

Co-localización del receptor GPR43 y gustducina en células gustativas de rata adulta

Ortiz-Alvarado Rafael¹✉, Nava-Barrios Lucia Matilde¹, Rodríguez-Barron Álvaro² y Meza-Carmen Victor¹

¹Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Calle Tzintzuntzán No.173, colonia Matamoros C.P. 58240, Morelia, Michoacán, México.

²Unidad de Investigación "Dr. Mario Albizouri", Hospital general "Dr. Miguel Silva", Isidro Huarte y Samuel Ramos s/n. C.P. 58000, Morelia Michoacan

Resumen

El sentido gustativo permite la detección de las moléculas con capacidad sávida, generalmente contenidas en los alimentos, actualmente se aceptan cinco modalidades gustativas las que permiten la detección de los sabores ácido, amargo, dulce, salado y umami. Aunque existen evidencias moleculares y celulares que sugieren una posible sexta modalidad gustativa que permita la detección de lípidos contenidos en la dieta de los mamíferos, no se ha podido mostrar evidencia celular que demuestre el tipo de célula gustativa que exprese el o los receptores especializados en unirse a sus ligandos, como a los Ácidos Grasos de Cadena Corta (AGCC). En el presente trabajo se muestran hallazgos celulares, por inmunohistoquímica, que el receptor de tipo GPR-43 se expresa en células gustativas de tipo II, de rata adulta, que co-expresan adicionalmente a la proteína G, encargada de la transducción de la señal gustativa a nivel periférico, lo que permite apoyar que el receptor GPR-43 pueda participar en la detección molecular de AGCC y estar posiblemente implicado en una sexta modalidad gustativa en mamíferos.

Palabras clave: Células Gustativas, Receptores Gustativos, GPR-43, AGCC.

Abstract

The sense of taste permits the detection of molecules which carry taste, generally contained in food. At present, five taste modalities are generally recognized, namely bitter, salty, sour, sweet and umami. Despite molecular and cellular evidence suggesting a possible sixth taste modality that allows the detection of lipids in the diet of mammals, so far there has been no molecular evidence of a taste-cell type that expresses the receptor or receptors specialized in binding these ligands, such as the short-chain fatty acids (SCFA). The present study shows immunohistochemical findings at the cellular level, to the effect that the receptor type GPR43 is expressed in type II taste cells of adult rats, which additionally co-express the G protein responsible for transduction of the taste signal at the peripheral level, suggesting that the GPR43 receptor may be involved in the molecular detection of SCFA and possibly in a sixth taste modality in mammals.

Key words: Taste Cells, Taste Receptor, GPR43, SCFA.

Introducción

El sistema gustativo permite la detección de moléculas sápidas contenidas en los alimentos las que se disuelven en la saliva y permiten ser detectadas a través de receptores gustativos expresados en los diferentes tipos celulares de los corpúsculos gustativos (Chaudhari y Roper, 2010). Las modalidades gustativas aceptadas son el sabor ácido, amargo, dulce, salado y umami (Damak *et al.* 2003, Kitsukawa, *et al.* 2001, Li *et al.*, 2002, Montmayeur *et al.*, 2001, Miyoshi *et al.*, 2001, Mueller *et al.*, 2005). Actualmente se tienen evidencias que permiten apoyar que los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) contenidos en la dieta de ciertos mamíferos pueden ser detectados por los receptores CD36 y GPR-40 expresados en células gustativas de rata (Cartoni, *et al.*, 2010, Gaillard, *et al.*, 2008, Laugerette *et al.*, 2005). Sin embargo, la dieta de algunos mamíferos entre ellos rata, ratón y homínidos contiene ácidos grasos de cadena corta

(AGCC), como por ejemplo ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, los cuales imparten características nociceptivas o sápidas a los alimentos (De la Fuente, *et al.*, 2009). En un trabajo anterior (García, *et al.*, 2009) se ha evidenciado la expresión del gen GPR-43 de rata en corpúsculos gustativos, así como la expresión de este receptor en células gustativas en corpúsculos gustativos en papila calciforme. Con el objetivo de aportar evidencias que permitan apoyar la expresión y funcionalidad del receptor GPR-43 en células gustativas en papila calciforme de rata, el presente trabajo muestra evidencias celulares que apoyan la co-expresión del receptor GPR-43 en células gustativas de tipo II, que expresan a la gustducina, la cual es una proteína G (Kinnamon, 2009) expresada por las células gustativas de tipo receptor y participa en la transducción de la señal gustativa al sistema nervioso periférico y central.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron 9 ratas macho adultas de la cepa Wistar, de 200 g \pm 20g de peso; las cuales se mantuvieron en condiciones

✉ **Autor de correspondencia:** Rafael Ortiz Alvarado. Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Calle Tzintzuntzán No.173 Colonia Matamoros C.P. 58240, Morelia, Michoacan, Mexico. email: rortizalvarado@gmail.com

ambientales controladas de ciclos de luz-oscuridad de 12 h, temperatura ambiental de 20-24°C y humedad relativa del 75-80%, agua y alimentación *ad-libitum*.

Obtención de tejidos

Se sacrificaron a los animales entre las 9:00 y 10:00 horas A. M., se extrajo la lengua de cada animal y sobre una superficie fría se disecó la papila caliciforme, localizada en la parte posterior de la lengua, posteriormente las papilas caliciformes provenientes de las ratas fueron colectadas y puestas en solución para su fijación en para-formaldehído (Sigma™) al 4% en PBS (Sigma) y conservadas a 4°C, durante una noche, después, los tejidos fueron colocados secuencialmente en una solución de sacarosa (Sigma™) al 10%, 20% y 30% de concentración en PBS. Las papilas después de su crioprotección se orientaron en moldes de plástico y fueron embebidas en *TissueTek*, provisto por ASPENLAB® de México, y enseguida congeladas a -80°C y preservadas a -20 °C; se realizaron cortes en un criostato Leica, a -20°C y un espesor de 16 µm, posteriormente colectados sobre laminillas Super Frost tratadas con Polilisina (Sigma™). Los cortes histológicos de las papilas caliciformes fueron conservados a -80 °C hasta su procesamiento y análisis.

Inmunohistoquímica:

Los cortes histológicos de la papila caliciforme fueron sacados a la temperatura ambiente (20 a 25°C) durante un período de 60 minutos, posteriormente tratados con PBS (Sigma), e incubados durante 60 minutos a temperatura ambiente con la solución de bloqueo: 0.2% de Triton X-100 (Sigma™) y 10% de suero normal de asno (Sigma™) y 1% de albúmina sérica bovina (ASB™) (Sigma™) en PBS. Enseguida, se procedió con la incubación con los anticuerpos primarios anti-GPR43 policlonales (anticorps-enligne.fr™) diluidos (1:200) y anti-gustducina, monoclonal (Santa-Cruz) diluido (1:250) en la solución de incubación 0.2% de Tritón X-100 (Sigma) y 2% de suero normal de asno (Sigma) y 1% de ASB en PBS, la incubación se realizó por 36 horas en cámara húmeda a 4°C. En la fase de revelación las laminillas con los cortes y el anticuerpo primario fueron incubados durante 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente los cortes fueron lavados tres veces durante 5 minutos con PBS a temperatura ambiente. Los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a fluorocromo Alexa Fluor-488 y anti-ratón acoplado al fluorocromo Alexa Fluor-568 (Molecular Probes) diluidos 1:250 en PBS, se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h. Enseguida se lavaron los cortes con PBS tres veces durante 5 minutos en cada ocasión, montadas con solución Pro-Long Antifade (Molecular Probes), y observadas y documentadas por microscopía confocal, Microscopio LEICA, modelo TCS NT.

Análisis de imágenes

Las imágenes obtenidas fueron documentadas con cortes virtuales de 1.2 micrómetros, con filtros de excitación a 488 y 568 nm, el análisis de las imágenes documentadas se realizó con el sistema Adobe® Photoshop 9.0.

Resultados

Figura 1. a) muestra de células gustativas con una inmunoreacción positiva del anticuerpo policlonal anti-GPR43, en cortes transversales de papila caliciforme provenientes de 6 animales diferentes; se muestra la especificidad de la señal de fluorescencia y describe la estructura clásica bipolar de las células gustativas en los corpúsculos gustativos de la papila caliciforme, el corte virtual corresponde a 1.2 micrómetros y una longitud de onda de 488 nm. La micrografía ha sido obtenida a través del microscopio confocal con el objetivo 63X. **b)** Inmunoreacción negativa, correspondiente al control negativo en cortes transversales de papila.

Figura 2. a) muestra de células gustativas con una inmunoreacción positiva del anticuerpo monoclonal anti-gustducina, en los cortes transversales de papila caliciforme provenientes de los 6 animales diferentes; se muestra la especificidad de la señal de fluorescencia y describe la estructura bipolar de las células gustativas en los corpúsculos gustativos en la papila caliciforme, el corte virtual corresponde a 1.2 micrómetros y una longitud de 568 nm. La micrografía ha sido obtenida a través de microscopía confocal con el objetivo 63X. **b)** Inmunoreacción negativa, correspondiente al control negativo en cortes transversales de papila.

Figura 3. a) Muestra la sobreposición de las imágenes provenientes de los canales de captura a 514 nm y 633 nm correspondientes a las imágenes de las células gustativas con una inmunoreacción positiva del anticuerpo anti-GPR43 y el anticuerpo anti-gustducina, respectivamente en los cortes transversales de papila caliciforme provenientes de los animales utilizados en el análisis. **b)** Inmunoreacción negativa, correspondiente al control negativo en cortes transversales de papila.

Discusión

El presente trabajo muestra la co-expresión del receptor GPR-43 y de la proteína gustducina en células gustativas de tipo II, en papilas caliciformes de rata, por medio del marcaje por inmunohistoquímica específico, para las moléculas expresadas en las células gustativas de ratas adultas. Este receptor (GPR-43) se ha reportado se encuentra expresado tanto en células enteroendocrinas del intestino, así como en adipocitos de rata (Hou, *et al.*, 2008, Karaki *et al.* 2006), este receptor se une con sus ligandos específicos: butirato, propionato y acetato, los cuales se encuentran en ciertos alimentos en la dieta de mamíferos, pero también son producidos por la microflora que se encuentra en la mucosa del intestino grueso; estos AGCC son producidos como producto de la degradación de la fibra dietética en su fracción soluble. Se reconocen actualmente cinco modalidades gustativas, las cuales a nivel molecular y celular para poder ser detectadas por las células gustativas, se necesita que estas células localizadas en los corpúsculos gustativos, por ejemplo en las papilas caliciformes de los mamíferos, expresen los receptores gustativos específicos para la detección de las moléculas sápidas contenidas en los alimentos (Barlow, 2003, Chaudhari y Roper, 2010). Más sin embargo, las

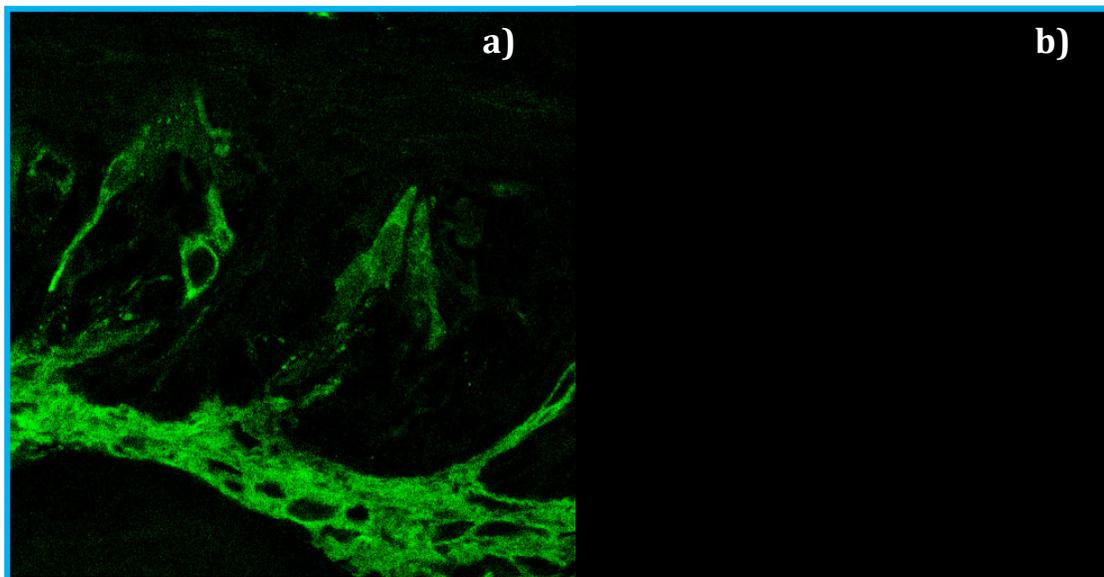


Figura 1. a) Micrografía de microscopia confocal para inmunofluorescencia positiva en corte transversal de papila caliciforme de rata. La escala corresponde a 30 μm (amplificación x1200). **b)** Control negativo de microscopia por confocal en corte transversal histológico de papila caliciforme de rata.

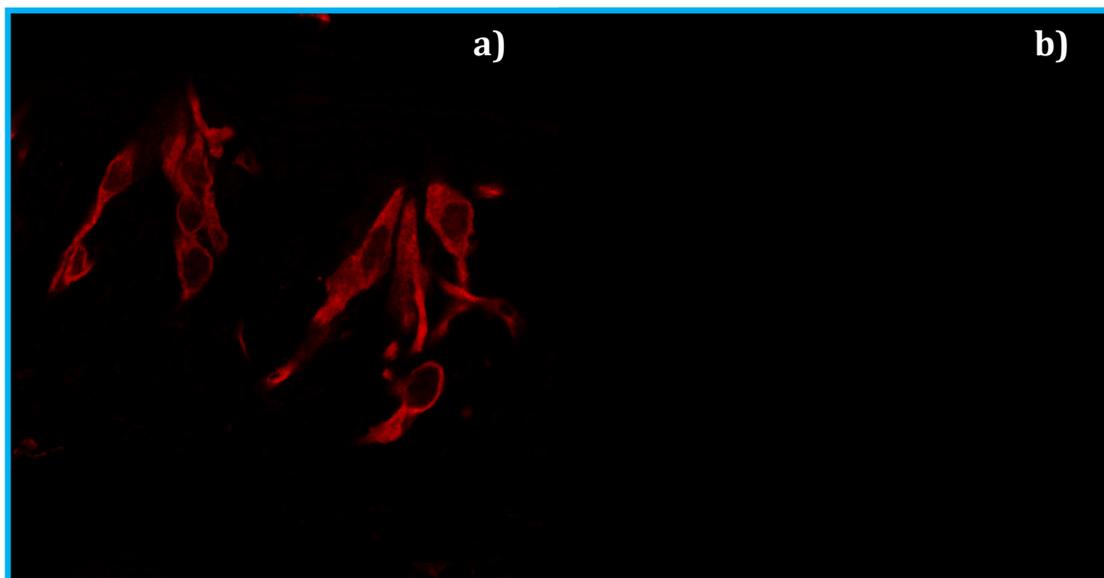


Figura 2. a) Micrografía de microscopia confocal para inmunofluorescencia positiva en corte transversal de papila caliciforme de rata. La escala corresponde a 30 μm (aumento x1200). **b)** Control negativo de microscopia por confocal en corte transversal histológico de papila caliciforme de rata.

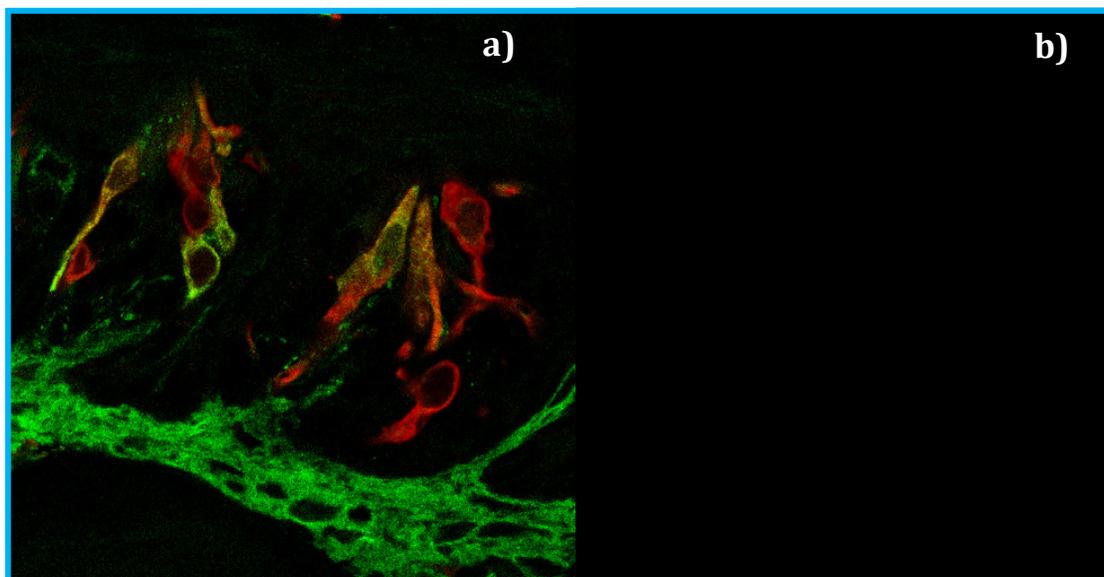


Figura 3. a) Micrografía de microscopia confocal para inmunofluorescencia positiva en corte transversal de papila caliciforme de rata. La escala corresponde a 30 μm (aumento x1200). **b)** Control negativo de microscopia por confocal en corte transversal histológico de papila caliciforme de rata.

células gustativas tiene a su vez sub-tipos celulares (Lee *et al.*, 2009), en donde las células de Tipo I se les ha atribuido una función de células de sostén (Huang *et al.* 2009), las células de Tipo II son las células que expresan la totalidad de los receptores específicos para las modalidades gustativas, así como los elementos sub-celulares de la transducción de la señal gustativa (Zhang *et al.*, 2007) y las células de Tipo III expresan o contienen neurotransmisores como la serotonina (Huang *et al.*, 2009) y los receptores serotoninérgicos correspondientes (Huang *et al.*, 2008, Suzuki, 2007). De esta manera, los resultados muestran que las células inmunomarcadas para la gustducina son células gustativas de Tipo II, y adicionalmente algunas células gustativas de tipo II se encuentran co-expresando al receptor GPR-43, lo que permite apoyar la idea que existen células gustativas especializadas, de tipo II, que expresan el receptor correspondiente a AGCC y la maquinaria sub-celular necesaria para la codificación de la señal gustativa en coordinación con las células de Tipo III que exhiben un fenotipo de celular (Huang *et al.*, 2008). En la década pasada se han encontrado evidencias que sugieren que, pueda existir una sexta modalidad de percepción sávida (Khan, 2009), en este caso la percepción para las moléculas lipídicas, ampliamente encontradas en diversos alimentos; sin embargo, sólo se ha descrito la expresión a nivel lingual, y sólo en papilas fungiformes de ratón, de CD36 y GPR-40 (Cartoni *et al.*, 2010, Gaillard, *et al.* 2008) de los cuales se ha verificado pueden unirse a sus ligandos correspondientes, ácidos grasos de cadena larga, estableciendo la interacción del CD36 con sus ligandos correspondientes, por ejemplo ácido linoléico (El-Yassimi, *et al.*, 2008), desencadena la liberación de algún neurotransmisor mediada por la transducción de señales gustativas en las células gustativas de tipo II y tipo III. Adicionalmente, se debe de considerar que existen ácidos grasos de cadena corta contenidos en la dieta (De la Fuente *et al.*, 2009) detectados a nivel de cavidad oral en donde algún receptor puede mediar la interacción con sus ligandos correspondientes (butirato, propionato, acetato), así con el conjunto de evidencias y lo reportado en la literatura se avanza en la consolidación de una posible sexta modalidad gustativa especializada en la percepción de lípidos.

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 Criostato y 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
- Cartoni C, Yasumatsu K, Ohkuri T, Shigemura N, Yoshida R, Godinot N, le Coudre J, Ninomiya Y, Chaudhari N, Roper SD** (2010) The cell biology of taste. *J Cell Biol.* 190(3):285-96.
- Chaudhari N, Roper SD** (2010) The cell biology of taste. *J. Cell. Biol.* 9; 190(3):285-96
- 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
- Damak S** (2010) Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *Journal Neuroscience.* 30(25):8376-82
- De La Fuente LF, Barbosa E, Carriedo JA, Gonzalo C, Arenas R, Fresno JM, San Primitivo F** (2009) Factors influencing variation of fatty acid content in ovine milk. *Journal Dairy Science.*92(8):3791-9.
- El-Yassimi A, Hichami A, Besnard P, Khan NA** (2008) Linoleic acid induces calcium signaling, Src kinase phosphorylation, and neurotransmitter release in mouse CD36-positive gustatory cells. *Journal Biological Chemical.* 283(19):12949-12959
- Gaillard D, Laugerette F, Darcel N, El-Yassimi A, Passilly-Degrace P, Hichami A, Khan NA, Montmayeur JP, Besnard P** (2008) The gustatory pathway is involved in CD36 mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse. *FASEB Journal.* 22(5):1458-68
- García G, Corte-Osorio I, Cajero-Juárez M, Martínez-Flores H, Mercado-Camargo R, Ortiz-Alvarado R** (2009) Expresión del receptor GPR43 en corpúsculos gustativos de rata adulta. *Biológicas,* 11:16-21
- Hou Z, Sun C, Sheng Wu, Gong Cheng, Xue Bao** (2008) Transcriptional expression of GPR43 gene in adipose tissue and primary cultured adipocytes of pig. *PMID .* 24(8):1361-1366
- Huang YA, Dando R, Roper SD** (2009) Autocrine and paracrine roles for ATP and serotonin in mouse taste buds. *Journal Neuroscience.* 29(44):13909-18
- Huang YA, Maruyama Y, Stimac R, Roper SD** (2008) Presynaptic (Type III) cells in mouse tastebuds sense sour (acid) taste. *Journal Physiology.* 586 (12):2903-12
- Karaki S, Mitsui R, Hayashi H, Kato I, Sugiyama H, Iwanaga T, Furness JB, Kuwahara A** (2006) Short-chain fatty acid receptor, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in rat intestine. *Cell Tissue Research.* 324(3):353-360
- Khan NA** (2009) Oro-sensory perception of dietary lipids: new insights into the fat taste transduction. *Biochimica et Biophysica Acta.*149-155
- Kinnamon SC** (2009) Umami taste transduction mechanisms. *American Journal Clinical Nutrition.* 2009 Sep;90(3):753S-755S
- 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, 236-242
- Lee SB, Lee CH, Kim SN, Chung KM, Cho YK, Kim KN** (2009) Type II and III Taste Bud Cells Preferentially Expressed Kainate Glutamate Receptors in Rats. *Korean Journal of Physiology Pharmacology.* 13(6):455-60
- Laugerette F, Passilly-Degrace P, Patris B, Niot I, Febbraio M, Montmayeur JP, Besnard P** (2005) CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference and digestive secretions. *Journal Clinical. Investigation.* 115(11): 2965-2977
- Li X, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M, Adler E** (2002) Human receptors for sweet and umami taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 99(7):4692-4696
- Miyoshi MA, 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

- Montmayeur JP, Liberles SD, Matsunami H y Buck LB** (2001) A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus. *Nature Neuroscience*. 4:492-498
- Mueller KL, Hoon MA, Erlenbach I, Chandrashekar J, Zuker ChS, Ryba JP** (2005) The receptors and coding logic for bitter taste. *Nature*, 434, 225-229
- Suzuki T** (2007) Cellular mechanisms in taste buds. *Bulletin Tokyo Dental College*. 48(4):151-61
- Zhang GH, Zhang HY, Deng SP, Qin YM** (2007) Differentiation of alpha-gustducin in taste buds of the mouse soft palate and fungiform papillae. *Acta Histochemica*.109(6):486-90