

Inhibición de la inervación en corpúsculos gustativo en embrión de ratón

Ortiz-Alvarado Rafael^{1✉}, Jacome-Galarza Irvin² y Meza-Carmen Victor³

¹Facultad De Quimico Farmacobiología, Universidad Michoacana De San Nicolás De Hidalgo. Calle Tzintzuntzán No.173, Colonia Matamoros C.P. 58240, Morelia, Michoacán, México.

²Laboratorio Estatal De Salud Publica, Departamento De Biología Molecular, Secretaria De Salud Michoacán, Privada De Canada, C.P. 58243 Morelia, Michoacán, México.

³Instituto De Investigaciones Quimico Biologicas Universidad Michoacana De San Nicolás De Hidalgo. Ciudad Universitaria, C.P. 58240, Morelia, Michoacan, Mexico.

Resumen

La detección de las diferentes modalidades gustativas comienza en la lengua, en ella existen estructuras especializadas, los corpúsculos gustativos, estos se encuentran en las papilas gustativas y se dividen en papilas fungiformes, foliadas y caliciformes. El desarrollo del sistema gustativo en la rata y ratón inicia en etapas tempranas del desarrollo embrionario y termina cuando el animal nace. Se ha descrito la participación de diversos factores celulares durante las etapas del desarrollo del sistema gustativo, entre ellos la serotonina (5-HT). Se ha demostrado la participación de la 5-HT en múltiples procesos del desarrollo, a nivel de la corteza cerebral, en el tejido cardíaco, intestino y estructuras óseas como la mandíbula. Actualmente se desconoce el efecto de la serotonina sobre el desarrollo de los corpúsculos gustativos en rata, por lo que en el presente trabajo se decidió administrar un inhibidor específico de la síntesis de serotonina, la 4-cloro-fenilalanina (4-CFA) durante el desarrollo de las papilas fungiformes. Se realizó disección de la lengua a nivel de papilas fungiformes a los 19 días de gestación, realizando cortes histológicos y co-marcajes de corpúsculos gustativos y su innervación. Posteriormente se realizó el análisis de la morfología. Los resultados obtenidos mostraron alteraciones en la morfología de la papila fungiforme y reducción en el número de corpúsculos gustativos en los animales tratados con 4-CFA. Los datos mostrados apoyan la hipótesis de que la serotonina participa probablemente como factor trófico durante el desarrollo de la papila fungiforme de la rata.

Palabras clave: corpúsculo gustativo, factor trófico, células gustativas.

Abstract

The detection of different taste modalities begins on the tongue, specialized structures exist in it, the taste buds, and these are located in the taste buds and are divided into fungiform papillae, caliciforme papillae and foliate papillae. The development of the gustatory system in the rat and mouse begins early in embryonic development and ends when the animal is born. Described of participation of various cellular factors during the development stages of the gustatory system, including serotonin (5-HT). Have shown the involvement of 5-HT in many developmental processes, the level of the cerebral cortex, in cardiac tissue, such as bowel and jaw bone structure. Currently unknown effect of serotonin on the development of rat taste buds, so in the present work it was decided to administer a specific inhibitor of serotonin synthesis, 4-chloro-phenylalanine (4-CPA) during the development of fungiform papillae. Dissection was performed tongue fungiform papillae level at 19 days of gestation, performing immunochemistry of taste buds and their innervations. Subsequently performed morphology analysis. The results showed alterations in morphology of fungiform papillae and reduction in the number of taste buds in animals treated with 4-CPA. Displayed data support the hypothesis that serotonin is involved probably as trophic factor for the development of rat fungiform papillae.

Key Words: taste buds, trophic factor, taste cell.

Introducción

El sentido del gustativo es parte de los sistemas sensoriales químicos de los mamíferos. El proceso de la percepción gustativa comienza cuando las moléculas sápidas contenidas en los alimentos se liberan en la saliva y son registradas dentro de la cavidad oral. Donde las células especializadas localizadas principalmente en la superficie de la lengua, en la parte anterior, permiten la detección de los compuestos sápidos, a través de la expresión de receptores específicos para la detección de las cinco modalidades gustativas identificadas y aceptadas actualmente por ejemplo para el sabor dulce y umami se han asociado a los receptores Tas1R (Damak *et al.*, 2003, Kitsukawa *et al.*, 2001), en los sabores amargos,

receptores Tas2R (Miyoshi *et al.*, 2001, Mueller *et al.*, 2005), en los sabores salados, funcionan los canales iónicos así como en los sabores agrios (Chaudhari *et al.*, 1996, Richter, *et al.*, 2004) de esta manera se permite la liberación posiblemente de algunos neurotransmisores (Herness, *et al.*, 2005) los cuales portan el impulso nervioso a través de los nervios como el glossofaríngeo (Munger, 1993) hasta el sistema nervioso central, donde las señales gustativas son decodificadas y los sabores específicos son clasificados (Schiffman, 2000). La etapa fundamental en el reconocimiento de las modalidades gustativas son los receptores gustativos expresados por las células gustativas, las cuales se organizan celularmente en estructuras denominadas corpúsculos gustativos. Estos se encuentran localizados mayoritariamente de acuerdo a su morfología y distribución anatómica en papilas caliciformes, foliadas y caliciformes (Roper, 2006). Este sistema sensorial, en el caso de ratones y ratas comienza en la etapa embrionaria a partir del día E11, en donde se induce la placa

✉ **Autor de correspondencia:** Rafael Ortiz Alvarado. Facultad de Quimico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. calle Tzintzuntzan. No.173 colonia Matamoros C.P: 58240, Morelia, Michoacan, México. Email: rortizalvarado@gmail.com

epibranquial que formara la estructura celular lingual, comprendiendo la innervación de las papilas gustativas fungiformes, permitiendo la diferenciación de los corpúsculos gustativos fungiformes en el epitelio lingual los cuales presentan las vesículas pre-sinápticas en los corpúsculos gustativos en el día 19.0 \pm 1.0 des gestación (Mistretta *et al.*, 1999, Mbiene et Roberts, 2003, Zhang *et al.*, 2001). Las células gustativas son funcionales en el día post-natal 7, comenzando con la expresión de receptores gustativos correspondientes. Actualmente se han demostrado parte de los procesos que participan en el desarrollo de las estructuras celulares del sistema gustativo en los mamíferos, quedando aun por descubrir la participación de diversos factores moleculares y celulares implicados durante el desarrollo de estructuras del sistema gustativo. Se ha documentado, por ejemplo la participación de factores de regulación transcripcional de la familia *six1* y *eyes absent* (*eya1*), los que son fundamentales en la regulación de la división celular durante la formación de la placa epi-branquial (Zou, *et al.*, 2004), de igual forma se ha mostrado la presencia de moléculas como las neurotrofinas de tipo NT-3 (Krimm, 2007), se ha demostrado también la presencia de la serotonina (5-HT) en el sistema gustativo (Ortiz-Alvarado, *et al.*, 2006). La 5-HT en organismos adultos de las especies de murinos, participa en los procesos de memorización y aprendizaje en corteza cerebral, regula la conducta sexual a nivel hipotalámica (Varnäs, 2005), además participa en la regulación del tono serotoninérgico en células de Kulchitsky a nivel intestinal (Drozdov, *et al.*, 2009) y además de manera transitoria en la diferenciación de células mamarias de rata (Laporta, *et al.*, 2013). Las múltiples funciones tróficas de la 5-HT son mediadas por medio de la activación de receptores específicos, los que son denominados receptores serotoninérgicos, los que se agrupan en 7 familias y 15 subtipos (Varnäs, 2005). La 5-HT es sintetizada a partir del aminoácido L-triptófano, en donde la reacción limitante es mediada por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH), de la cual se tiene descritas 2 isoformas, una periférica TPH1 y una central TPH2 (Ortiz-Alvarado *et al.*, 2006, Walther, *et al.*, 2009). En el sistema gustativo se sabe que en ratones se ha identificado al expresión transitoria de la TPH1 y TPH2 en células gustativas (Ortiz-Alvarado *et al.*, 2006), en humanos la 5-HT participa en la transducción de las modalidades gustativas de tipo amargo y dulce (Herness *et al.*, 2005) por ejemplo en pacientes con problemas en la regulación del tono serotoninérgico, como la depresión, se han mostrado trastornos en la percepción. En especies como ajolote, conejo, rata, ratón, se ha mostrado que las células gustativas poseen la capacidad de almacenar y liberar serotonina (Barlow, 2003, Fujimoto, *et al.*, 1987, Kim y Roper, 1995) en células de corpúsculos gustativos de ratas adultas se ha demostrado a expresión de los receptores de tipo 5-HT1A y 5-HT3 (Herness *et al.*, 2004, Herness *et al.*, 2005). Con estos antecedentes se sugiere la probable implicación de la 5-HT en procesos de detección de moléculas sápidas en animales adultos a través de una vía paracrina y la posible expresión de un sistema serotoninérgico en el sistema gustativo que participa en la diferenciación celular de las papilas gustativas (Herness *et al.*, 2005, Ortiz-Alvarado, *et al.*, 2006). Adicionalmente se demostró la expresión del transportador de la 5-HT en células gustativas de rata adulta (Ren *et al.*, 1999), con estos antecedentes se infiere la probable participación del neuro-

transmisor 5-HT en procesos de comunicación intercelular en los diferentes tipos celulares del corpúsculo gustativo a través de vías de tipo paracrino (Sugita, *et al.*, 2006), así como la expresión estructuración de un sistema serotoninérgico especializado a nivel gustativo. Adicionalmente a las funciones descritas de la 5-HT en mamíferos adultos, se ha demostrado la función de la 5-HT como factor trófico, durante el desarrollo de diferentes especies, en fetos de rata de 12 \pm 1 días de gestación, en corteza cerebral aparecen células con fenotipo serotoninérgico (Fujimiya, *et al.*, 1986), también se comprobó que al administrar el aminoácido L-triptófano a ratas gestantes al día 15 \pm 1 se produce un aumento de la actividad enzimática de la TPH central (TPH2) en los fetos de las ratas (Chagoya, *et al.*, 1983), existen datos que muestran que la 5-HT es necesaria para el desarrollo de la corteza cerebral de tipo motor en la rata (Vitalis, *et al.*, 2007), de la misma forma que participa en los procesos de desarrollo del tallo cerebral mediante la activación de receptores específicos 5-HT1B, 5-HT2A y 5-HT2C (Volgin, *et al.*, 2003). La acción de la 5-HT como posible factor trófico no es solamente en el desarrollo del Sistema Nervioso Central, también se ha mostrado la dependencia del tejido cardíaco para su desarrollo, mediado por la activación del receptor 5-HT2B (Fiorica-Howells, *et al.*, 2000), la 5-HT al activar los receptores serotoninérgicos 5-HT1 y 5-HT2 permite la diferenciación de las células enterocromafines en embriones de rata y ratón. Respecto al sistema gustativo se sabe que las células gustativas de fetos de ratón de 15 a 19 días de gestación expresan las isoformas TPH1 y TPH2 (Ortiz-Alvarado *et al.*, 2006). Hasta la fecha no existen datos consistentes sobre la participación de la 5-HT durante el desarrollo de las estructuras especializadas del sistema gustativo y de la acción en el espacio de tiempo en que actúa esta en las estructuras de sistema gustativo, por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar los cambios en la morfología del corpúsculo gustativo de tipo fungiforme así como la innervación correspondiente en embriones de rata tratadas con un inhibidor farmacológico específico en la síntesis de 5-HT, administrado durante la gestación.

Materiales y Métodos

Se utilizaron 10 ratones hembras de la cepa CB57LBJ, nulíparas adultas de, las cuales fueron mantenidas en condiciones estándar de bioterio de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo con alimento estándar para roedores (purina) y agua filtrada, ad libitum. Siguiendo los protocolos de manejo de animales de experimentación (86-609-ECC).

Los ratones fueron apareadas y al segundo día se observó el tapón vaginal considerando el día intrauterino IU 0 con una variación de \pm 0.5 días (IU 0). Se formaron dos grupos de animales, cinco animales en el grupo tratado con el fármaco 4-cloro-fenilalanina-metil-éster de sigma y cinco animales en el grupo control de animales de experimentación, la administración de 4-CFA se realizó el día IU 9 \pm 0.5, vía intraperitoneal (IP) disuelto en solución salina (PISA) libre de pirógenos a la concentración de 300 mg/Kg de peso (Tagliaferro *et al.*, 1997) y el grupo control se le administró solución salina libre de pirógenos (PISA).

Obtención del Tejido lingual embrionario.

Las animales gestantes, de los dos grupos de experimentación se sacrificaron, en cámara de CO₂, el día IU19 ±0.5, procediendo a retirar los embriones del saco vitelino y separando los embriones provenientes de los grupos control y tratados de manera separada en agua libre de nucleasas y pirógenos (Ambiocon). Seccionando el tejido lingual en su totalidad y preservando el tejido en una solución de para-formaldehído (sigma-aldrich) del 2 al 4% en solución de buffer de fosfatos (Fluka), por un espacio de 1.5 horas almacenados a una temperatura de 2 a 4°C, posteriormente se realizó la crio-protección en solución de sacarosa Baker hasta el equilibrio correspondiente de los tejidos a una temperatura de 2 a 4°C. Posteriormente se realizó la disección de la parte anterior de la lengua que contiene las papilas fungiformes y se orientó en moldes con Poliacrílico de Sodio (PAS) (Aspen Labs) a una temperatura de -20°C, y la preservación se realizó en ultra-congelador a una temperatura de -70°C.

Cortes histológicos e inmunohistoquímica. Se procedió a realizar cortes histológicos en el criostato de la Posta veterinaria de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, con un espesor de 30 µm, y una temperatura en cámara interna de -20°C. Los cortes histológicos fueron colectados en portaobjetos tratados con poli-lisina, carga positiva, (Superfrost), posteriormente los cortes se preservaron a una temperatura de -70°C hasta su tratamiento para inmunohistoquímica.

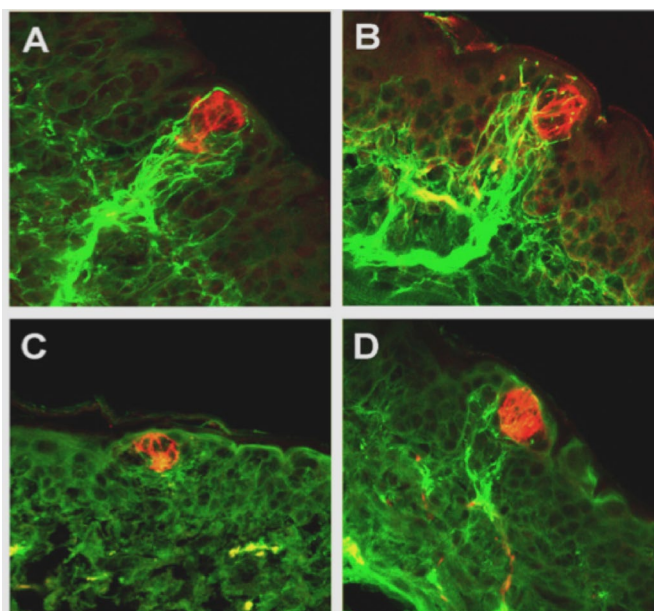
Los cortes histológicos fueron sacados a temperatura ambiente y se incubaron por espacio de 1 hora, posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con solución de buffer de fosfatos de (Fluka) Se incubaron con solución de buffer de fosfatos y albúmina sérica bovina al 1% y Tritón X-100 al 0.03%, por un espacio de 1 hora, al finalizar se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno, con solución de buffer de fosfatos y se incubaron toda la noche a una temperatura de 4°C, con la solución de buffers de fosfatos y Tritón X-100 al 0.03% y la mezcla de anticuerpos anti-H3 (Santa-Cruz), dilución 1:200 y anti-citoqueratina-8 1:100, utilizados para marcar terminación nerviosa y citoqueratina-8 de los corpúsculos gustativos embrionarios respectivamente. La fase de revelado se realizó al día siguiente, sacando las muestras a temperatura ambiente e incubándolas por 1 hora, se hicieron 3 lavados de 5 minutos cada uno con solución de buffer de fosfatos y se incubaron los anticuerpos secundarios anti-conejo acoplado al fluorocromo Alexa 488 y el anti-rata acoplado al fluorocromo Alexa 568 dirigidos contra anti-H3 y anti-citoqueratina-8 respectivamente, por 2 horas a temperatura ambiente, al finalizar se realizaron 3 lavados de 5 minutos con buffers de fosfatos y se dejaron secar las muestras por 10 minutos a temperatura, todo el proceso de incubación se realizó sin luz directa. Para el montaje de las muestras de uso Whole Mountaine de Alexa usando cubre objetos de 10X40 mm. Y dejando a temperatura de 4°C por toda la noche para su posterior documentación en microscopia confocal, utilizando los canales de excitación de 488 y 568 nm respectivamente para almacenar las imágenes en el formato JPG y tratamiento digital con Photoshop versión 9.0.

Resultados

Se realizaron dobles inmunomarcajes de los corpúsculos gustativos y fibras gustativas, para evaluar el efecto, de la reducción en el número de corpúsculos gustativos y la densidad de las fibras

gustativas fungiformes, por la inhibición en la síntesis de serotonina a través de la administración de 4-CFA, en las lenguas provenientes de los embriones tratados y control. Se obtuvieron dobles inmunomarcajes sobre cortes para-sagitales de la parte anterior de la lengua de los embriones provenientes de madres tratadas con 4-CFA y de los embriones de madres control, los dobles marcajes han sido realizados sobre cortes de 30 µm de espesor; el anticuerpo Troma-1 reconoce específicamente la proteína citoqueratina de tipo 8 (Kemler R. *et al.*, 1981), expresado en los precursores de los corpúsculos gustativos embrionarios (Mbiene JP. *Et al.*, 2003). El anticuerpo 2H3 marca el neurofilamento de 165 kilodalton (Dodd J, *et al.*, 1988), (Guthrie S. *et al.*, 1995), de las fibras gustativas.

Los inmunomarcajes arrojan una señal por inmunofluorescencia, roja producida por el anticuerpo Troma-1 que identifica los corpúsculos gustativos, en la **Figura 1**, se observa también la señal en verde proveniente del anticuerpo 2H3 que marca las fibras gustativas; lo que permite de esta manera poder contabilizar los corpúsculos gustativos fungiformes de los embriones tratados con la 4-CFA y control respectivamente y evaluar la morfología normal de los corpúsculos gustativos y el número correspondiente.



La **Figura 1A**, los corpúsculos gustativos inervados fungiformes presentan la morfología característica, las células gustativas de alargan y se orientan perpendicularmente hacia la membrana basal y la innervación presenta las fibras invaden el mesenquima lingual y forman la sinaptogénesis con las células del precursor del corpúsculo gustativo, el conjunto morfológico ha sido observado y contabilizado como un corpúsculo gustativo normal en los animales control y animales tratados con la 4-CFA.

En la **Figura 1B** se observa un corpúsculo gustativo, la estructura y la intensidad del inmunomarcaje proveniente del anticuerpo Troma-1 parece normal, más sin embargo el corpúsculo presenta una débil densidad de la innervación, en donde este tipo de morfología observada fue considerada como un corpúsculo

gustativo no innervado observado frecuentemente en los animales tratados con el fármaco 4-CFA.

La **Figura 1C** muestra un corpúsculo gustativo típico sin innervación, en donde la inmuno-reactividad fue positiva para el anticuerpo Troma-1 pero negativa para el anticuerpo 2H3; este tipo de imágenes ha sido considerada como corpúsculos gustativos no innervados y fueron observados en las muestras provenientes de los animales tratados con 4-CFA.

La **Figura 1D**, también observados, muestra fibras nerviosas sin corpúsculos gustativos (en todo caso no hubo inmuno-reactividad positiva al anticuerpo Troma-1), este tipo de estructuras morfológicas no fueron contabilizadas en el estudio.

Así con los inmunomarcajes por los anticuerpos Troma-1 y 2H3, fueron determinados los parámetros morfológicos de los corpúsculos gustativos de tipo fungiforme normales y su tipo de perfil de innervación característico de los animales control, esto con la finalidad de poder realizar, en el estudio las comparaciones entre los dos grupos de animales, provenientes de los animales control y tratados farmacológicamente con la 4-CFA respectivamente.

Discusión

El presente trabajo se mostraron evidencias que permiten establecer el efecto de la serotonina sobre el desarrollo de los corpúsculos gustativos fungiformes, la morfología de los corpúsculos gustativos fungiformes y su innervación durante el desarrollo del tejido lingual, son la primera evidencia directa, documentada que permiten establecer el papel de la serotonina como factor trófico (Guthrie et Pini, 1995) sobre estructuras linguales individuales como son los corpúsculos gustativos fungiformes de roedores. Estos resultados muestran que la innervación en el caso de los animales provenientes de animales gestantes tratados con 4-CFA se ve disminuida y por lo tanto el número de corpúsculos gustativos fungiformes disminuyen significativamente respecto a los animales control. En el caso del número de corpúsculos gustativos, los resultados presentados muestran una disminución significativa de las papilas fungiformes en todos los embriones analizados, lo cual concuerda con los datos mostrados por otros investigadores que han utilizado el modelo de sección quirúrgica del nervio orofaríngeo en animales adultos. De esta manera, al ser administrado un inhibidor en la síntesis de serotonina durante los primeros días del desarrollo del sistema serotoninérgico, de esta manera la 4-CFA ha mostrado ser una herramienta farmacológica con aplicación celular que permite inhibir la síntesis de serotonina, puesto que atraviesa la placenta al igual que atraviesa la barrera (Moore, *et al.*, 1974), produciendo inhibición de la actividad de la TPH1 y TPH2. En el presente trabajo se empleó un esquema de administración similar al utilizado por (Vitalis, *et al.*, 2007), el cual demostró que la administración de 300 mg/kg de peso de 4-CFA reduce el 50% de la concentración de 5-HT en las primeras 6 horas y a las 72 horas la reducción es del 90%. Otra ventaja que ofrece el empleo de la 4-CFA es que los animales tienen un periodo de vida mayor en comparación a los animales K.O. y la inhibición de la TPH es reversible, puesto que a las 72 horas de la última administración de 4-CFA la concentración de serotonina es normal, este fenómeno no se presenta cuando se administra la 5,7-dihidroxitriptamina el cual es un neurotóxico

que produce.

Agradecimientos

El presente trabajo fue apoyado por el PROMEP, folio EXB-UMICH-139, y deseamos agradecer al Dr. José de Jesús Ramírez Córdova del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, por la su asistencia para el acceso al Microscopio Confocal y el análisis de imágenes correspondiente.

Referencias

- Barlow LA.** 2003. Toward a unified model of vertebrate taste bud development. *The Journal of comparative neurology*. 457(2):107-110.
- 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.* Jun 15;16(12): 3817-26.
- Chagoya, G., and Hernández, R. J.** 1983. L-tryptophan during gestation induces an increase in brain tryptophan 5-hydroxylase activity and serotonin synthesis. *Proc. West. Pharmacol.* 26:369-372.
- Damak S, Rong M, Yasumatsu K, Kokrashvili Z, Varadarajan V, Zou S, Jiang P, Ninomiya Y, Margolskee RF.** 2003. Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science.* 301(5634):850-853.
- Dodd J, Akabas MH, Al-Awqati Q. Science.** 1988. A bitter substance induces a rise in intracellular calcium in a subpopulation of rat taste cells. *Nov 18;242(4881):1047-50.*
- Drozdov I, Modlin IM, Kidd M, Goloubinov VV.** 2009. From Leningrad to London: the saga of Kulchitsky and the legacy of the enterochromaffin cell. *Neuroendocrinology.* 89(1):1-12.
- Fiorica-Howells, E., Maroteaux, L., and Gershon, M.** 2000. Serotonin and The receptor 5-HT_{2B} in the development of Neuron Enteric. *J. Neuroscience,* 20:294-305.
- Fujimiya, M., Hosada, S., Kitahama, K., Kimura, H., and Meada, T.** 1986. Early development of serotonin in the rat brain as studied by immunohistochemistry combined with tryptophan administration. *Brain Dep.* 8: 335-341.
- Fujimoto, S., Ueda, H., and Kagawa, H.** 1987. Immunocytochemistry on the localization of 5-HT in monkey and rabbit taste buds. *Acta Anat.* 128, 80-83.
- Guthrie S, Pini A.** 1995. Chemorepulsion of developing motor axons by the floor plate. *Neuron.* 1995 Jun;14(6):1117-30.
- Herness, S., Zhao F-L., Shen T., and Kaya N.** 2004. A paracrine role for serotonin in rat taste buds: expression and localization of serotonin receptor subtypes. *Am. J. Physiol.* 286: 649-658.
- Herness S., Zhao F-L., Kaya N., Shen T., Lu S-G. et Cao Y.** 2005. Communication routes within the taste bud by neurotransmitters and neuropeptides. *Chemical senses,* 30(suppl. 1) 37-38.
- Kim DJ., Roper SD.** 1995. Localization of serotonin in taste buds: a comparative study in four vertebrates. *J Comp Neurol.* 353(3):364-70.
- Kitsukawa M., Kusakabe Y., Miura H., Ninomiya Y., Hino A.** 2001. Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste. *Biochemical and Biophysical Research Communication.* 283, 236-24.

- Krimm, R.** 2007. Factors that regulated embryonic gustatory development. *Neuroscience*, 8:180-198.
- Laporta J, Peters TL, Weaver SR, Merriman KE, Hernandez LL.** 2013. Feeding 5-hydroxy-l-tryptophan during the transition from pregnancy to lactation increases calcium mobilization from bone in rats. *Domest Anim Endocrinol.* 44(4):176-84.
- Mbiene JB, Roberts JD.** 2003. Distribution of keratin 8-containing cell clusters in mouse embryonic tongue: evidence for a prepattern for taste bud development. *J Comp Neurol. Mar 3;457(2):111-22.*
- Mistretta CM, Goosens KA, Farinas I, Reichardt LF.** 1999. Alterations in size, number, and morphology of gustatory papillae and taste buds in BDNF null mutant mice demonstrate neural dependence of developing taste organs.
- Miyoshi M.A, Abe K., Emori Y.** 2001. IP(3) receptor type 3 and PLCbeta2 are co-expressed with taste receptors T1R and T2R in rat taste bud cells. *Chemical senses.* 26(3):259-65.
- Moore, W. T. and Hampton, J.K.** 1974. Effects of Para-Chlorophenylalanine on pregnancy in the rat. *Biology of reproduction*, 11: 289-287.
- Mueller K.L., Hoon M.A., Erlenbach I., Chandrashekar J., Zuker Ch. S., Ryba J. P.** 2005. Thereceptors and coding logic for bitter taste. *Nature*, 434, 225-229.
- Munger B.L.** 1993. The general somatic terminals in oral mucosae. *In : Mechanisms of taste transduction, edited by S.A. Simon and Roper, Boca Raton, FL: CRC Press, p 83-104.*
- Ortiz-Alvarado R, Guzmán-Quevedo O, Mercado-Camargo R, Haertle T, Vignes C, Bolaños-Jiménez F.** 2006. Expression of tryptophan hydroxylase in developing mouse taste papillae. *FEBS Lett. Oct 2;580(22):5371-6. Epub 2006 Sep 12.*
- Ren, Y., Shimada, K., Shirai, Y., Fujimiya, M., and Saito, N.** 1999. Immunocytochemical localization of serotonin and serotonin transporter (SERT) in taste buds of rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 74: 221–224.
- Richter TA, Dvoryanchikov GA, Chaudhari N, Roper SD.** 2004. Acid-sensitive two-pore domain potassium (K2P) channels in mouse taste buds. *Journal of neurophysiology.* 92(3):1928-1936.
- Roper, S. D.** 2006. Cell communication in taste buds. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 1494-1500.
- Schiffman SS.** 2000. Taste quality and neural coding: implications from psychophysics and neurophysiology. *Physiology & behavior.* 69(1-2):147-59.
- Sugita, M.** 2006. Taste perception and coding in the periphery. *Cell. Mol. Life. Sci.* 63: 2000-2015.
- Tagliaferro P, Ramos A.J., López E.M., Pecci-Saavedra J., Brusco A.** 1997. Neural and astroglial effects of a chronic parachlorophenylalanine-induced serotonin synthesis inhibition. *Mol Chem Neuro-pathol* 32(1-3):195-211.
- Varnäs, K.,** 2005. Distribution of Serotonin Receptors and Transporters in the Human Brain. *ISBN. 91:7149-7154.*
- Vitalis, T., Cases, O., Passemard, S., Callebert, and Parnavelas, J.** 2007. Embryonic depletion of serotonin affects cortical development. *Eur. J. Neuroscience*, 26: 331-344.
- Volgin, D., Fay, R. and Kubin, L.** 2003. Postnatal development of serotonin 1B, 2A and 2C receptors in brainstem motoneurons. *Eur. J. Neuroscience*, 17: 1179-1188.
- Walther, J., Peter, J., Bashammakh, S., Hörtnagl, H., Voits, M., Fink, H. and Bader, M.** 2009. Synthesis of Serotonin by a Second Tryptophan Hydroxylase Isoform. *Science*, 299: 76.
- 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.
- Zhang, H., A. Gilbertson, J. Bougther and Smith, D.** 2001. Distribution of Gustatory Sensitivities in Rat Taste Cells: Whole-Cell. *J. Neuroscience* 21:4931-4941.
- Zou D, Silvius D, Fritzsche B, Xu PX.** 2004. Eya1 and Six1 are essential for early steps of sensory neurogenesis in mammalian cranial placodes. *Development*, 31:5561-5572.