neurol.* 406: 129-140.
- Ueda, K., Ichimori, Y., Okada, H., Honma, S., and Wakisaka, S. 2006. **Immunolocalization of SNARE proteins in both type II and type II cells of rat taste buds.** *Arch. Histol. Cytol.* 69 (4): 289-296.
- Vandenbeuch, A. and Kinnamon, S.C. 2009. **Why do taste cells generate action potentials?** *Journal of Biology*, 8:42.1- 42.5
- Vitalis, T., Cases, O., Passemard, S., Callebert, J., and Parnavelas, J.G. 2007. **Embryonic depletion of serotonin affects cortical development.** *European Journal of Neuroscience*, 26: 331-344.

Walther, C. J. and Bader, M. 2003. **A unique central tryptophan hydroxylase isoform.** *Biochem. Pharmacol.* 66: 1673-1680.

Whitaker, A.P. 1999. **The discovery of serotonin and its role in neuroscience.** *Science*, 21:2s-8s.

Yoshida, R., Yasumatsu, K., Shigemura, N. and Ninomiya, Y. 2006. **Coding channels for taste perception: information transmission from taste cells to gustatory nerve fibers.** *Arch Histol Cytol.* 69: 233-242.

http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=1&materia_id=396&materiaver=1