



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE
HIDALGO**



**ESCUELA DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA
LABORATORIO DE NEUROBIOLOGIA**

**TITULO DE TESIS:
ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE PCR PARA LA
DETECCION DE RECEPTORES SEROTONINERGICOS EN
PAPILAS GUSTATIVAS**

**TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

PRESENTA: P.Q.F.B. JAIME ACOSTA CHAVEZ

**ASESORES DE TESIS: D.C. ROSALIO MERCADO CAMARGO
D.C. RAFAEL ORTIZ ALVARADO**

T
TESIS PARCIALMENTE APOYADA POR CIC 26.2.
COECYT-U..M.S.N.H.
PROPMEP

MORELIA, MICHOACÁN, FEBRERO 2008

ÍNDICE

ÍNDICE	2
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ABREVIATURAS	4
I. RESUMEN	5
II. INTRODUCCIÓN	7
II.1. SISTEMA GUSTATIVO	7
• II.1.1 PAPILAS GUSTATIVAS	10
• II.1.2 DETECCIÓN MOLECULAR DE LOS SABORES	13
• II.1.3 SEÑALIZACIÓN GUSTATIVA	24
• II.1.4 ALTERACIONES DEL SISTEMA GUSTATIVO	25
III.2 SISTEMA SEROTONINÉRGICO	26
• III.2.1 LOCALIZACIÓN	26
• III.2.2 SÍNTESIS	27
• III.2.3. RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS	30
III.3 SISTEMA GUSTATIVO-SISTEMA SEROTONINÉRGICO	33
III.4 DESARROLLO Y PLASTICIDAD DEL SISTEMA GUSTATIVO	35
IV JUSTIFICACIÓN	38
V HIPÓTESIS	39
VI OBJETIVO GENERAL	39
VII OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
VIII MATERIAL Y MÉTODOS	40
• VIII.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	40
• VIII.2 EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL	41
• VIII.3 REACCIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN REVERSA	42
• VIII.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	42
IX RESULTADOS	46
X DISCUSIÓN	52
XI BIBLIOGRAFÍA	

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA #	TITULO	PAGINA
1	NEUROANATOMÍA DEL SISTEMA GUSTATIVO	9
2	MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS GUSTATIVAS	11
3	LOCALIZACIÓN DE LAS PAPILAS EN EL EPITELIO LINGUAL	12
4	ZONAS PREFERENCIALES PARA LA DETECCIÓN DEL SABOR	12
5	RECEPTORES MOLECULARES PARA LOS DISTINTOS SABORES	13
6	MECANISMO MOLECULAR PARA EL SABOR DULCE	15
7	MECANISMO MOLECULAR PARA EL SABOR AMARGO	17
8	MECANISMO MOLECULAR PARA EL SABOR SALADO	18
9	MECANISMO MOLECULAR PARA EL SABOR ÁCIDO	20
10	BIOSÍNTESIS DE SEROTONINA	28
11	MARCADOR DE PESO MOLECULAR	45
12	PRUEBA DEL ESTADO DE LOS REACTIVOS	46
13	ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR	47
14	ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR	48
15	EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 5-HT ₃ EN PAPILA CALICIFORME A E17	51

ABREVIATURAS

5-HT	5-Hidroxitriptamina o serotonina
5-HTT	Transportador de serotonina
AADC	Descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos
AcH	Acetilcolina
ATP	Adenosin trifosfato
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
Ca ⁺²	Ion calcio
cDNA	Ácido desoxirribonucleico cíclico
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPA	Dopamina
GABA	Ácido gama aminobutírico
GLU	Glutamato
GPCR's	Receptores de membrana acoplados a proteínas G
GTP	Guanina trifosfato
IP ₃	Inositol trifosfato
K ⁺	Iones potasio
MAO	Monoamina oxidasa
NA	Noradrenalina
Na ⁺	Iones sodio
NT	Neurotrofina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLC	Fosfolipasa C
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Retrotranscripción
SERT	Transportador para la serotonina
SNC	Sistema nervioso central
TPH	Triptofano hidroxilasa
TRC's	Receptores gustativos de membrana
Mg	Microgramos
μL	Microlitros
iGluR	Receptor ionotropico para el glutamato
mGluR	Receptor metabotropico para el glutamato
CKK	Colecistoquinina
VIP	Péptido vasóactivo intestinal
NPY	Neuropéptido Y

I.- RESUMEN

El sentido del gusto trabaja en conjunto con los demás sentidos perceptivos para generar una representación interior de lo que ocurre en el mundo exterior, especialmente el sentido del gusto y el olfato nos brindan especial ayuda en la selección y consumo de los alimentos que ingerimos. Puesto que nos estos sentidos nos ayudan detectar alimentos y líquidos ricos en carbohidratos, electrolitos, proteínas presentes en los alimentos y también nos previene de la ingestión de posibles toxinas y venenos. Actualmente se tiene aceptados cinco sabores básicos los cuales son: dulce, salado, amargo, ácido y umami, en la percepción de todos ellos están implicados receptores moleculares que se encuentran localizados en la membrana de las células gustativas, que al agruparse reciben el nombre de corpúsculos gustativos, para finalmente formar las papilas gustativas. Existen estudios que reportan daño en la calidad de la percepción gustativa en ciertas enfermedades crónico-degenerativas, por ejemplo, en la diabetes el umbral de detección se incrementa para los azúcares, en la hipertensión también se incrementa el umbral de detección para los compuestos salados. Pacientes con cuadros depresivos reportan sensaciones gustativas desagradables. Por otro lado la serotonina (5-HT) es un neurotransmisor ampliamente estudiado que regula varias funciones vitales, como los ciclos circadianos, conducta sexual, conducta alimenticia, estado de emoción. Pero también se ha reportado que la 5-HT durante el desarrollo embrionario cumple un papel de factor trófico regulando procesos muy importantes como la proliferación celular, diferenciación celular, establecimiento de la sinapsis y morfogénesis craneofacial. Todos los procesos anteriores son regulados cuando la 5-HT es fijada a sus receptores específicos de los cuales no se conoce cual o cuales se expresen y en que perfil temporal en las papilas gustativas en etapas embrionarias por lo cual el objetivo del presente trabajo fue estandarizar la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar la expresión de los receptores serotoninérgicos en las papilas gustativas de ratón.

Palabras clave: Células gustativas, corpúsculos gustativos, papilas gustativas, serotonina, receptores serotoninérgicos, PCR.

III.- INTRODUCCIÓN

Los seres humanos contamos con los cinco sentidos sensoriales; gusto, tacto, oído, vista y olfato. Los cuales generan una representación interna del ambiente que nos rodea, así como nos previenen de los distintos peligros a los que estamos expuestos. Todos los sentidos son importantes por que gracias a que trabajan en conjunto podemos tener esta representación lo más exacta posible. Tanto de la parte física (temperatura, movimiento, acciones mecánicas) como de la parte química (gusto y olfato), sin dejar aun lado que todas estas sensaciones involucran procesos químicos y físicos¹ por igual. Como se muestra en la tabla 1

III.1.- SISTEMA GUSTATIVO

El sabor de un alimento es el resultado de la integración de las sensaciones producidas por la masticación de los alimentos y la percepción de las moléculas sápidas que se encuentran presentes tanto en los alimentos como en los líquidos que ingerimos, además tienen un papel importante el olor que se libera durante la masticación, así como la textura, la temperatura y la astringencia de los mismos. Así pues, en la detección de los sabores se ponen en juego los sentidos del gusto, olfato y tacto^{1,2}.

Los sentidos del gusto y el olfato contribuyen igualmente en el inicio de la digestión al incrementar el nivel de las secreciones gastrointestinales³ y están íntimamente ligados en la selección de los alimentos y el rechazo de posibles sustancias tóxicas⁴. Al ser detectada una molécula sávida se activa una cadena de señales que transforman la información química en impulsos eléctricos que son interpretados en el cerebro, como se explica más adelante.

Los sentidos del gusto y el olfato presentan una gran importancia puesto que nos brindan una evaluación cualitativa del contenido energético de los alimentos, así como, nos previenen de la posible ingesta de sustancias tóxicas y venenos. Actualmente se tienen aceptados cinco sabores distintos; dulce, salado, amargo, ácido y umami^{1,4}. Al ser detectado el sabor dulce nos da una valoración cualitativa de los carbohidratos presentes en los alimentos que ingerimos.

el sabor salado nos permite detectar los electrolitos presentes en los líquidos y alimentos, el sabor umami, que presenta el glutamato monosódico, que es el sabor característico de los extractos de carne nos permite identificar a ciertos aminoácidos y finalmente los sabores ácido y amargo estas dos modalidades identifican sustancias potencialmente tóxicas para el organismo.

NEUROANATOMÍA DEL SISTEMA GUSTATIVO.

En los mamíferos la detección de las moléculas odorantes y sápidas se presenta en la nariz, la lengua, el paladar, la faringe y la parte alta del esófago. En el caso del sistema olfativo la detección inicia en neuronas olfativas organizadas bajo el epitelio nasal que se encuentra situado en la parte posterior de la cavidad nasal, a partir de esta región la información es enviada al área olfativa de corteza cerebral donde es transportada a diversas estructuras del sistema límbico, que modulan los efectos emocionales de los olores.

En el caso del gusto, la detección de las moléculas sápidas se efectúa gracias a las células gustativas donde la estimulación activa una red neuronal desde la lengua, el paladar y la faringe hasta la extremidad inferior de la corteza parietal. Cabe hacer mención que las redes neuronales que son usadas por el sistema gustativo y olfativo son diferentes pero trabajan en gran parte en sinergismo.

La inervación de las papilas gustativas esta dada por los nervios craneales VII (facial), IX (glossofaríngeo) y X (vago)⁹. Todos los nervios que establecen sinapsis con las células convergen a nivel de la región dorsal del núcleo del tracto solitario localizado en el tronco cerebral, las proyecciones de segundo orden son establecidas con el núcleo ventro-postero-medial del tálamo⁹ y estas a su vez se proyectan sobre la parte anterior de la ínsula en el lóbulo cortical temporal y sobre el opérculo del lóbulo cortical frontal, como se muestra en la figura 1.

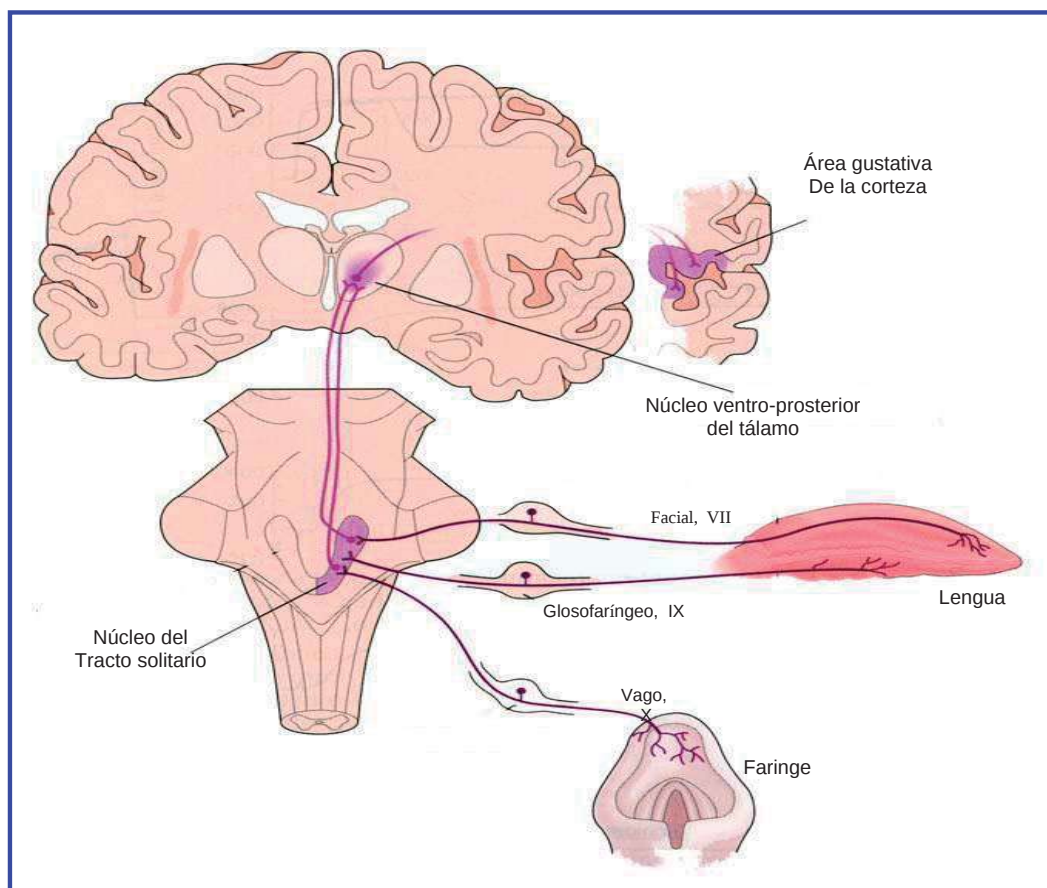


Figura 1 Neuroanatomía del sistema gustativo en mamíferos. Las redes neuronales implicadas percepción del sabor a nivel del epitelio lingual y la faringe

Estas áreas son consideradas como áreas gustativas cerebrales donde toma lugar la percepción consiente del gusto. Ciertos nervios implicados en la transmisión de señales contienen igualmente fibras somatosensoriales que establecen contacto sináptico con el epitelio lingual y el tejido muscular que rodea a los corpúsculos gustativos^{9,10}, a estas fibras se les llama perigemelares, a diferencia de las fibras que inervan a los corpúsculos que son llamadas intergemelares, se proyectan también al área gustativa del tracto solitario. Además existe también un área cortical a nivel de la corteza orbito-frontal, donde las neuronas responden a diferentes combinaciones de estímulos visuales y olfativos, olfativos y somatosensoriales. Esta región podría representar el centro cerebral del sabor.

III.1.1.- PAPILAS GUSTATIVAS

La detección de las moléculas sápidas contenidas tanto en los alimentos como en los líquidos que ingerimos inicia en la lengua por un tipo de células epiteliales especializadas, llamadas células gustativas, que se agrupan en corpúsculos gustativos para finalmente formar las papilas gustativas⁵.

A su vez las papilas gustativas están clasificadas según su morfología y función, en papilas caliciformes o circunvaladas, siendo las papilas caliciformes las de mayor tamaño y teniendo la forma de un cáliz en lo humanos se encuentran en cantidades variables, que van de 6 a 8, en los roedores se presenta una sola papila caliciforme. Así mismo están presentes las papilas foliadas, que son de forma alargada y las papilas fungiformes que presentan forma de hongo^{6,7}. A su vez a nivel celular se distinguen cuatro tipos de células diferentes: células basales, células de tipo I (oscuras), células de tipo II (claras), células de tipo III (intermedias). Las células basales son pequeñas y redondas localizadas en la base del corpúsculo, a partir de ellas se generan todas las demás células. Las células claras, oscuras e intermedias se caracterizan por tener forma bipolar.

Las papilas gustativas están presentes en la lengua en la parte dorsal, la detección de los diferentes sabores se efectúa cuando las moléculas sápidas interactúan con los distintos receptores que están presentes en las membranas de las células gustativas, a estos receptores se les denomina como receptores gustativos de membrana (TRC's abreviados en inglés). Los corpúsculos gustativos se encuentran en el interior de las papilas gustativas y el número de corpúsculos gustativos es variable y van de 50 a 100 corpúsculos dependiendo de el tipo de papila y la especie de que se trate los receptores se proyectan como microvellosidades en la parte apical del corpúsculo gustativo, formando el poro gustativo^{5,8} (figura 2). Una vez que las moléculas sápidas interactúan con sus respectivos TRC's, las células de tipo I, II o III codifican y envían la señal a los nervios con los que hacen sinapsis.

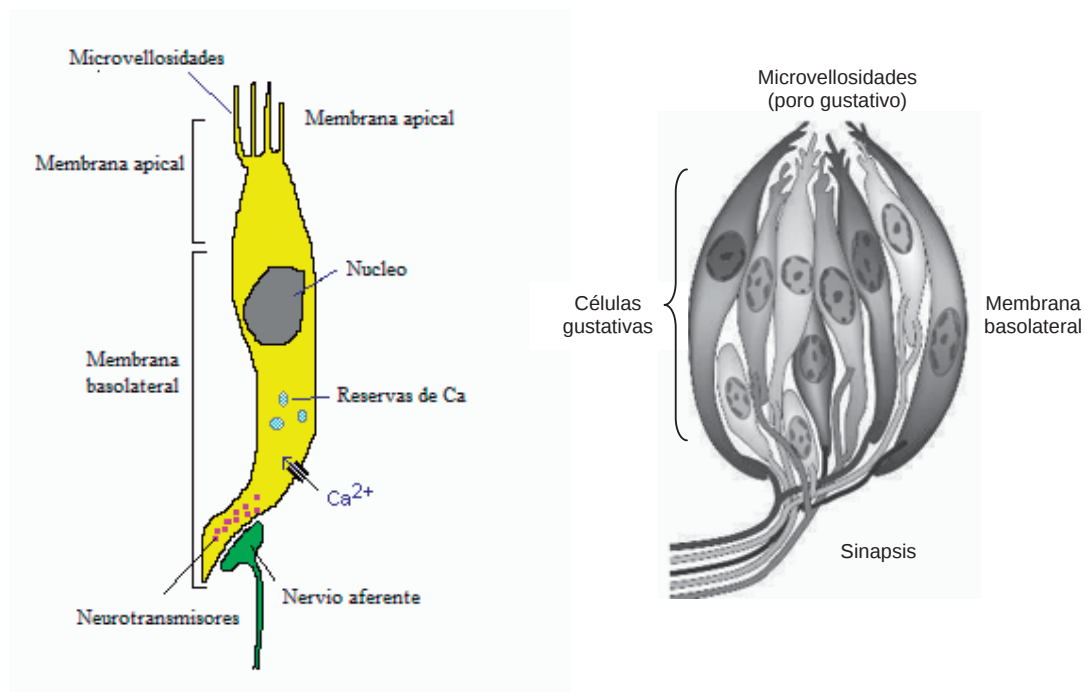


Figura 2. Morfología de una célula gustativa de forma bipolar. Las células gustativas se agrupan para formar los corpúsculos gustativos, también se observa el poro gustativo y así mismo observa la formación de la sinapsis.

La distribución de las papilas no es uniforme en la lengua, las papilas caliciformes se ubican en la parte posterior de la lengua y contienen de cientos (roedores) a miles (humano) de corpúsculos gustativos, las papilas foliadas se localizan en la parte postero-lateral de la lengua ubicadas en los bordes y presentan de docenas a cientos de corpúsculos gustativos y las papilas fungiformes se localizan en la parte anterior de la lengua agrupadas de dos a tres papilas y solo presentan un corpúsculo gustativo^{1,11} (Figura 3).

La detección de los distintos sabores también se presenta en diversas zonas de la lengua, es importante mencionar que en toda la lengua existe la capacidad para distinguir a los diferentes sabores, pero existen zonas preferenciales de detección¹². El sabor dulce se detecta en la parte anterior de la lengua, el sabor salado se detecta tanto en la parte anterior como en la parte media de la lengua, el sabor umami es detectado tanto en la parte media, anterior y en la parte postero-lateral de la lengua, en tanto que el sabor ácido es detectado en la parte anterior y postero-lateral se piensa es esto es debido a que previene la ingestión de posibles sustancias tóxicas como los ácidos y finalmente el sabor amargo, al

igual que el salado, es detectado tanto en la parte anterior como en la parte postero-lateral de la lengua¹²³, esto es debido a que este sabor se ve relacionado con la ingesta de posibles venenos y desde la parte posterior de la lengua puede producir el reflejo del vomito (Figura 4).

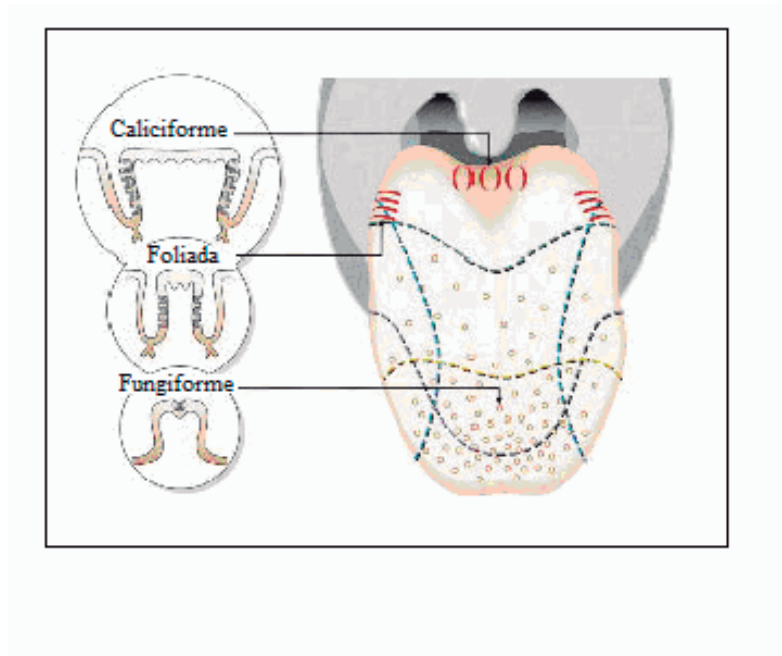


Figura 3. Esquema representativo de la localización de las papilas gustativas en el epitelio lingual.



Figura 4. Esquema de las zonas preferenciales para la detección de los diferentes sabores.

III.1.2- DETECCIÓN MOLECULAR DE LOS SABORES

Como ya se menciona anteriormente la detección de los sabores inicia cuando las moléculas sápidas interactúan con los diferentes receptores gustativos de membrana, que se encuentran en las microvellosidades del corpúsculo gustativo, en función de la naturaleza del sabor el receptor pertenecerá ya sea a la familia de receptores tipo canal, en los cuales el sitio de unión para el ligando y un canal iónico forman un solo complejo macromolecular, o bien a la familia de receptores acoplados a proteínas G, en el caso anterior la estimulación del receptor activa a una proteína que tiene por particularidad fijar GTP (guanina trifostato), de allí su nombre, esta proteína esta constituida por tres subunidades (α, β, γ), capaces de activar diversos sistemas de señalización intracelular. La detección y traducción de los sabores salados y ácidos se efectúa por medio de los receptores de tipo canal, mientras que en la detección de los sabores dulce, amargo, dulce y umami se efectúa por medio de la acción de los receptores acoplados a proteínas G (Figura 5).

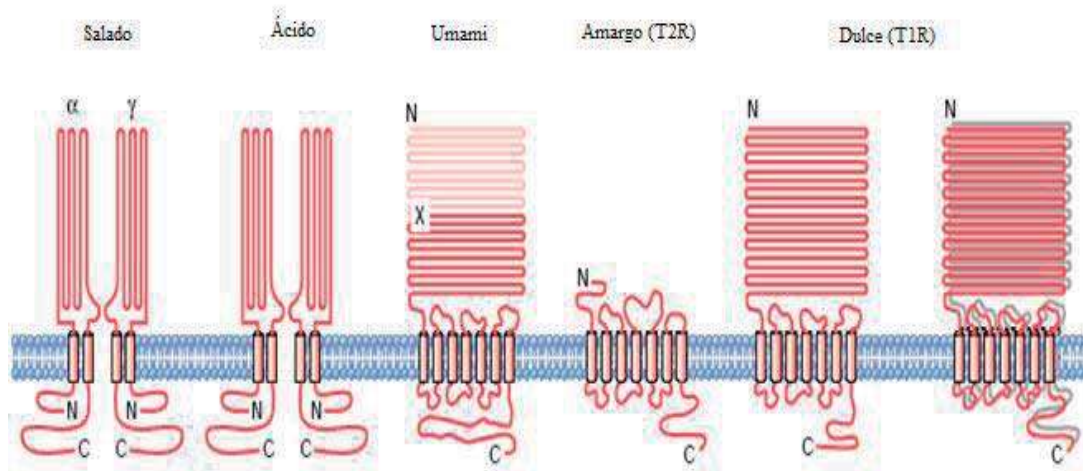


Figura 5. Diferentes receptores moleculares que participan en la integración de las señales gustativas

MECANISMOS MOLECULARES DE LA DETECCIÓN DEL SABOR DULCE.

El placer que invoca comer alimentos dulces está relacionado, tanto con las propiedades físicas de los sacáridos, como con los mecanismos moleculares que se disparan a nivel cerebral. Esta relación es debida en parte a que la detección y traducción del gusto dulce nos permite reconocer alimentos ricos en energía.

Tanto en la detección de los sabores dulce y umami es medida por una pequeña familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR's), de los cuales se subdividen en T1R1, T1R2 y T1R3, los tres receptores anteriores se caracterizan por tener un dominio amino-terminal extracelular de gran tamaño (de 400 a 600 residuos), el cual constituye un sitio de unión del ligando dulce, los receptores T1R están mayoritariamente presentes en las papilas fungiformes¹⁹, así mismo, las papilas fungiformes son particularmente sensibles a los sabores dulces. Los receptores T1R2, T1R2 y T1R3 difieren en la sensibilidad que presentan a diferentes metabolitos, como son el glutamato, feromonas, ácido γ -aminobutírico, etc. Pero todos incrementan la concentración de iones calcio (Ca^{+2}) intracelular lo cual concluye con la liberación de diferentes neurotransmisores¹⁴⁻¹⁶.

Los receptores T1R2 y T1R3 forman un heterodimero, en donde la interacción entre las subunidades es esencial para su actividad, capaz de reconocer a las moléculas sápidas dulces, como la sacarina, la sacarosa y ciertos aminoácidos^{14,17}, existen varias vías de segundos mensajeros que son activadas por la interacción de las diferentes moléculas dulces, por ejemplo los edulcorantes artificiales activan la fosfolipasa C tipo β_2 ($\text{PLC}\beta_2$), esta enzima incrementa la concentración de Diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3), el incremento de IP_3 cataliza la liberación de iones Ca^{+2} a partir del retículo endoplasmático creando así una despolarización de la célula y la liberación de los neurotransmisores, una segunda vía activada por los azúcares es la activación del sistema enzimático de la adanilatociclasa (AC), que cataliza la síntesis de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) a partir de ATP, este último bloquea los canales potásicos, provocando así la despolarización de la célula. Se ha sugerido otra vía de transducción (Krizhanovsky *et al.*, 2000), en la cual se ha demostrado

que en papilas caliciformes de rata la sacarosa incrementa la concentración intracelular de guanosin monofosfato cíclico¹⁸ (Figura 6).

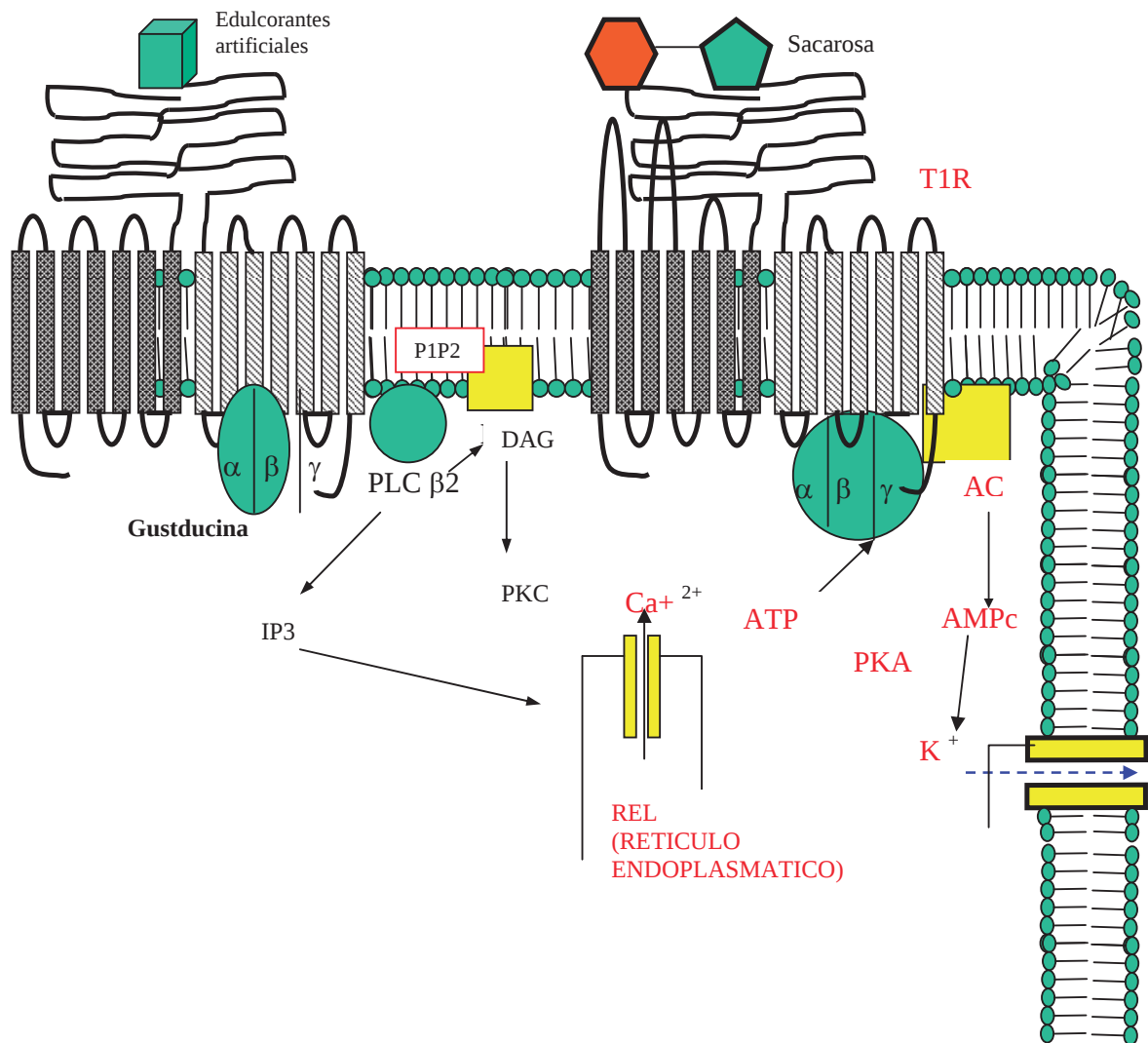


Figura 6. Mecanismos intracelulares de la transmisión del sabor dulce, las moléculas dulces se fijan a los receptores de tipo T1R, que está acoplado a proteínas G activando la adenilato ciclasa, incrementando la concentración de AMPc, la presencia de AMPc produce la despolarización de la célula produciendo la liberación de los neurotransmisores. En el caso de los edulcorantes artificiales la despolarización de la célula se produce por la intervención de la cascada donde participa el IP_3 .

MECANISMOS MOLECULARES DE LA DETECCIÓN DEL SABOR AMARGO.

A diferencia de la percepción de los sabores dulce y umami, la percepción del gusto amargo reconoce limitadas sustancias nutrientes, pero tiene una tarea muy importante ya que la percepción del sabor amargo nos permite reconocer posibles venenos y toxinas.

Los receptores implicados en la detección del sabor amargo se denominan como T2R que comprenden de 40 a 80 receptores diferentes en seres humanos¹², los receptores T2R están principalmente expresados en las papilas caliciformes y en papilas foliadas y raramente se encuentran en las papilas fungiformes. Esta familia al igual que los receptores implicados en la detección del sabor dulce, están acoplados a proteínas G, pero difieren en cuanto a su estructura molecular y a su modo de activación, los receptores T2R presentan una región amino-terminal extracelular mucho mas corta que los receptores de tipo T1R y el sitio de unión para las moléculas sápidas se encuentra en el dominio transmembranal del receptor²⁰.

La activación de los receptores del sabor amargo esta mediada como las proteínas alostéricas monoméricas cuando el ligando es fijado al receptor, este induce un cambio conformacional en el receptor activado a la proteína G, a nivel intracelular las vías de transducción del sabor amargo, al igual que el gusto dulce, incrementa la concentración de calcio intracelular y finaliza con la liberación de los respectivos neurotransmisores (Figura 7). Por otro lado la gustducina, una proteína G, que esta implicada en la transducción de señales dulces y amargas, no se encuentra presente en todas las células que expresan receptores los receptores del tipo T1R y T2R y que los receptores para los sabores dulces y amargos que se han identificado hasta hoy no se encuentran en todas las células que expresan gustducina. Así mismo cuando se ha realizado una mutación donde se elimine totalmente la expresión de la gustducina, no provoca la eliminación total de la percepción de los sabores dulces y amargos²¹, lo anterior deja camino para que en la percepción de los sabores dulces y amargos exista otra familia de receptores, así como la posibilidad de que algunas moléculas amifílicas posean la

capacidad de atravesar directamente las membranas e interactuar con la gustducina o algunas otras proteínas de señalización sin la participación de los receptores como intermediarios²².

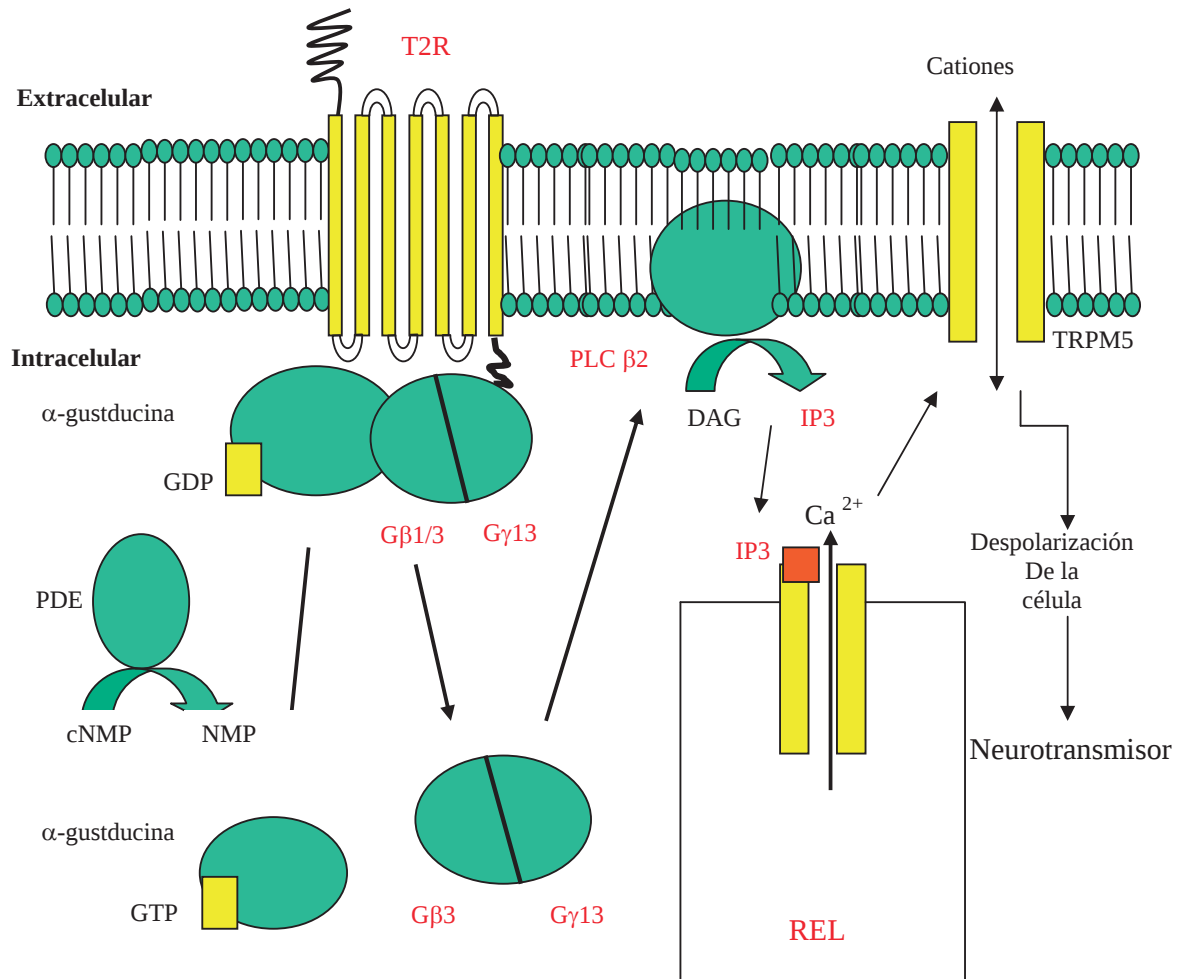


Figura 7. Mecanismos moleculares implicados en la percepción del sabor amargo, en este caso la molécula sávida al fijarse al receptor T2R induce un cambio conformacional en el receptor activando a la proteína G, que a su vez activa a la fosfolipasa C incrementando la concentración de IP₃, produciendo la despolarización de la célula

MECANISMOS MOLECULARES DE LA DETECCIÓN DEL SABOR UMAMI.

La palabra japonesa umami es traducida como sabor delicioso y es designada para una sensación agradable distinta al sabor ácido, salado, amargo y dulce. En 1908 el profesor de química Kikunae Ikeda, al degustar un caldo de alga marina llamado kombu, el no reconoció ninguno de los sabores conocidos y lo llamo umami, ya en la década de los 80's fue añadido el sabor umami a los cuatro sabores ya conocidos (salado, dulce, amargo y ácido). El sabor umami es un sabor dominante en los extractos de carne y consomé de pollo, también es el sabor característico de los espárragos, el queso y los tomates, este sabor es generado por la presencia de sales glutámicas, 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 codificación del sabor umami uno de ellos es una forma trunca en el extremo N-terminal del receptor metabotrópico del glutamato de tipo 4 (mGluR4t), la expresión de este receptor ha sido demostrada en células gustativas²³, cuando son expresados en células CHO (Chinese Hamster ovary) estas responden al glutamato en una gama de concentraciones utilizadas en estudios de percepción gustativa in vivo²⁴, Muy recientemente se ha reportado la expresión dentro de las papilas gustativas de otros dos de los miembros del grupo III de receptores metabotrópicos (mGluR) del glutamato; mGluR1 y mGluR5, si mGluR5 no está expresado el receptor mGluR1 está expresado intensamente a nivel del poro gustativo²⁵.

Por otro lado (Nelson et al, 2002; Li et al 2002) usando un modelo de expresión in Vitro han mostrado que las células que expresan la combinación de los receptores T1R1 + T1R3 responden a la estimulación por el glutamato y la doble inactivación de la expresión de estos receptores in vivo elimina totalmente las respuestas celulares y de comportamiento al sabor umami^{11,26}. Estos últimos resultados sugieren muy fuertemente que la percepción del sabor umami recae únicamente sobre la combinación de los receptores T1R1+T1R3.

En cuanto a la transducción del sabor umami se han propuesto dos vías. Una cuando el receptor metabotrópico del glutamato es activado la concentración de cAMP intracelular disminuye seguida por un incremento en la concentraciones de los iones Ca^{+2} , con la generación de una señal eléctrica que es transmitida al sistema nervioso aferente. La otra vía de transducción propone la participación de receptores iónotrópicos para el glutamato (iGluR), por esta vía se abren o bloquea los canales iónicos, estudios de electrofisiografía muestran que usando un inhibidor de iGluR, N-metil-D-Aspartame (NMDA) han confirmado estos receptores están igualmente implicados en la transducción del sabor umami²⁷. El funcionamiento de los receptores anteriores es similar al de los canales catódicos, que cuando están abiertos dejan penetrar al interior de la célula gustativa iones sodio y calcio, este flujo induce la despolarización de la célula finalizando con la producción de una señal eléctrica dentro de la inervación aferente.

MECANISMOS MOLECULARES DE LA DETECCIÓN DE LOS SABORES ÁCIDOS Y SALADOS.

Todos los vertebrados poseen células gustativas que responden a los sabores ácido y salado. En mamíferos la excitación débil produce una sensación agradable pero cuando la estimulación es fuerte se produce una sensación desagradable y produce aversión. El sabor ácido especialmente está relacionado con la detección de ciertos venenos químicos y el gusto salado nos da una visión de que tan ricos en electrolitos son los alimentos y líquidos que consumimos.

En la percepción del sabor salado está basado en la acción de los iones sodio (Na^+) presente en la sal de mesa y principalmente como cloruro de sodio (NaCl). Los iones sodio interactúan con los canales iónicos sensibles a la amilorida, un guaninido heterocíclico que bloquea reversiblemente los canales epiteliales de sodio²⁸. La interacción de las sales sódicas con estos canales produce un flujo de iones sodio al interior de la célula gustativa en contra de un gradiente electroquímico, produciendo una despolarización de la membrana²⁹, el consecuente incremento de calcio intracelular, para finalizar con la liberación de

algún neurotransmisor (serotonina, ATP o noradrenalina) sobre las fibras nerviosas aferentes³⁰ (Figura 8).

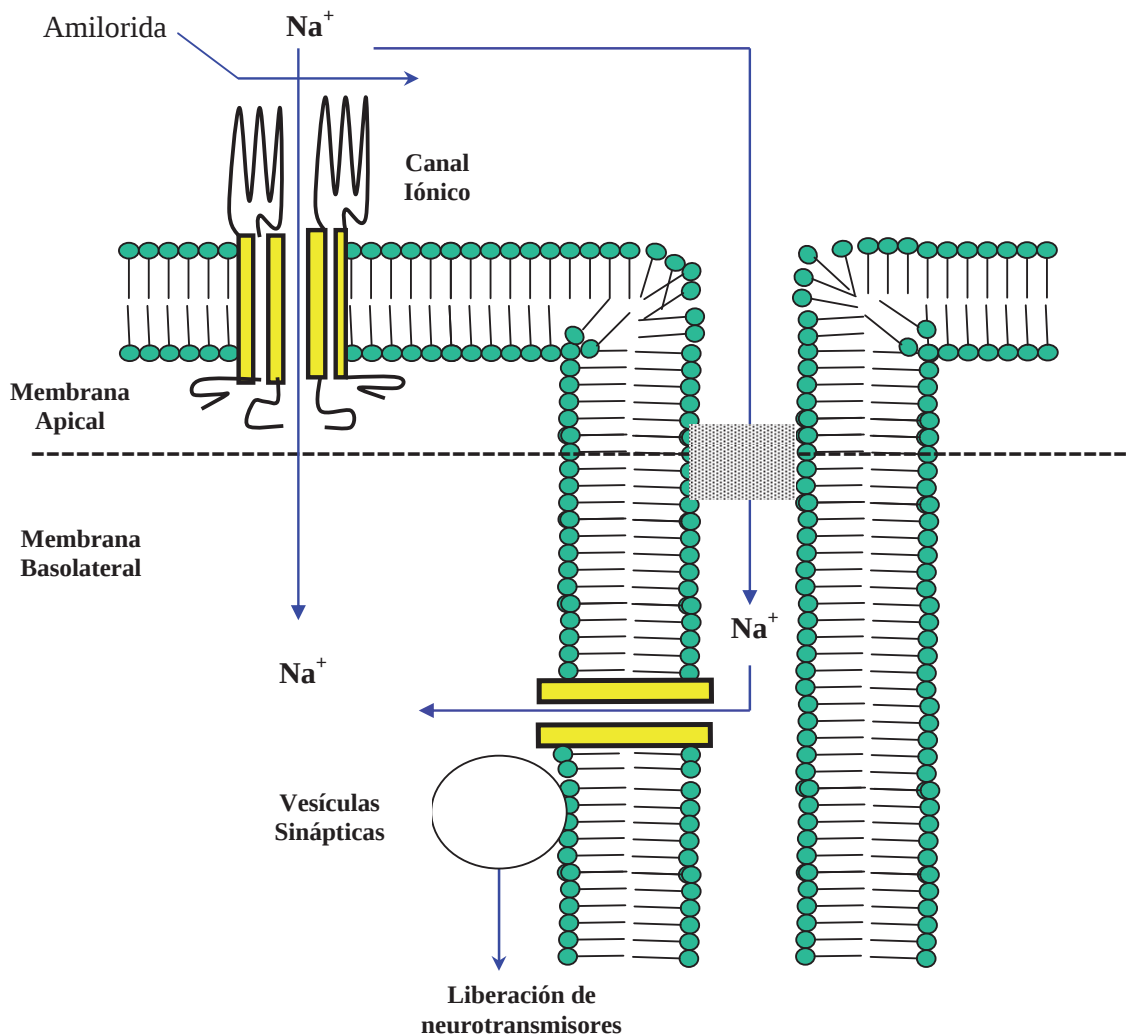


Figura 8. Mecanismo molecular propuesto para la detección del sabor salado, los iones Na^+ interaccionan con la amilorida, bloqueando los canales de Na^+ , se produce un flujo de iones Na^+ contra un gradiente electroquímico produciendo la despolarización de la célula gustativa

A pesar de que varias sales sódicas son saladas la intensidad de su percepción depende de la talla del anión unido, por ejemplo el cloruro de sodio es mas salado que el acetato de sodio a la misma concentración. Estas diferencias de salinidad se presentan posiblemente a las diferentes capacidades de loa aniones

de penetrar a las uniones fuertes, presentes en las células gustativas e interactuar con los canales basolaterales a través de la ruta paracelular^{31,32}.

Se ha reportado que los protones hidrogeno (H^+) son los responsables de la percepción del estímulo ácido, la intensidad del sabor ácido de un alimento es proporcional a la concentración de protones H^+ , los protones H^+ son capaces de bloquear los canales de K^+ ⁽³³⁾, impidiendo al salida de este protón lo cual provoca una despolarización de la membrana y la generación de potenciales de acción por la activación de canales Ca^{+2} sensibles a voltaje, produciendo la liberación de un neurotransmisor sobre las fibras gustativas aferentes (Figura 9).

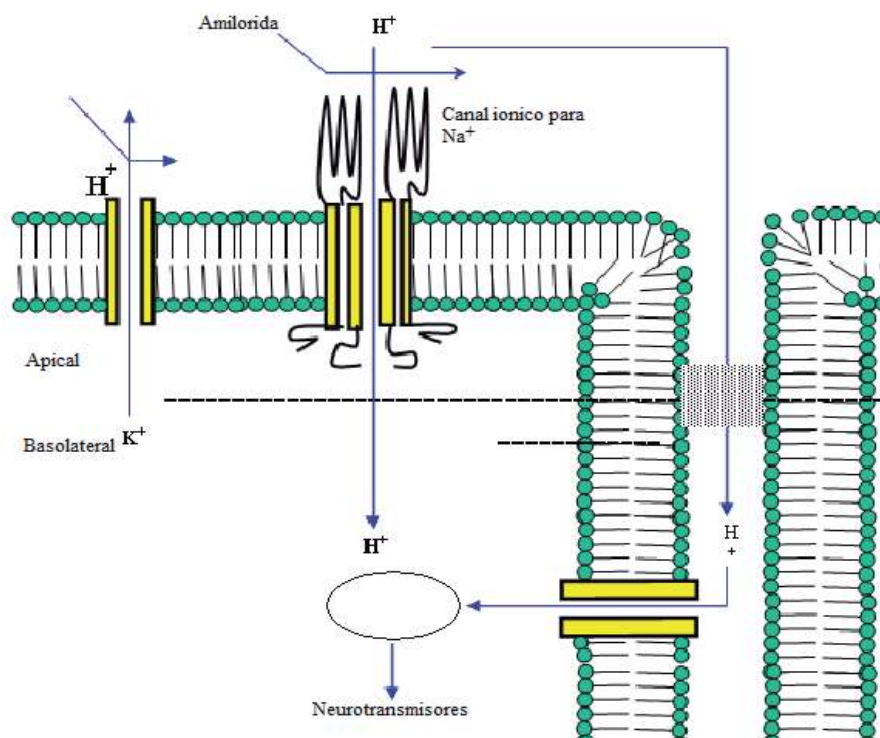


Figura 9. Mecanismo propuesto para la detección del sabor ácido, donde los protones H^+ bloquean los canales iónicos para el K^+ produciendo la despolarización de la membrana y la liberación de los neurotransmisores.

Recientes estudios genéticos y funcionales han planteado un nuevo receptor para la transducción del gusto ácido, este receptor es el PKD2L1 (polycystic kidney disease), un miembro de la familia de canales iónicos TPR (transient receptor potencial), es expresado selectivamente en una población de células gustativas distintas a la que median la detección de los sabores dulce, amargo, salado y umami³⁴. Cuando se inhibe la expresión del receptor PKD2L1 por acción de la

toxina diftérica, se generan animales con la pérdida total de la percepción del sabor ácido, pero mantienen intacta su capacidad de reconocer los demás sabores. Hasta la fecha el mecanismo por el cual el receptor PKD2L1 puede mediar la percepción del sabor ácido no ha sido descrito.

INTEGRACIÓN Y CODIFICACIÓN DE LAS SEÑALES GUSTATIVAS A NIVEL PERIFÉRICO Y CENTRAL

La codificación gustativa se entiende por los mecanismos que integran la identidad y la concentración de las sustancias sápidas, en los corpúsculos gustativos y posteriormente es representada por potenciales de acción que son enviados al cerebro.

Existen dos teorías con respecto a la codificación de las señales gustativas, ambas teorías se basan en registros electrofisiológicos realizados en las fibras primarias aferentes. Inicialmente se reporta que cada fibra gustativa responde preferencialmente a un solo tipo de estímulo. Por ejemplo la cuerda del tímpano, una rama del par cráneo VII, responde preferentemente a la sacarosa y cloruro de sodio, mientras que el nervio glosofaríngeo responde preferentemente a estímulos ácidos y a la quinina (amargos), sin embargo otros estudios han mostrado que una fibra periférica puede ser estimulada preferentemente por la sacarosa, pero también responde al ácido acético, fructosa y el cloruro de sodio. Como anteriormente se mencionó a raíz de estas observaciones se derivan dos teorías de la integración de las señales gustativas: “Teoría de las líneas dedicadas^{13,35}” y la “Teoría computacional”.

El modelo de las líneas dedicadas dicta que cada categoría gustativa estimula un solo tipo celular y un solo tipo de fibra gustativa, es decir, que clasifica a las fibras en función de su respuesta preferencial para un estímulo y considera que una célula responderá con un máximo de potenciales de acción a una sola modalidad de estímulo gustativo. Para el modelo computacional la percepción de un sabor está determinada por la combinación de las respuestas de todas las células, y por lo tanto de todas las fibras nerviosas, a un estímulo en particular independientemente de su nivel de actividad.

A nivel central existen estudios que favorecen la teoría de las líneas dedicadas, estos estudios fueron realizados en el tracto solitario, el tálamo y la corteza, donde se observa que la amilorida inhibe únicamente a las neuronas que responden preferentemente al cloruro de sodio, sin que la actividad de las neuronas que responden a los demás estímulos gustativos se vea afectados³⁶, sin embargo ciertas neuronas de estas regiones cerebrales responden a varios estímulos gustativos, esta observación favorece a la teoría computacional³⁷.

Recientes estudios genéticos no han permitido diferenciar cual de las dos teorías, existentes hasta el momento, sobre la codificación e integración de las señales gustativas se lleva a cabo a nivel celular. Es un hecho que un receptor puede reconocer a moléculas de diversa estructura de la misma clase de estímulos gustativos, pero aun esta en controversia que una misma célula pueda responder a dos estímulos de naturaleza gustativa diferente. Así pues estudios de biología molecular han reportado que los receptores para los sabores dulces y amargos no están co-expresados en una misma célula^{11,12}. Por el contrario los estudios de electrofisiología sobre células aisladas (Patch-Plamp) y la medida de las variaciones de concentración intracelular de Ca^{+2} , han mostrado que una misma célula puede ser estimulada al mismo tiempo tanto por impulsos gustativos dulces y amargos.

III.1.3- SEÑALIZACIÓN GUSTATIVA

En lo que concierne a la señalización gustativa, como se menciona en las páginas anteriores, esta señalización inicia con la fijación de una molécula sávida con uno de los receptores que se encuentran presentes en las membranas de las células gustativas, una segunda etapa se inicia con la activación de una cascada de señalización intracelular que termina con la liberación de uno o más neurotransmisores en la base del corpúsculo y por consecuencia se produce la estimulación de las fibras nerviosas gustativas que envían la información a las áreas del cortex donde tiene lugar la percepción consiente de los estímulos gustativos. Para que un neuromodulador pueda estar implicado en la percepción gustativa debe de cumplir con los siguientes requisitos:

1. Localizarse y liberarse a partir de las células gustativas o de las fibras nerviosas gustativas.
2. Este neuromodulador debe de producir efectos estimulantes o inhibitorios sobre las células gustativas.
3. Un sistema de recaptura y eliminación del neurotransmisor presente en el epitelio lingual.
4. Deben de estar presentes los receptores, específicos para el neurotransmisor, en la membrana tanto de las células gustativas como de las fibras gustativas.

III.1.4.- ALTERACIONES DEL SISTEMA GUSTATIVO

Las alteraciones tanto del sistema gustativo como olfativo juegan un papel fisiopatológico mucho más relevante que el asociado a la digestión.

A la pérdida de la sensibilidad gustativa se le conoce como ageusia y la pérdida de la olfacción se le conoce como anosmia, estas alteraciones se han asociado con la pérdida de peso, desnutrición, daños en el sistema inmunitario y descontrol en el estado de salud general de personas mayores (Mattes³⁸ *et al.*, 1994; Schiffman³⁹ *et al.*, 1996). Sahagún-Flores *et al.*, 2000, Han reportado que las personas que sufren de hipertensión arterial muestran un umbral elevado para las sustancias saladas, pudiendo explicar con estas observaciones el sobre consumo de sal en este padecimiento⁴⁰.

Así mismo en personas diabéticas, tipo I Y II, se ha reportado un elevado umbral en la detección de alimentos dulces⁴¹. En el aspecto nutricional se ha observado una relación negativa, cuando se presenta la disgeusia (pérdida de la sensibilidad gustativa) y los aportes calóricos (Kettaneh *et al.*, 2002)⁴². Por otro lado ciertos tipos de obesidad en la cual se consume de forma indiscriminada alimentos ricos en grasas, se han asociado a una disfunción de la percepción gustativa (Stolbova *et al.*, 1999)⁴³. Miller⁴⁴ ha reportado asociación entre los desórdenes del gusto y pacientes con cuadros depresivos, estos pacientes señalan frecuentemente sensaciones gustativas desagradables y también es común que pacientes con disgeusia presenten estados de depresión (Deems *et al.*, 1991)⁴⁵. La esquizofrenia, la enfermedad de Alzheimer y la anorexia, son padecimientos que se acompañan de ageusia y anosmia debida a una carencia de zinc que afecta al sentido del gusto (Casper *et al.*, 1980)⁴⁶.

III.2.- SISTEMA SEROTONINÉRGICO.

III.2.2.- Localización.

La serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT), una catecolamina endógena, es un neurotransmisor clásico que se encarga de regular múltiples funciones vitales en el organismo, como son la regulación de los ciclos de sueño y vigilia⁴⁷, regulación de la temperatura corporal, conducta sexual y alimenticia⁴⁸, se ha reportado que esta implicada en procesos de aprendizaje y memoria, también se ha visto implicada en procesos de depresión e hiperactividad, esta implicada en la regulación de la contracción muscular, funciones cardiovasculares, motilidad intestinal y agregación plaquetaria durante la coagulación.

De hecho como dato curioso, en la década de los 30's Ersparmer inicio con el estudio de células enterocromafines que se teñían con un reactivo para indoles, las células mas fuertemente teñidas se encontraron en la mucosa intestinal, en las plaquetas y en el sistema nervioso central (SNC) a la cual se le denomino enteramina. Page y colaboradores, aislaron y caracterizaron desde el punto de vista químico a una sustancia vasoconstrictora que se encontraba en la sangre coagulada liberada por las plaquetas presentes a esta sustancia se le denomino serotonina (Page 1976). La comparación entre la serotonina y la enteramina mostró que en realidad era la misma sustancia y se acordó llamarla serotonina⁴⁹.

En el SNC la serotonina es sintetizada exclusivamente en neuronas especializadas, conocidas como neuronas serotoninérgicas, lo cual ha sido demostrado por métodos de inmunohistoquímica de fluorescencia, estos estudios han demostrado que las neuronas serotoninérgicas se agrupan en grupos que son clasificados según su origen embrionario en nueve núcleos del rafe⁵¹.

Las neuronas serotoninérgicas envían sus proyecciones descendentes que inervan el tronco cerebral y medula espinal, las proyecciones ascendentes

inervan diversas estructuras cerebrales como son; la sustancia negra, glóbulo pálido, el puntamen, el caudado, el tálamo, hipotálamo y la corteza cerebral^{52,53,54}. La 5-HT sintetizada a nivel cerebral es almacenada en vesículas presinapticas donde será liberada por procesos de excitosis⁵⁵.

A nivel intestinal la 5-HT es sintetizada en las células enterocromafines, el 90% de la serotonina sintetizada es recapturada en el tracto gastrointestinal y en el plexo mesenterico, donde es liberada a la circulación y es almacenada en gran parte por las plaquetas⁵⁵.

III.2.2.- Síntesis

La serotonina se encuentra distribuida tanto en vertebrados como invertebrados, en los mamíferos la principal fuente de serotonina es el cerebro y el intestino, en estos dos órganos se sintetiza a partir del L-triptofano en un proceso que requiere de dos etapas:

1. La hidroxilación del L-triptofano a 5-hidroxitriptofano, esta reacción es llevada a cabo por la acción de la enzima triptofano hidroxilasa (TPH), de la cual se han descrito dos isoformas TPH1 y TPH2⁵⁰ esta reacción es el punto limitante en la síntesis de la serotonina.
2. La descaboxilación del 5-hidroxitriptofano a 5-hidroxitriptamina (serotonina), por la descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos (AADC).

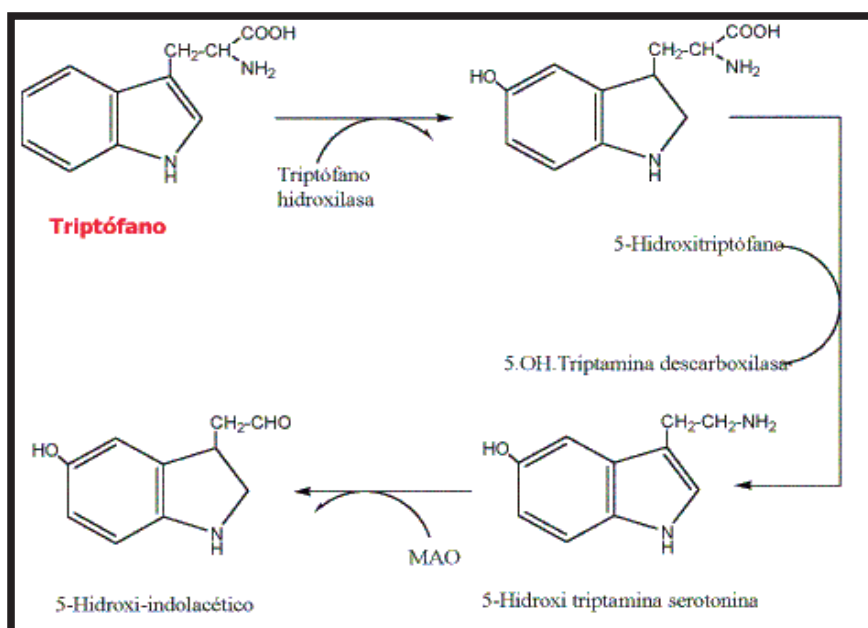


Figura 10. Biosíntesis de la serotonina.

La serotonina liberada en el espacio sináptico actúa sobre sus diferentes receptores e induce los efectos fisiológicos antes mencionados. La interacción serotonina-receptor debe de ser transitoria, por que existen varios mecanismos de inactivación de la amina que permiten mantener una concentración baja en el espacio sináptico, uno de ellos es la desaminación oxidativa por la monoamina oxidasa A (MAO A).

Otro mecanismo de control es la recaptura, de la 5-HT del espacio sináptico, promovida por el transportados de serotonina (SERT o 5-HTT) que se encuentra en las neuronas presinapticas, de este punto la serotonina puede seguir dos caminos, uno que es la degradación por la MAO A y un segundo camino que es ser reciclada en vesículas para posteriormente ser liberada nuevamente.

La serotonina además de ser un neurotransmisor clásico también se ha reportado como un factor trófico, ya que ha sido detectada durante la división del cigoto, gastrulación y la neurulación de en embriones de pollo, erizo de mar y *Drosophila*.

La presencia de la 5-HT y sus receptores en la embrogénesis temprana y la habilidad que tienen ciertos agentes farmacológicos⁵⁸ específicos de la 5-HT para interferir con el desarrollo embrionario sugiere que embriones primitivos usan 5-HT antes del inicios de la neurogénesis para regular la proliferación celular y/o movimientos morfogénicos^{59,60}. Por otro lado se ha sospechado durante años que la 5-HT regula la diferenciación craneofacial y cardiovascular.

Cuando se administran inhibidores del SERT como la sertralina o fluoxetina a cultivos de embriones de ratón conduce a malformaciones craneofaciales⁶¹. Así

mismo se ha reportado que embriones que crecen en presencia de 5-HT o inhibidores del transportador (SERT) existe un decremento de la proliferación del miocardio, mesenquima cardíaco y endotelio. Estos hallazgos son indicio de la serotonina puede regular la proliferación celular en el corazón embrionario⁶². La inactivación genética del receptor 5-HT_{2B} (Ko 5-HT_{2B}) conduce a la muerte embrionaria (E11) por malformaciones e hipoplasias cardíacas⁶³ los animales homocigotos -/- para este receptor presentaron una reducción en el receptor tirosin kinasa Erb-2, un receptor de membrana envuelto en procesos de diferenciación y proliferación celular.

Mercado y col. (1992,1998)⁶⁵, demostraron la presencia de la 5-HT, en los conos de crecimiento axonal, también de todos los elementos moleculares necesarios para la unión, captura y liberación de la serotonina, estos datos refuerzan las observaciones hechas por Sikich y col. (1990)⁶⁶ en las cuales se indica que la serotonina reduce el crecimiento de los axones y la formación de sinapsis de las neuronas de la corteza cerebral en cultivo. Algunos otros investigadores han reportado efectos negativos de la serotonina sobre la diferenciación y proliferación celular en diversas especies de moluscos⁶⁷⁻⁷⁰, peces⁷¹, ratas⁶⁶ y ratones^{72,73}. Mas recientemente se demostró el papel clave de la serotonina en el establecimiento de los patrones de inervación de la corteza somatosensorial y visual⁷¹⁻⁷⁵.

III.2.3.- Receptores serotoninérgicos

Los neurotransmisores, al igual que las hormonas, actúan sobre receptores específicos que están presentes en las neuronas postsinápticas en concentraciones menores a la de los neurotransmisores liberados, estos receptores se sintetizan en el citoplasma y se transportan a sitios específicos de la membrana plasmática.

Todas las neuronas tienen por lo menos un subtipo de receptor en su membrana, de la variedad de los receptores que presenten dependerá la respuesta a los diferentes estímulos. En la naturaleza se encuentran gran variedad de compuestos naturales o sintéticos que son agonistas, es decir, que imitan la actividad con una cinética muy parecida por tener una estructura muy similar a la del neurotransmisor. Otros compuestos son antagonistas, es decir, que tienen alta afinidad por el receptor pero bloquean la actividad del mismo. La acción de la 5-HT es apreciada después de su unión a receptores específicos en la superficie de la célula. En base a los datos obtenidos de estudios farmacológicos, fisiológicos, bioquímicos y de biología molecular, se ha admitido hasta la fecha al menos 14 subtipos de receptores serotoninérgicos^{76,77}. los cuales están agrupados en siete familias: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆, 5-HT₇.

Receptores 5-HT₁

Los receptores 5-HT₁ están involucrados en varias funciones fisiológicas como son la dilatación arterial, la inhibición de la transmisión de la señal simpática y la autoinhibición cerebral. Al menos cinco subtipos de receptor 5-HT₁ han sido reconocidos, 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F}. Todo tiene siete dominios transmembranales y están acoplados a proteínas G (vía G₁ o G₀), son codificados por genes intrones de entre 365 y 422 aminoácidos con una homología de secuencia total del 40%. Todos estos receptores son acoplados negativamente al sistema de adenilato ciclasa.

Receptor 5-HT_{1A} Están distribuidos ampliamente en el SNC, en particular en el hipocampo, el septum y la amígdala. Principalmente la activación de este subtipo causa hiperpolarización, en los núcleos del rafe actúan como autoreceptores somatodendríticos que inhiben el disparo de la célula neuronal y la liberación de la serotonina. Los fármacos agonistas para este receptor facilitan el comportamiento sexual de la rata macho, incrementan la ingesta de alimento, produce hipotermia y ataques ansiolíticos, también se ha reportado que este receptor esta implicado en depresión⁷⁸⁻⁸⁰.

Receptor 5-HT_{1B} Estos receptores tienen una función de autoreceptores se encuentran localizados en el cromosoma humano 6q13 y se concentran en el ganglio basal, striatum y corteza frontal. Actúan regulando la liberación y síntesis de serotonina⁷⁸⁻⁸⁰.

Receptor 5-HT_{1D} Este subgrupos de receptores tiene una homología estructural del 63% con el receptor 5-HT_{1B}, esta subfamilia esta localizada en el gen humano 1p36.3-p34.3, se encuentra predominantemente en el puntamen caudado, núcleo accumbens, hipocampo y corteza⁷⁸⁻⁸⁰.

Receptor 5-HT_{1E} Es un receptor postsináptico, su estructura de transición se encuentra entre la familia de receptores 5-HT₁ y 5-HT₂. Se ha localizado en el miocardio y mesenterio y muy poco en el sistema nervioso central⁷⁸⁻⁸⁰.

Receptores 5-HT₂

De esta subfamilia de receptores se han identificado tres subtipos que han sido denominados como 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}. Están unidos a proteínas G estimulando la fosfolipasa C lo que genera una despolarización, los receptores 5-HT₂ presentan una función de centinela, teniendo muy poca actividad fisiológica, sin embargo es activo en situaciones patológicas y en tejidos dañados⁷⁸⁻⁸³.

Receptor 5-HT_{2A} se ha localizado en la corteza frontal, prefrontal, perceptual, centros límbicos basales, amígdala e hipotálamo. Tiene un efecto angiogénico y un efecto regulador de la temperatura la estimulación de este receptor estimula la liberación de β -endorfinas, corticosterona, hormona luteinizante y prolactina, también se ha reportado que presenta un efecto neurotrófico⁸¹⁻⁸³.

Receptor 5-HT_{2B} Este receptor se encuentra en músculo liso no vascular y en las plaquetas. Presenta un efecto vasoconstrictor y broncoconstrictor, interviene en la agregación plaquetaria⁸¹⁻⁸³.

Receptor 5-HT_{2C} Este receptor se encuentra presente en el plexo coroideo, neocorteza, centros límbicos basales, hipocampo, hipotálamo, tubérculos mamilares y sustancia negra. Presenta un efecto regulador de la producción del líquido cefalorraquídeo (LCR), es ansiogénico y disperseptivo. Estimula la secreción de ACTH, LHRH, oxitocina, vasopresina y prolactina⁸¹⁻⁸³.

Receptor 5-HT₃

Este receptor se encuentra en el bulbo raquídeo, músculo liso vascular y no vascular y el tejido cardíaco, es muy distinto a los demás tipos de receptores serotoninérgicos, las subunidades del receptor 5-HT₃ forman un canal catiónico pentamérico, que es selectivamente permeable a los iones Na⁺, K⁺ y Ca⁺² causando despolarización. La activación de este receptor causa la liberación de dopamina (DOPA), GABA y acetilcolina (ACh) y disminuye la liberación de noradrenalina (NA), tiene efectos depresivos y es modulador del sueño^{83,84,85}.

Receptor 5-HT₄

Es un receptor postsináptico que actúa por medio de proteínas G y AMPc estimulando a la adenilato ciclasa. Se encuentra presente en el aparato gastrointestinal, hipocampo, corazón, hipófisis, sistema límbico, colículo superior, corteza prefrontal y sustancia negra. Al ser activado induce taquicardia y efectos inotrópicos positivos y efecto peristáltico positivo^{86,87,88}.

Receptor 5-HT₅

Este receptor está unido negativamente a la adenilato ciclasa por medio de proteínas G, se encuentran dos subtipos de este receptor 5-HT_{5A} y 5-HT_{5B} sus efectos fisiológicos aun no han sido descritos pero estudios con anticuerpos específicos sugieren que este receptor se expresa principalmente en las células gliales^{86,88}.

Receptor 5-HT₆

Este tipo de receptor se localiza principalmente en la corteza, hipocampo, accumbens, caudado y tubérculos olfatorios. Está unido a proteínas G y AMPc estimulando la adenilato ciclasa. Tiene efecto psicogénico, disperseptual y es depresogénico^{81,88}.

Receptor 5-HT₇

Se localiza principalmente en el hipocampo, hipotálamo, tálamo, corteza y amígdala. Actúa por medio de proteínas G y AMPc, estimulando a la adenilato ciclasa. Tiene efectos en la regulación del ciclo de sueño-vigilia, acelera el ritmo cardíaco y es regulador neurovegetativo y neuroendocrino^{86,88}.

III.3.- SISTEMA GUSTATIVO-SISTEMA SEROTONINÉRGICO

Hasta la fecha la serotonina es el neurotransmisor más estudiado en la señalización gustativa, mediante experimentos de inmunohistoquímica la presencia de serotonina en un subtipo de células gustativas del tipo III ha sido reportada por varios autores tanto en la rata⁸⁹, ratón⁹⁰, conejo⁹¹ y mono⁹².

Así mismo se ha reportado la presencia de 5-HT en células basales de papilas gustativas de ajolote^{93,90}. Investigadores japoneses por técnicas de autoradiografía cuantitativa reportaron el almacenamiento y la liberación de 5-HT en ciertas células gustativas de anfibio *Necturus Maculosus*⁹⁴. Por medio de técnicas de biología molecular investigadores han reportado la expresión del transportador de serotonina (5-HTT) en células gustativas de la rata⁹⁵.

Recientemente se ha reportado que el receptor 5-HT_{2C} funciona como un autoreceptor para los procesos de liberación de serotonina, cuando este receptor expresado en células CHO, estos estudios se realizaron con el fin de estudiar los procesos de liberación de 5-HT a partir de las células gustativas⁹⁶. De esta manera los investigadores demostraron que la estimulación de los corpúsculos gustativos de ratón, por compuestos dulces, amargos o ácidos involucra la liberación de 5-HT, pero de manera interesante esta liberación de 5-HT, al parecer, inicia sin estar relacionada con la concentración de calcio extracelular.

Estudios realizados con la técnica de Patch-clamp, donde se registra la actividad de las células gustativas han mostrado que la serotonina regula la apertura de canales de calcio en las células gustativas de los anfibios⁹⁷ e inhibe el flujo de iones Na^+ y K^+ en células gustativas de mamíferos⁹⁸, experimentos realizados por técnica de RT-PCR e inmunohistoquímica reportaron que en las papilas gustativas de ratas adultas se expresan dos tipos de receptores serotoninérgicos; el receptor 5-HT_{1A} y el receptor 5-HT₃ curiosamente estos estudios mostraron que el receptor 5-HT_{1A} se expresa en células gustativas que no expresan serotonina y el receptor 5-HT₃ se expresa en las fibras nerviosas aferentes⁹⁹.

En base a estas observaciones se propone que ciertas células gustativas del tipo III al percibir un estímulo sávido liberan 5-HT, así mismo, la 5-HT liberada modula la actividad de las células gustativas adyacentes mediante la interacción con el receptor 5-HT_{1A} (vía paracrina) y mediante la interacción con el receptor 5-HT₃ (vía sináptica) estimula a las fibras aferentes. Este escenario aun deja muchas cosas de entre dicho, por que a la fecha no se sabe si de donde proviene la 5-HT contenida en las células gustativas, dicho de otra forma, se desconoce si las células gustativas son capaces de sintetizar serotonina o si solamente tienen la capacidad de almacenar a esta amina. Así mismo la inactivación genética del receptor 5-HT₃ no tiene ningún efecto sobre la percepción de los sabores dulce, amargo, ácido o agrio¹⁰⁰.

OTROS SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN

Existen reportes que indican que el adenosin trifosfato (ATP) es también un neurotransmisor implicado en la señalización gustativa, estas aseveraciones se basan en experimentos donde se ha comprobado que las fibras aferentes que inervan a los corpúsculos gustativos, expresan receptores purinérgicos de tipo P2X₂ y P2X₃¹²³, así mismo se ha reportado la participación de estos receptores en la transmisión de señales gustativas entre las células y fibras gustativas¹²⁴, cuando se ha inhibido genéticamente la expresión de los receptores P2X₂ y P2X₃, los animales en estudio no reportan respuestas a estímulos gustativos, sin embargo los animales no pierden la capacidad de percibir temperatura y tacto.

También existen reportes en los cuales se ha implicado otros neurotransmisores como la noradrenalina (NA), acetilcolina (ACh) y el glutamato (Glu), también diversos péptidos como la colecistoquinina (CKK), péptido vasóactivo intestinal (VIP), neuropéptido Y (NPY) y leptina. La única evidencia que permite sugerir la actividad de estos neuromoduladores en la señalización gustativa, es su localización tanto de ellos, como de sus receptores al interior de los corpúsculos gustativos^{125,126,127}.

III.4.- DESARROLLO Y PLASTICIDAD DEL SISTEMA GUSTATIVO

En los párrafos anteriores se explica a grosso modo el funcionamiento, y los neurotransmisores que participan en la integración, de la señal gustativa. Pero las células gustativas están sometidas a un proceso constante de renovación por citar un ejemplo en el ratón el tiempo de vida promedio es de 9-10 días¹⁰¹, como es de esperarse, para mantener el mismo nivel y calidad de la percepción de las señales gustativas toda la terminación nerviosa que se desprende de una célula muerta se debe de fijar a una célula en diferenciación, de tal suerte que una fibra nerviosa que estuvo en contacto con una célula que responde a estímulos dulces forme sinapsis con una célula del mismo tipo.

Hasta la fecha los mecanismos moleculares así como los factores celulares que controlan los procesos de renovación se desconocen en gran medida. Así mismo se desconoce los factores y mecanismos que regulan la pérdida de la sinapsis, muerte y diferenciación de las células gustativas en el adulto.

Esta falta de conocimiento es causada en gran parte por la imposibilidad de estudiar *in Vitro*, los procesos de renovación e innervación de las células gustativas aisladas a partir de lenguas de animales adultos. Se cuenta con un cierto número de datos obtenidos a partir de estudios realizados con embriones.

La formación de los corpúsculos gustativos y las papilas se inicia poco después de la aparición de las primeras fibras nerviosas en la lengua (12.5 días embrionarios E12.5) y se forman a partir del endodermo¹⁰², sin embargo recientes reportes donde explantes de endodermo de salamandra sin innervación son

sometidos a cultivo, las papilas gustativas se desarrollan con la misma morfología y su diferenciación celular ocurre con el mismo perfil temporal como si ocurriera *in Vivo*¹⁰³, también se ha reportado que los precursores gustativos existen antes de que las células sean inervadas¹⁰⁴ las observaciones anteriores han llevado a muchos investigadores a proponer que el desarrollo de los corpúsculos gustativos y papilas gustativas, son un proceso inherente al epitelio lingual y no dependen de las señales provenientes de las fibras nerviosas¹⁰²⁻¹⁰⁴.

Sin embargo aun que se presente la diferenciación de los corpúsculos y papilas putativas se presente en ausencia de la inervación, *in Vitro*, no se puede garantizar la viabilidad y morfología totalmente¹⁰⁵. Cuando se seccionan los nervios facial y glossofaríngeo se ha observado una disminución progresiva del número de los corpúsculos gustativos, después de que la inervación es restablecida el número de corpúsculos gustativos se regenera¹⁰⁶⁻¹¹⁰. Cuando se suprime la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y la neurotrofina 3 (NT3) se observa una severa disminución en la inervación gustativa y somatosensorial del número de corpúsculos gustativos y de las papilas fungiformes^{111,112,113}.

Estas observaciones llevan a la conclusión de que si bien los corpúsculos y papilas gustativas pueden diferenciarse en ausencia de la inervación, las neurotrofinas y otros factores tróficos aun no identificados, son esenciales para garantizar la correcta diferenciación y conservación de los corpúsculos gustativos.

Es importante hacer notar que no solo el BDNF y la NT3 están involucrados en los procesos de diferenciación de los corpúsculos gustativos también pueden estar en parte regulados por la proteína señal sonic hedgehog (Shh) o por proteínas morfogénicas de hueso (Bmp) del tipo Bmp2, Bmp4y Bmp7, las propuestas anteriores se basan en estudios en biología molecular donde se observa que la expresión de RNA mensajeros se presenta en tiempo y espacio en la formación de las papilas gustativas^{114,115}, así mismo, recientes estudios han mostrado que el bloqueo farmacológico *in Vitro* de la actividad de las Bmp y de la Shh conduce a un aumento en el número de las papilas fungiformes^{116,117} y disminución¹¹⁸ de las mismas.

El epitelio lingual además de poseer la capacidad de autorregular la diferenciación de las papilas gustativas, también posee la capacidad de regular la innervación¹¹⁹, Algunos investigadores plantean que el proceso de innervación comprende dos etapas, la primera en la cual los axones de las neuronas aferentes son orientados hacia la cavidad bucal por factores celulares que ejercen su acción a larga distancia sobre las fibras nerviosas. Y posteriormente las señales emitidas por los precursores de los corpúsculos gustativos controlan el desarrollo y especifican el sitio donde se debe establecer la sinapsis.

Otros autores¹²⁰ reportan que la primera parte de la primera parte de la innervación gustativa es regulada por la semaforina III/D, en la mutación nula de los receptores para la semaforina se observan alteraciones en la trayectoria axonal del nervio trigémino¹²¹, Por otro lado el BDNF ha sido implicado en el establecimiento de los contactos sinápticos entre las células gustativas y las fibras aferentes primarias¹²², de hecho la sobre expresión de esta proteína ha reportado una reducción en el número de terminales nerviosas en los corpúsculos gustativos, así como, aberraciones morfológicas en los corpúsculos gustativos y sinapsis no funcionales.

Existen propuestas de otros factores que intervienen en el desarrollo del sistema gustativo, estas propuestas cabe señalar que se han hecho solo en base a su expresión genética en el epitelio lingual durante el desarrollo como son; el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de diferenciación neurogénica.

IV.- JUSTIFICACIÓN

Existe un gran número de evidencias que implican a la 5-HT en la detección y transmisión de las señales gustativas en las cuales se ha mostrado la 5-HT despolariza a las neuronas aisladas de las fibras aferentes primarias que inervan a los corpúsculos gustativos¹²⁸, así como reduce la permeabilidad a los iones Na^+ y $\text{K}^{+(129,130)}$. En forma particular las células gustativas de los mamíferos incluyendo las de los humanos, tiene la capacidad de almacenar y liberar 5-HT^{131,132}. Gran cantidad de estudios mencionados anteriormente demuestran que la 5-HT además de fungir como neurotransmisor tiene un papel como factor trófico en procesos como diferenciación celular, proliferación celular,

morfogénesis craneofacial, crecimiento cardíaco y crecimiento y migración axonal¹³³.

En gran parte el papel que desarrolla la 5-HT en los procesos anteriores se ha observado en adultos, sin embargo se ha reportado que la 5-HT regula procesos de innervación, diferenciación de las células y corpúsculos gustativos en etapas embrionarias. Estudios de biología molecular, realizados en embriones de ratón, han permitido mostrar que las células del epitelio lingual codifican ARNm para el transportador para serotonina (5-HTT)¹³⁴. También se ha identificado la expresión de las dos isoformas de la MAO (A y B), enzima responsable de la biotransformación de la serotonina, en el epitelio lingual de embriones de ratón de 17 días de gestación¹³⁵. Se ha reportado la presencia de 5-HT en células basales gustativas de ajolote, la importancia de esta observación radica en el hecho de que la 5-HT está implicada en el mantenimiento de la integridad morfológica de las células gustativas, así como en el inicio de los procesos de innervación de estas células.

Las anteriores evidencias experimentales sugieren que existe un sistema serotoninérgico inherente al epitelio lingual y que la 5-HT no solo presenta un papel como neurotransmisor. También como un factor trófico.

Por otro lado no se conoce si existen receptores serotoninérgicos en las papilas gustativas en etapas embrionarias por lo que proponemos la siguiente hipótesis.

V.- HIPÓTESIS

“Existen receptores serotoninérgicos en las papilas caliciformes de embriones de ratón.”

VI.- OBJETIVO GENERAL

Estandarizar la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de la expresión de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, 5-HT_{2B} y 5-HT₃ en papilas caliciformes de ratones a E17.

VII.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Estandarizar la técnica de RT.-PCR para los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, 5-HT_{2B} y 5-HT₃.
- ❖ Estandarizar la técnica de PRC para los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, 5-HT_{2B} y 5-HT₃.
- ❖ Identificación de la expresión de los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, 5-HT_{2B} y 5-HT₃.

VIII.- MATERIAL Y MÉTODOS

Para el presente trabajo se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6J a día postnatal cero (P0), los animales fueron mantenidos en condiciones de ambiente estándar: ciclos de luz –oscuridad de 12 H, con alimentación y agua *ad libitum*.

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

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

VIII.1.- OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se utilizaron muestras de la papila caliciforme a día embrionario 17 (E17), los ratones hembra a E17 se sacrificaron por dislocación cervical y se procedió a obtener los fetos por medio de cesaría. Posteriormente se procedió a realizar microdissección en la lengua para obtener la papila caliciforme. Debido al reducido tamaño de la papila caliciforme (1-2 mm de diámetro en el ratón adulto), se colectaron de 2 a 4 papilas caliciformes para realizar los ensayos.

Como control se procedió a obtener RNA total de la corteza cerebral y cerebelo, de ratones adultos, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, posteriormente se realizo disección de corteza cerebral y cerebelo. A los tejidos anteriores se les aplico el mismo tratamiento que a las papilas, el DNAC que se obtuvo al final no sirvió para correrlo como control, al cual se le denomino como control positivo.

VIII.2.- Extracción del RNA total.

El RNA fue extraído utilizando el reactivo TRI de la casa comercial SIGMA. Después de la disección las pailas caliciformes fueron inmediatamente introducidas en un tubo Eppendorf libre de ARNasas y ADNasas que contenía 750 μ L de TRI y homogeneizadas con ayuda de un mini polytron. El homogeneizado se agitó por 15 segundos y en presencia de 200 μ L de cloroformo por mililitro de TRI usado para homogeneizar. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente por 5 minutos y centrifugada a 12, 000 g durante 15 minutos a 4°C, el ARN fue recuperado de la fase acuosa. La fase acuosa recuperada en un tubo nuevo fue tratada con isopropanol (500 μ L/mL de TRI), después de la incubación por 5-10 minutos a temperatura ambiente se centrifugó (12, 000 g) por 8 minutos a 4°C. Después de la centrifugación el sobrenadante fue eliminado y la pastilla depositada en el fondo del tubo se lavo con 1 mL de etanol al 75%. Después de eliminar el etanol el tubo se dejó secar por 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Finalmente el ARN fue resuspendido en 20 μ L de agua libre de ARNasas (Invitrogen).

El ARN obtenido se trató con 1 unidad (U) de DNase libre de RNase (SIGMA) en un medio de reacción (SIGMA) durante 30 minutos a 37°C. Después de un proceso de purificación, el ARN fue recuperado en 20 μ L de agua libre de ARNasas. El ARN se guardó a -80°C para evitar la degradación.

Cuantificación y análisis de la pureza del ARN

Es necesario conocer la pureza del RNA aislado par realizar los experimentos, para este fin realizamos la cuantificación y análisis de la pureza del RNA por espectrofotometría. Se realizaron diluciones 1:100 con agua estéril, las bases púricas y pirimídicas absorben a 260 nm y las proteínas residuales de los procesos anteriores absorben a 280 nm. Una unidad de densidad óptica (DO) es equivalente a 40 μ g de RNA/ mL. Para el análisis se obtiene la relacion de las densidades ópticas DO_{260}/DO_{280} si el cociente de esta relación es mayor o igual a 1.8 indica que la dilución de RNA es de lata pureza.

VIII.3.- Reacción de transcriptasa reversa (RT)

La RT es una reacción que nos permite obtener ADN complementario (ADNc) a partir de un fragmento del RNA que nos interesa. Posteriormente el DNAc es usado para amplificar esta cadena mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Las ADN polimerasas dependientes de ARN o retrotranscriptasas son capaces de sintetizar ADNc partiendo de ARN. Esta reacción se lleva a cabo a partir de una matriz de ARN, con cebadores (oligo-dT o random primers) y dNTP's en un medio de reacción favorable para la enzima.

De la dilución de RNA_t usamos 2 µg para la síntesis de DNAc, usando 200UI de Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT), de la comercializadora Promega. Llegando a un volumen final de 25 µL, con la mezcla de los random primers y el medio de reacción proporcionado por el fabricante. En cada reacción se corrió un control en el cual la enzima transcriptasa reversa fue sustituida por agua. Dicho control fue identificado como RT negativo, RT(-). La concentración de ADNc fue determinada por espectrofotometría a 260 y 280 nm en una dilución 1:50 con agua estéril.

VIII.4.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Esta técnica nos permite sintetizar *in Vitro* un fragmento de DNA simulando las condiciones *in Vivo*, para la síntesis de las cadenas complementarias de DNA por medio de esta técnica es necesario contar con una cadena matriz de DNA, ya sea que se realice la extracción directa de DNA o que sea DNAc como en nuestro caso que proviene de una retrotranscripción previa, cada vez que se repite el proceso el número de cadenas si se repite el proceso 20 veces (20 ciclos) al final teóricamente tendremos 2^{20} el número de cadenas iniciales o templado.

La reacción se efectúa en tres etapas: En la primera la mezcla de reacción se calienta para separar la doble hélice del DNA en cadenas sencillas, a esta etapa se le da el nombre de desnaturalización. En la siguiente etapa los cebadores u oligonucleótidos se hibridan a las cadenas sencillas, esta etapa se conoce como alineamiento y finalmente se procede con la extensión, en ella se sintetizan las cadenas complementarias a partir de los oligos alineados. Todo el procedimiento se realiza en un solo tubo variando la temperatura, en estas reacciones no se

produce una desnaturalización de la polimerasa puesto que se usan enzimas termoestables.

Las aplicaciones de esta técnica son numerosas. Así, la PCR es utilizada para analizar de manera cualitativa la presencia de un fragmento de ADN o de ARN cuando este es convertido a ADNc por la RT. Esta etapa previa es necesaria porque la matriz, a partir de la cual el fragmento de interés es amplificado, debe ser de ADN. De esta manera, la PCR permite determinar la expresión de ARNm que codifiquen para una proteína o para un péptido de interés. Para la realización del presente trabajo usamos esta técnica para determinar la expresión de los receptores serotoninérgicos presentes en la papila caliciforme del ratón.

El diseño y elección de los oligonucleótidos puesto que su composición es un factor que influye directamente en la temperatura de fusión (T_m). Cuando se presentan secuencias de oligonucleótidos muy largas, estos pueden adoptar formas secundarias afectando la correcta hibridación con la matriz. Determinar exactamente la temperatura de hibridación es determinante para el correcto empleo de esta técnica, la temperatura de hibridación es cercana a la T_m de los oligonucleótidos. Si se trabaja con temperaturas menores a la de hibridación se producen frecuentemente amplificaciones inespecíficas, es decir, que se amplifican fragmentos diferentes a los de interés. También es común que si se incrementa la temperatura los resultados no son los deseados, por que el incremento exagerado de la temperatura interfiere con la correcta alineación de los oligonucleótidos con la matriz.

En cuestión a la duración de los tiempos para cada ciclo varia según el tamaño del fragmento y el tipo de DNA polimerasa utilizada. Para amplificar fragmentos largos los tiempos de extensión y desnaturalización son más largos en comparación a los tiempos que llevaría hacer estos procesos en fragmentos más pequeños.

Para la determinación de la expresión de los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, 5-HT_{2B} y 5-HT₃ se utilizaron 4 μ L del producto de la reacción de la retrotranscripción como matriz para la PCR usando AccuPrime Pfx DNA

polimerase (Invitrogen) llevando la reacción a un volumen final de 40 μ L siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las reacciones identificadas como RT (-) se utilizaron como control en el análisis de la expresión de los receptores.

Las condiciones de reacción para la PCR fueron; un ciclo inicial de desnaturalización a 95° C durante 5 minutos, a continuación se realizó 38 ciclos de 95° por 5 minutos, para el receptor 5-HT_{1A} 62° C por noventa segundos, para el receptor 5-HT_{2B} 61.5° C por noventa segundos y para el receptor 5-HT₃ 55° C durante noventa segundos y un paso final de 72° durante un minuto, para la etapa de la amplificación. Posteriormente se realizó un ciclo de 72° C durante siete minutos.

En la tabla I presentamos la secuencia de los oligonucleótidos que usamos para la amplificación de los fragmentos correspondientes a cada receptor. Para el receptor 5-HT_{1A} corresponde a los nucleótidos 822-979, con el código de acceso NM-008308 (Invitrogen) la talla del fragmento que esperamos es de 157 pares de bases. Para la amplificación del receptor 5-HT_{2B} los nucleótidos corresponden a la posición 382-831 con una talla molecular de 473 pares de bases con código de acceso de BC_0236901. Finalmente para la amplificación del receptor 5-HT₃ la secuencia de nucleótidos están en la posición 213-400 con una talla molecular de 187 pares de bases con código de acceso AY_605711.

Oligonucleótido	Secuencia
5-HT _{1A} sentido	5'CTGTTTATCGCCCTGGATGT3'
5-HT _{1A} antisentido	5'ATGAGCCAAGTGAGCGACGAGAR3'
5-HT _{2B} sentido	5'CAGAAGACATGTGATCACCTGATC3'
5-HT _{2B} antisentido	5'TGTAATCTTGATGAATGCAGTAGCC3'
5-HT ₃ sentido	5'CATGATTGCCATCTTCAACG3'
5-HT ₃ antisentido	5'CAACGTCCACAAACTCATTG3'

Tabla I. Secuencia de los oligonucleótidos usados para el análisis de la expresión de los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, 5-HT_{2B} y 5-HT₃ mediante la técnica de PCR.

Para la electroforesis se suspendieron 14 μ L de los productos de la PCR en 3 μ L de azul de bromofenol y se colocaron en un gel de agarosa al 2%, el tiempo de la

corrida fue de 2 horas a 70 V. Al término de la electroforesis las bandas se observaron con luz UV, utilizándose como referencia un marcador de peso molecular de 100 pares de bases por fragmento, Φ X174 Hae III Digest de la casa comercia SIGMA (Figura 11).

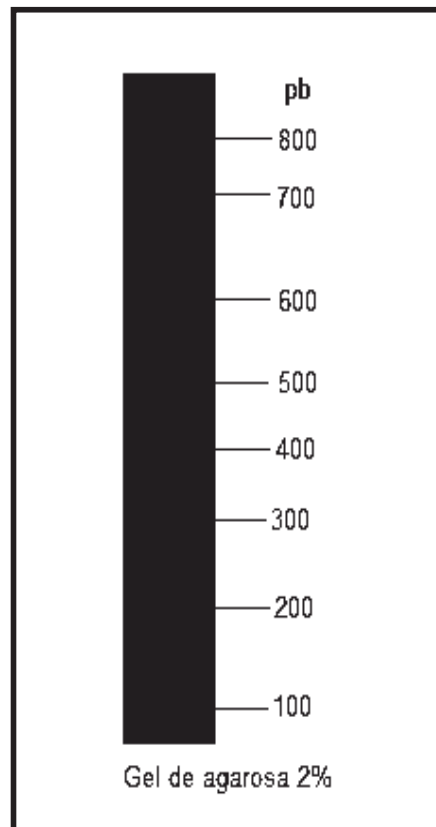


Figura 11 marcador de peso molecular

IX.- RESULTADOS

Durante la etapa de estandarización de la PCR para este trabajo, trabajamos con diferentes condiciones de reacción para buscar la temperatura de hibridación (T_m) adecuada, así como variamos el numero de ciclos de duración en cada ensayo hasta que finalmente obtuvimos las bandas de la talla esperada y sin ninguna inespecificidad. A continuación mostramos la secuencia cronológica de la estandarización de la PCR.

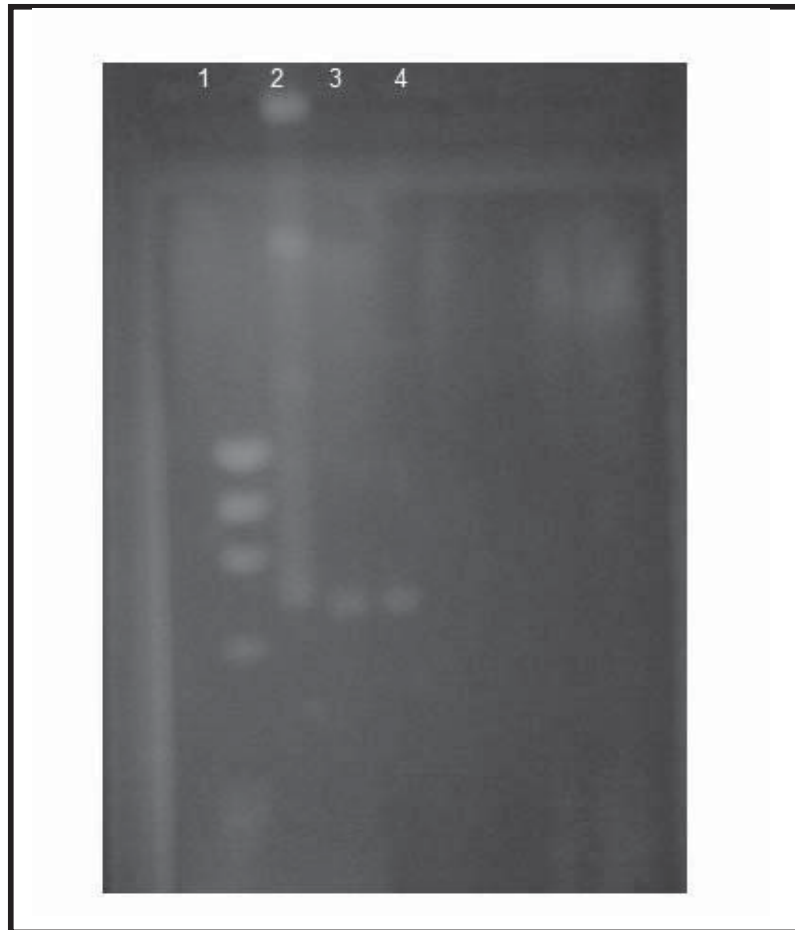


Figura 12. Se muestra en el carril 1 el marcador molecular, los carriles 2, 3 y 4 se muestra al receptor metabotropico para glutamato de tipo 4 mGluR4, en este ensayo buscábamos valorar el estado de nuestros reactivos. Las bandas son especificas y con la talla esperada de aproximadamente 600 pb.

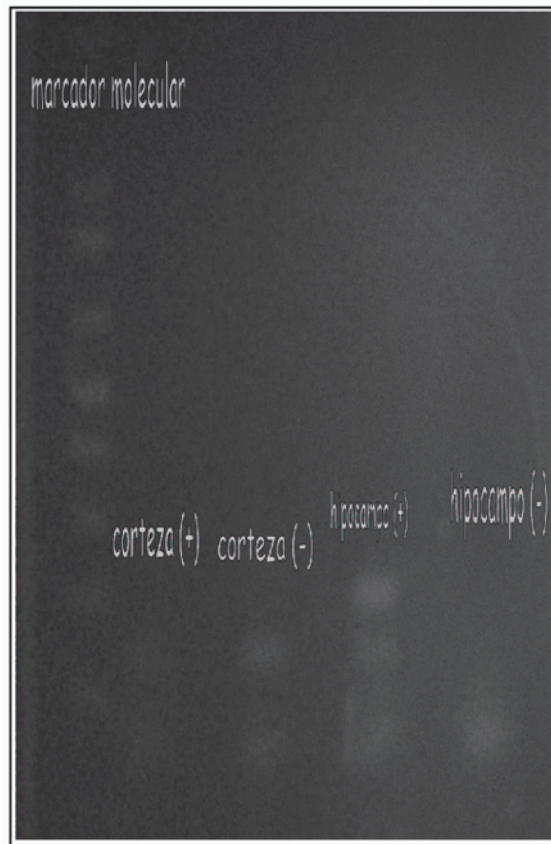


Figura 13. El marcador molecular se observa bien definido, en los cuatro carriles restantes se observa la expresión del receptor 5-HT_{1A}, expresado en la corteza cerebral y el hipocampo respectivamente. En el carril de corteza (+) se distingue la banda específica a aproximadamente 158 pb. Pero en corteza (-) también se observa esta banda, en este experimento se comprueba que el tratamiento de purificación con la DNasa no fue efectivo y la banda que se observa es el resultado de la amplificación del DNA genómico resultante. Por otro lado en el Hipocampo (+) se observan dos bandas una que corresponde a la talla reportada para el receptor 5-HT_{1A} y otra poco después de las 200 pb, en este caso sospechamos que la temperatura de hibridación fue muy baja (57° C) y por lo tanto se presenta esta inespecificidad

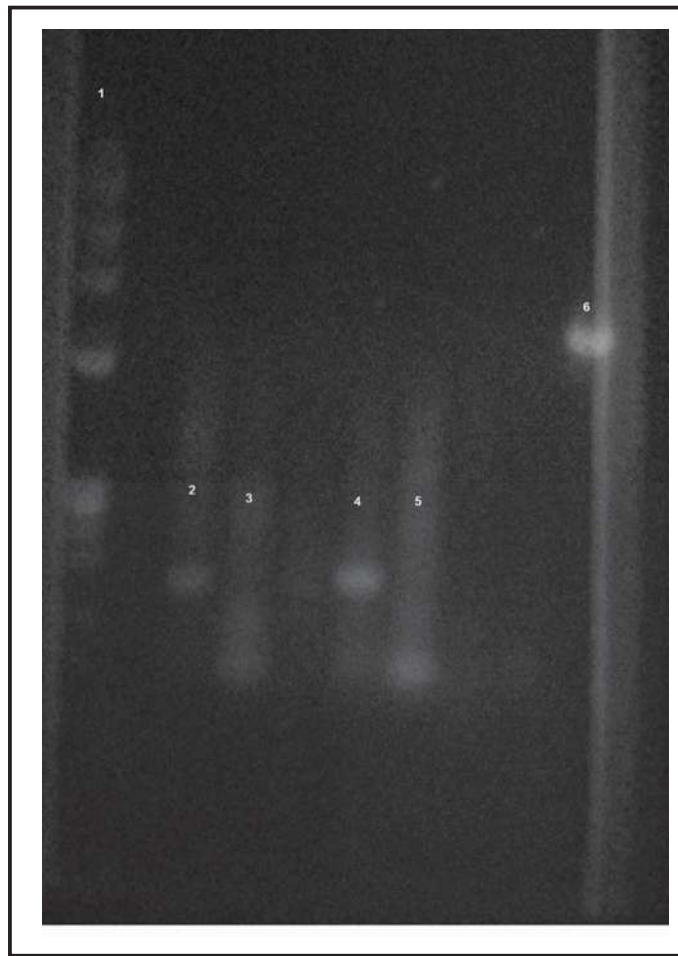


Figura 14. En el carril 1 se observa el marcador molecular, carril 2 Receptor 5-HT_{1A} expresado en corteza cerebral de ratón adulto, carril 3 control RT(-) de corteza cerebral, Carril receptor 5-HT_{1A} expresado en el hipocampo de ratón adulto en este ensayo la temperatura de fusión para el hipocampo se incremento a 62° C siendo eliminada la inespecificidad que se observaba anteriormente. carril 5 control RT(-) de hipocampo, carril 6 receptor mGluR4 expresado en la corteza cerebral de ratón adulto. En el caso de el receptor 5-HT_{1A} las bandas se observan especificas a una talla esperada de 158 pb y para el receptor mGluR4 la banda se observa a la talla esperada de aproximadamente 600 pb.

Una vez que se logro estandarizar la técnica de PCR se procedió a trabajar con el material genético que aislamos de las papilas caliciformes de embriones de ratón

a E17. Al RNA que se obtuvo inicialmente se purifico, posteriormente se cuantifico y se analizo su pureza. A continuación se procedió a realizar una purificación del DNA residual del proceso de extracción, posteriormente se realizo una RT-PCR para obtener el cDNA, después realizamos una amplificación por medio de la técnica de PCR y finalmente los productos de PCR fueron observados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Las condiciones de reacción que se llevaron para este ensayo fueron:

95° C por 5 minutos.	1 ciclo
95° C por 1 minuto	38 ciclos
57° C por 90 seg. para 5-HT _{1A}	
55° C por 90 seg. Para 5-HT _{2B}	
61.5° C por 90 seg. Para 5-HT ₃	
72° C por 1 minuto.	
72° C por 1 minuto.	1 ciclo

Se tomo la decisión de usar material genético aislado de las papilas caliciformes de embriones de ratón a E17 por que a E13 aun no aparecen en el tejido epitelial y a E15 por que son muy pequeñas las papilas por lo cual se presentan ciertas limitaciones técnicas. Los controles que se sometieron al mismo procedimiento fueron obtenidos de corteza cerebral de ratón adulto donde se expresan con certeza los receptores serotoninérgicos que sometimos a estudio en el presente trabajo.

En la figura # en el carril 1 se observa la escalera molecular, en el carril 2 esta los productos de PCR para el receptor 5-HT_{1A} de papila caliciforme a E17, no se presenta ninguna banda y también se observa un barrido el cual se piensa que es producido por que nuestro cDNA este degradado parcialmente.

En el carril 3 se encuentran los productos de PCR para el receptor 5-HT_{2B}, al igual que en el caso del receptor 5-HT_{1A} no se observa ninguna banda pero a diferencia del carril 2 no se presenta barrido esto puede ser debido a que el

receptor en esta etapa del desarrollo no se este expresando en las papilas caliciformes.

En el carril 4 se colocó los productos de PCR para el receptor 5-HT₃ en este caso se observa una banda claramente definida y específica a aproximadamente 180 pb. Lo cual coincide con la talla del receptor 5-HT₃ reportada.

En el carril 5 se colocaron los productos de la PRC para el receptor 5-HT_{1A} en corteza cerebral de ratón adulto, no se presenta ninguna banda, en el carril 6 se colocaron los productos de PCR para el receptor 5-HT_{2B} en corteza cerebral de ratón adulto, al igual que en la papila caliciforme no se presenta ninguna banda esto nos hace sospechar que quizá la temperatura de fusión usada en este ensayo para el receptor 5-HT_{2B} fue muy elevada y no se logró una correcta alineación de los oligonucleótidos y por lo tanto no se presenta amplificación.

En el carril 7 se colocaron los productos para de PCR para el receptor 5-HT₃ en corteza cerebral de ratón adulto, al igual que en la papila caliciforme se observa una banda específica y bien definida a aproximadamente 180 pb. La cual coincide con la talla del receptor reportada. Esta banda confirma que la banda observada en el carril 4 corresponde al receptor 5-HT₃ expresado en la papila caliciforme a E17 (figura 14).



Figura 15. Carril 1 marcador molecular. Carril 2 productos de PCR a E17 en papila caliciforme (PC) para el receptor 5-HT_{1A}, no se observa ninguna banda. Carril 3 productos de PCR a E17 en PC para el receptor 5-HT_{2B}, no se observa ninguna banda. Carril 4 productos de PCR a E17 en PC para el receptor 5-HT₃ se observa una banda a aproximadamente 180 pb. Carril 5 productos de PCR de corteza cerebral de ratón adulto para el receptor 5-HT_{1A}, no se observa ninguna banda. Carril 6 productos de PCR de corteza cerebral de ratón adulto para el receptor 5-HT_{2B}, no se observa ninguna banda. Carril 7 productos de PCR de corteza cerebral de ratón adulto para el receptor 5-HT₃ se observa una banda a aproximadamente 180 pb.

X.- DISCUSIÓN

La talla de la banda obtenida en los ensayos a E17 en papila caliciforme corresponde a la talla reportada en la literatura, para el receptor 5-HT₃ lo cual indica la expresión de este receptor en la papila caliciforme, durante la esta etapa embrionaria, es la primera vez que se reporta la expresión del receptor 5-HT₃ en las papilas caliciformes de embriones todos los reportes anteriores se han hecho con animales adultos⁹⁹, por lo cual estos resultados sugieren fuertemente que la 5-HT esta presente durante el desarrollo del sistema gustativo y que quizá la 5-HT juega un papel de factor trófico durante el desarrollo del sistema gustativo.

Por otro lado el hecho de que en nuestros ensayos no hayamos observado bandas correspondientes a los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} y 5-HT_{2B} no quiere decir que estos receptores no se expresan, probablemente nuestra técnica de PCR no es tan sensible como para amplificar los respectivos cDNA. También es posible que el perfil temporal de expresión para estos receptores no sea el indicado.

Como se mencionamos en la introducción las papilas caliciformes aparecen a partir del E12.5 por lo cual hacer una disección de ellas a E13 resulta complicado por el pequeño tamaño que presentan las mismas, así como un factor importante de por que tomamos las muestras a esta edad (E17) es por que el sistema gustativo es funcional hasta la segunda semana de vida neonatal, pero si tomamos en cuenta que aun en los primeros días de vida las crías de ratón consumen leche y este hecho puede alterar el desarrollo del sistema gustativo, entonces nuestros ensayos ya estarían influenciados por esta variable. Por las razones anteriores es que tomamos la decisión de usar material genético extraído de papilas caliciformes a E17

REFERENCIAS

1. Jayaram C., Marck A.H., Nicholas J. P., Charles S. Z. (2006) The receptors and cells for mammalian taste. Nature vol 16 288-293.

2. Lindemann, B. (2001). Receptors and Transduction in Taste. *Nature* 413: 219-225.
3. Mattes RD. (1997). Physiologic responses to sensory stimulation by food: nutritional implications. *J. Am. Diet. Assoc.* 97:406-13.
4. Angela L. H., Xiaoke C., Mark A. H., Jayaram C., Wei G. (2006) the cell and mammalian sour taste detection. *Nature* 24 934-938.
5. Ortiz A. R., Guzman Q. O., Mercado C. R., Heartle T., Vignes C. & Bolaños J. F., (2006) Expression of triptophan Hidroxilase in developing in mouse taste papillae *FEBS* 5371-5376.
6. Hoon M. A., et al. Putative mammalian mouse taste cells respond to multiple chemical stimuli. (1980) *Brain res.* 196, 513-519.
7. Erickson R.P., the evolution of neural coding ideas in the chemical senses (2000). *Physiol. Behav* 69, 3-13.
8. Nelson G. et al mammalian sweet taste receptors (2001). *Cell* 106, 381-390.
9. Guyton, A.C. (1996). *Précis de Physiologie Médicale*. Piccin Nuova Libreria, Padoue, Italie.
10. Buck L, Axel R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors : a molecular basis for odor recognition. *Cell*. 65:175-187.
11. Nelson G. et al. Amino-acid taste receptors. *Nature* 416, 199-202 (2002).
12. Adler E. et al A novel family of mammalian taste receptors. (2000) *Cell* 100, 693-702.
13. Smith D.V. & St. John S.J. Neural Coding gustatory information. (1999) *Cur. Opin. Neurobiol.* 9, 427-435.
14. Li X. et al. Human receptor for sweet and umami taste. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2002) 99, 4692-4696.
15. Kitagawa M., Kusakabe Y., Miura H., A. molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2001) 283, 236-242.
16. Zaho G. Q., et al. The receptor for mammalian sweet and umami taste. (2003) *Cell*. 115, 255-266.
17. Nelson G., Chandrashekar J., Hoon M.A, Feng L, Zhao G, Ryba NJ, Zuker C.S. (2002). An amino-acid taste receptor. *Nature* 416 :199-202.
18. Krizhanovsky V, Agamy O, Naim M.(2000). Sucrose-stimulated subsecond transient increase in cGMP level in rat intact circumvallate taste bud cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279: C120-5.
19. Hoon M.A, Adler E, Lindemeier J, Battey J.F, Ryba NJ, Zuker C.S. (1999). Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell* 96: 541-551.
20. Matsunami H. Montmayeur J.P., & Buck L. B. (2000) A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* 404, 601-604.
21. Wong G.T, Gannon K.S, Margolskee R.F. (1996). Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature* 381: 796-800.
22. Naim M, Seifert R, Nurnberg B, Grunbaum L, Schultz G.(1994). Some taste substances are direct activators of G-proteins. *Biochem J.* 297: 451-454.
23. Chaudhari N, Yang H, Lamp C, Delay E, Cartford C, Than T, Roper S. (1996). The taste of monosodium glutamate: membrane receptors in taste buds. *J Neurosci.* 16: 3817-3826.

24. Chaudhari N, Landin AM, Roper S.D. (2000). A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor. *Nat Neurosci* 3: 113-119.
25. Toyono T, Seta Y, Kataoka S, Kawano S, Shigemoto R, Toyoshima K. (2003). Expression of metabotropic glutamate receptor group I in rat gustatory papillae. *Cell Tissue Res*. 313: 29-35.
26. Li X, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M, Adler E. (2002). Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 99: 4692-4696.
27. Lin W, Kinnamon S.C. (1999). Physiological evidence for ionotropic and metabotropic glutamate receptors in rat taste cells. *J Neurophysiol*. 82: 2061-9.
28. Boughner, J.G. (1997) Amiloride suppresses the responses to acids in NaCl best neurons of the hamster solitary nucleus. *Chem. Senses* 22, 648.
29. Avenet, P. and Lindemann, B. (1991) Noninvasive recording of receptor cell action potentials and sustained currents from single taste buds maintained in the tongue: the response to mucosal NaCl and amiloride. *J. Membr. Biol.* 124, 33-41.
30. Lindemann, B. (1996) Taste reception. *Physiol. Rev.* 76, 718-766.
31. Ye, Q., Heck, C.L. and DeSimone, J.A. (1991) The anion paradox in sodium taste reception: resolution by voltage-clamp studies. *Science* 254, 724-726.
32. Elliott, E.J. and Simon, S.A. (1990) The anion in salt taste: a possible role for paracellular pathways. *Brain. Res.* 535, 9-17.
33. Cummings, S.T. and Kinnamon, S.C. (1992) Apical K⁺ channels in *Necturus* taste cells. Modulation by intracellular factors and taste stimuli. *J. Physiol.* 99, 591-613.
34. Huang, A.L., Chen, X., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Guo, W., Trankner, D., Ryba, N.J. and Zuker, C.S. (2006) The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 442, 934-938.
35. Schiffman, S.S. (2000) Taste quality and neural coding: implications from psychophysics and neurophysiology. *Physiol. Behav.* 69, 147-159.
36. Hettinger, T.P. and Frank, M.E. (1990) Specificity of amiloride inhibition of hamster taste responses. *Brain Res.* 513, 24-34.
37. Gilbertson, D.M. and Gilbertson, T.A. (1994) Amiloride reduces the aversiveness of acids in preference test. *Physiol. Behav.* 56, 649-654.
38. Mattes R.D, Cowart B.J. (1994). Dietary assessment of patients with chemosensory disorders. *J Am Diet Assoc* 94: 50-6.
39. Schiffman S.S (1997). Taste and smell losses in normal aging and disease. *JAMA*. 278: 1357-62.
40. Sahagún-Flores, J.E., Bravo-Cuellar, A., Celis, A., Hernández-Flores, G. and Orbach-Arbouys, S. (2000) Elevated salt taste detection threshold in subjects with essential arterial hypertension. *Presse médicale* 29, 1458.
41. Le Floch J.P, Le Lievre G, Sadoun J, Perlemuter L, Peynegre R, Hazard J. (1989). Altération du goût et des facteurs associés dans le diabète de type I. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 106:455-61.
42. Kettaneh, A., Fain, O., Stirnemann, J. et Thomas, M. (2000). Les troubles du goût. *Rev Méd Interne* ; 23:622-31.
43. Stolbova K, Hahn A, Benes B, Andel M, Treslova L. (1999). Gustometry of Diabetes Mellitus Patients. *Int Tinnitus J* 5:135-40.
44. Miller S.M, Naylor G.J. (1989). Unpleasant taste a neglected symptom in depression. *J Affect Disord* 17:291-3.
45. Deems DA, Doty R.L, Settle R.G, Moore-Gillon V, Shaman P, Mester A.F, Kimmelman C.P, Brightman V.J, Snow J.B Jr. (1991). Smell and Taste disorders, a study of 750 patients from the University of Pennsylvania Smell and Taste Center. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 117:519-28.

46. Casper R.C, Kirschner B, Sandstead H.H, Jacob R.A, Davis J.M (1980). An evaluation of trace metals, vitamins, and taste function in anorexia nervosa. *Am J Clin Nutr* 33:1801-8.
47. Alfred G. G. Las bases Farmacológicas de la terapéutica (2000) vol I 265-267 novena edición.
48. Sjordsma A. Medical progres Serotonin *N. Engl. J. Med.* (1959) 261: 181-188.
49. Page I. H. The discovery of serotonin (1976). *Perspect. Biol. Med.* 20: 1-8.
50. Walther, D.J., Peter, J.U., Bashammakh, S., Hortnagl, H., Voits, M., Fink, H. and Bader, M. (2003) Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 299, 76.
51. Dahlström, A. and Fuxe, K. (1964) Localization of monoamines in lower brain stem. *Experientia* 20, 398-399.
52. Ishimura, K., Takeuchi, Y., Fujiwara, K., Tominaga, M., Yoshioka, H. and Sawada, T. (1988) Quantitative analysis of the distribution of serotonin-immunoreactive cell bodies in the mouse brain. *Neurosci. Lett.* 91, 265-270.
53. Descarries, L., Audet, M.A., Doucet, G., Garcia, S., Oleskevich, S., Seguela, P., Soghomonian, J.J. and Watkins, K.C. (1990) Morphology of central serotonin neurons. Brief review of quantified aspects of their distribution and ultrastructural relationship. *Ann. NY. Acad. Sci.* 600, 81-92.
54. Törk, I. (1990) Anatomy of the serotonergic system. *Ann. NY. Acad. Sci.* 600, 9-34.
55. Martin, L.L. and Sanders-Bush, E. (1982) The serotonin autoreceptor: antagonism by quipazine. *Neuropharmacology* 21, 445-450.
56. Fedelman, R.S. and Quenzer, L.F. (1984) Serotonin. In: *Fundamentals of Neuropharmacology*. Sinauer.
57. Gershon, M.D. (2003) Plasticity in serotonin control mechanism in the gut. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3, 600-607.
58. Lauder, J. M., Wallace, J. A. and Krebs, H. (1981) Roles for serotonin in neuroembryogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 133, 477-506.
59. Lauder, J. M. (1988) Neurotransmitters as morphogens *Prog. Brain Res.* 73, 365-387.
60. 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.
61. Shuey, D.L., Sadler, T.W. and Lauder, J.M. (1992) Serotonin as a regulator of craniofacial morphogenesis site specific malformations following exposure to serotonin uptake inhibitors. *Teratology* 46, 367-378.
62. Yavarone, M. S., Shuey, D. L., Tamir, H., Sadler, T. W. and Lauder, J. M. (1993) Serotonin and cardiac morphogenesis in the mouse embryo. *Teratology* 47, 573-584.
63. Nebigil, C.G., Choi, D.S., Dierich, A., Hickel, P., Le Meur, M., Messaddeq, N., Launay J.M. and Maroteaux, L. (2000) Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9508-9513.
64. Mercado, R. and Hernandez, J. (1992) A molecular recognizing system of serotonin in rat fetal axonal growth cones: uptake and high affinity binding. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 69, 133-137.
65. Mercado, R., Floran, B. and Hernandez, J. (1998) Regulated release of serotonin from axonal growth cones isolated from the fetal rat brain. *Neurochem. Int.* 32, 103-106.
66. Sikich, L., Hickok, J.M. and Todd, R. D. (1990) 5-HT_{1A} receptors control neurite branching during development. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 56, 269-274.

67. Haydon, P.G., McCobb, D.P. and Kater, S.B. (1984) Serotonin selectively inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurons. *Science* 226, 561-564.
68. McCobb D.P., Haydon, P.G. and Kater, S.B. (1988) Dopamine and serotonin inhibition of neurite elongation identified neurons. *J. Neurosci. Res.* 19, 19-26.
69. Lima, L., Urbina, M., Matus, P. And Drujan, Y. (1996) synthesis of serotonin from 5-hydroxytryptophan in the post-crush retina: inhibition of in vitro outgrowth by the intraocular administration of the precursor. *Neurochem. Res.* 21, 939-946.
70. Koert, C.E., Spencer, G.E., van Minnen, J., Li, K.W., Geraerts, W.P., Syed, N.I., Smit, A.B. and van Kestern, R.E. (2001) Functional implication of neurotransmitter expression during axonal regeneration: serotonin, but not peptides, auto-regulate axon growth of an identified central neuron. *J. Neurosci.* 21, 5597-5606.
71. Lima, L., Matus, P. and Urbina, M. (1994) Syntesis inhibits outgrowth of golfish retina and impairs the trophic effect of taurine. *J. Neurosci. Res.* 38, 444-450.
72. Cases, O., Vitalis, T., Seif, I., De Maeyer, E., Sotelo, C. and Gaspar, P. (1996) Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxydase A-deficient mice: role of a serotonin excess during the critical period. *Neuron* 16, 297-307.
73. Upton, A.L., Salichon, N., Lebrand, C., Ravary, A., Blakey, R., Seif, I. and Gaspar, P. (1999) Excess of serotonin (5-HT) alters the segregation of ipsilateral and contralateral retinal projections in monoamine oxydase A knock-out mice: possible role of 5-HT uptake in retinal ganglion cells during development. *J. Neurosci.* 19, 7007-7024.
74. Salichon, N., Gaspar, P., Upton, A.L., Picaud, S., Hanoun, N., Hamon, M., De Maeyer, E., Murphy, D.L., Mossner, R., Lesch, K.P., Hen, R. and Seif, I. (2001) Excessive activation of serotonin (5-HT) 1B receptors disrupts the formation of sensory maps in monoamine oxydase and 5-HT transporter Knock-out mice. *J. Neurosci.* 21, 884-896
75. Gaspar, P., Cases, O. and Maroteaux, L. (2003) The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 1002-1012.
76. Boullosa O., Lopez-Mato A. (1993) recientes avances en la configuración de la neurotransmisión serotoninérgica en: Actualización en psiquiatría biológica. Addendum Y., Ciprian-OliverJ., Eds Editorial Toquti. 13-30.
77. Giovani. Lorenzini (1992) 2nd International symposium on serotonin. Baylor College of medicine.
78. Cheng S.J., Chen K. and Gllaher T. (1995) Molecular Biology of serotonin receptors. A basis for understanding and addressing brain function in: Psychopharmacology the fourth generation progress. Ed by Bloom F. and Kupter D. Raven press, New York 415-429.
79. Glennon R., and Dukat M. (1995) serotonin receptors subtypes in: Psychopharmacology the Fourth generation of progress. Ed by Bloom F. and Kupter D. Raven press, New York. 415-429.
80. Van de Kar L. (1994) Serotonergic regulation of the secretion of prolactin and rennin in: Book of abstracts of the 5-HT. Third luphar meeting on serotonin. Chicago Illinois 53.
81. Kanneth G. (1994) Chronic treatment whit paroxetine and floxetine but not dasipramine, desansitises 5-HT_{2C} receptor function in: Book of abstracts of the 5-HT. Third luphar meeting on serotonin. Chicago Illinois 60.
82. Meltzer H.I., (1994) Role of 5-HT_{2A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors in the mechanism of action of clozapine-like atypical antipsychotic drugs. In: book of abstracts of the 5-HT third luphar meeting on serotonin. Chicago Illinois 36.

83. Meltzer H.I., (1992) The role of 5-HT in neuroendocrine function in: abstracts of 2^a international symposium on serotonin. Giovanni Lorenzani Medical Foundation. Houston.
84. Kilpatrick G. (1994) 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors in the meolimbic system. In: book of abstracts of the 5-HT third luphar meeting on serotonin. Chicago Illinois 2.
85. Wang R., Ashby C., and Zhang J. (1994) Modulation of the A10 DA system: electrophysiological studies of the role of 5-HT₃-like receptor In: book of abstracts of the 5-HT third luphar meeting on serotonin. Chicago Illinois 2.
86. Bockart J., Ansanay H., Sabben M., WEaber C., Duminus (1994) 5-HT₄ receptors: brain distribution and long-term blockade of K⁺ channels in cultured neurons. In: book of abstracts of the 5-HT third luphar meeting on serotonin. Chicago Illinois 20.
87. Donetti A. et al (1994) Binding of 3H GR 113808 to 5-HT₄ in human frontal cortex. In: book abstracts of the 5-HT third luphar meeting on serotonin. Chicago Illinois 84.
88. Branchek, T. (1994) Molecular biology an molecular pharmacology of the 5-HT₄ receptors: relation to other adenylate cyclase stimulatory serotonin receptors, 5-HT₆ and 5-HT₇. In: book abstracts of the 5-HT third luphar meeting on serotonin. Chicago Illinois 20.
89. 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.
90. 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.
91. Nada, O. and Hirata, K. (1975) The occurrence of the cell type containing a specific monoamine in the taste bud of the rabbit's foliate papilla. *Histochemistry* 43, 237-240.
92. 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.
93. Barlow, L.A., Chien, C.B. and Northcutt, R.G. (1996) Embryonic taste buds develop in the absence of innervation. *Development.* 122, 1103–1111.
94. Nagai, T., Delay, R.J., Welton, J. and Roper, S.D. (1998) Uptake and release of neurotransmitter candidates, [³H]serotonin, [³H]glutamate, and [³H]gamma-aminobutyric acid, in taste buds of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. *J. Comput. Neurol.* 392, 199–208.
95. Ren, Y., Shimada, K., Shirai, Y., Fujimiya, M. and Saito, N. (1999) Immunocytochemical localization of serotonin and serotonin transporter (SET) in taste buds of rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 74, 221–224.
96. Huang, Y.J., Maruyama, Y., Lu, K.S., Pereira, E., Plonsky, I., Baur, J.E., Wu, D. and Roper, S.D. (2005a) Mouse taste buds use serotonin as a neurotransmitter. *J. Neurosci.* 25, 843–847.
97. Delay, R.J., Kinnamon, S.C. and Roper, S.D. (1994) Serotonin modulates voltage-dependent calcium current in *Necturus* taste cell. *J. Neurophysiol.* 77, 2515-2524.
98. Herness, S. and Chen, Y. (1997) Serotonin inhibits calcium-activated K⁺ current in rat taste receptor cells. *Neuroreport* 8, 3257–3561.
99. Kaya, N., Shen, T., Lu, S.G., Zhao, F.L. and Herness, S. (2004) A paracrine signaling role for serotonin in rat taste buds: expression and localization of serotonin receptor subtypes. *Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol.* 286, R649–R658.

100. Finger, T.E., Danilova, V., Barrows, J., Bartel, D.L., Vigers, A.J., Stone, L., Hellekant, G. and Kinnamon, S.C. (2005) ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science* 310, 1495–1499.
101. Beidler, L.M. and Smallman, R.L. (1965) Renewal of cells within taste buds. *J. Cell Biol.* 27, 263-272.
102. Farbman, A.I. and Mbiene, J.P. (1991) Early development and innervation of taste bud-bearing papillae on the rat tongue. *J. Comput. Neurol.* 304, 172–186.
103. Mbiene, J.P., Maccallum, D.K. and Mistretta, C.M. (1997a) Initial innervation of embryonic rat tongue and developing taste papillae: nerves follow distinctive and spatially restricted pathways. *Acta Anat. (Basel)*. 160, 139–158.
104. Mbiene, J.P. and Roberts, J.D. (2003) Distribution of keratin 8-containing cell clusters in mouse embryonic tongue: evidence for a pre-pattern for taste bud development. *J. Comput. Neurol.* 457, 111–122.
105. Barlow, L.A. (2003) Toward a unified model of vertebrate taste bud development. *J. Comput. Neurol.* 457, 107–110.
106. Hosley, M.A., Hughes, S.E., Morton, L.L. and Oakley, B. (1987) A sensitive period for the neural induction of taste buds. *J. Neurosci.* 7, 2075–2080.
107. Oakley, B., Lawton, A., Riddle, D.R. and Wu, L.H. (1993) Morphometric and immunocytochemical assessment of fungiform taste buds after interruption of the chorda-lingual nerve. *Microsc. Res. Technol.* 26, 187–195.
108. Whitehead, M.C., Frank, M.E., Hettinger, T.P., Hou, L.T. and Nah, H.D. (1987) Persistence of taste buds in denervated fungiform papillae. *Brain Res.* 405, 192-195
109. Suzuki, Y., Takeda, M. y Obara, N. and Nagai, Y. (1996) Phagocytic cell in the taste buds of rat circumvallate papillae alter denervation. *Chem. Senses* 21, 467-476.
110. Barry, M.A., Larson, D.C. and Frank, M.E. (1993b) Loss and recovery of sodium-salt taste following bilateral chorda tympani nerve crush. *Physiol. Behav.* 53, 75-80.
111. Cooper, D. and Oakley, B. (1998) Functional redundancy and gustatory development in *bdnf* null mutant mice. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 105, 79-84.
112. Nosrat, C.A., Ebendal, T. and Olson, L. (1996) Differential expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 mRNA in lingual papillae and taste buds indicates roles in gustatory and somatosensory innervation. *J. Comp. Neurol.* 376, 587-602.
113. Oakley, B., Brandemuhl, A., Cooper, D., Lau, D., Lawton, A. and Zhang, C. (1998) The morphogenesis of mouse vallate gustatory epithelium and taste buds requires BDNF-dependent taste neurons. *Brain Res. Dev. Brain* 105, 85–96.
114. Hall, J.M., Bell, M.L. and Finger, T.E. (2003) Disruption of sonic hedgehog signaling alters growth and patterning of lingual taste papillae. *Develop. Biol.* 255, 263–277.
115. Jung, H.S., Oropeza, V. and Thesleff, I. (1999) *Shh*, *Bmp-2*, *Bmp-4* and *Fgf-8* are associated with initiation and patterning of mouse tongue papillae. *Mech. Dev.* 81, 179–182.
116. Hall, J.M., Hooper, J.E. and Finger, T.E. (1999) Expression of sonic hedgehog, patched, and *Gli1* in developing taste papillae of the mouse. *J. Comput. Neurol.* 406, 143–155.
117. Mistretta, C.M., Liu, H.X., Gaffield, W. and MacCallum, D.K. (2003) Cyclopamine and jervine in embryonic rat tongue cultures demonstrate a role for *Shh* signaling in taste papilla development and patterning: fungiform papillae double in number and form in novel locations in dorsal lingual epithelium. *Develop. Biol.* 254, 1–18.

118. Zhou, Y., Liu, H.X. and Mistretta, C.M. (2006) Bone morphogenetic proteins and noggin: inhibiting and inducing fungiform taste papilla development. *Dev. Biol.* 297, 198-213.
119. Barlow, L.A. (1999) A taste for development. *Neuron* 22, 209-212.
120. Rochlin, M.W. and Farbman, A.I. (1998) Trigeminal ganglion axons are repelled by their presumptive targets. *J. Neurosci.* 18, 6840-6852.
121. Taniguchi, M., Yuasa, S., Fulisawa, H., Naruse, I., Saga, S., Mishina, M. and Yagi, T. (1997) Disruption of semaphoring III/D gene causes severe abnormality in peripheral nerve projection. *Neuron* 19, 519-530.
122. Ringstedt, T., Ibanez, C.F. and Nosrat, C.A. (1999) Role of brain-derived neurotrophic factor in target invasion in the gustatory system. *J. Neurosci.* 9, 3507-3518.
123. Bo, X., Alavi, A., Xiang, Z., Oglesby, I., Ford, A. and Burnstock, G. (1999) Localization of ATP-gated-P2X2 and P2X3 receptor immunoreactive nerves in rat taste buds. *Neuroreport* 10, 1107-1111.
124. Finger, T.E., Danilova, V., Barrows, J., Bartel, D.L., Vigers, A.J., Stone, L., Hellekant, G. and Kinnamon, S.C. (2005) ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science* 310, 1495-1499.
125. Nagai, T., Kim, D.J., Delay, R.J. and Roper, S.D. (1996) Neuromodulation of transduction and signals processing in the end organs of taste. *Chem. Senses* 21, 353-365.
126. Kawai, K., Sugimoto, K., Nakashima, K., Miura, H. and Ninomiya, Y. (2000) Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 11044-11049.
127. Shen, T., Kaya, N., Zhao, F.L., Lu, S.G., Cao, Y. and Herness, S. (2005) Co-expression patterns of neuropeptides vasoactive intestinal peptide and cholecystokinin with the transduction molecules gustducin and T1R2 in rat taste receptor cells. *Neurosci.* 130, 229-238.
128. Zhong, H.J., Zhang, M. and Nurse, C.A. (1999) Electrophysiological characterization of 5-HT receptor on rat petrosal neurons in dissociated cell culture. *Brain Res.* 816, 544-553.
129. Imendra, K.G., Fujiyama, R., Miyamoto, T., Okada, Y. and Sato, T. (2000) Serotonin inhibits voltage-gated sodium current by cyclic adenosine monophosphate-dependent mechanism in bullfrog taste receptor cells. *Neurosci. Lett.* 294, 151-154.
130. Imendra, K.G., Miyamoto, T., Okada, Y. and Toda, K. Serotonin differentially modulates the electrical properties of different subset of taste receptor cell in bullfrog. *Eur. J. Neurosci.* 16, 629-640.
131. Herness, S., Zhao, F.L., Kaya, N., Shen, T., Lu, S.G. and Cao, Y. (2005) Communication routes within the taste bud by neurotransmitter and neuropeptides. *Chem. Senses* 30, 37-38.
132. 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.
133. Azzali, G. (1997) Ultrastructure and immunocytochemistry of gustatory cells in man. *Ann. Anat.* 179, 37-44.
134. 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.
135. Vitalis, T., Fouquet, C., Alvarez, C., Seif, I., Price, D., Gaspar, P. and Cases, O. (2002) Developmental expression of monoamine oxidases A and B in the central and peripheral nervous systems of the mouse. *J. Comput. Neurol.* 442, 331-347.