



Expresión del receptor gpr43 en corpúsculos gustativos de rata adulta

García- Guadalupe¹, Corte-Orsorio Lucila¹, Cajero-Juárez Marcos², Martínez-Flores Héctor¹, Mercado-Camargo Rosalio¹, Ortiz-Alvarado Rafael^{1,3*}

¹Laboratorio de Neurobiología, Facultad de Químico Farmacobiología, Calle Tzintzuntzan No. 173 Col. Matamoros Morelia, Mich., Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. ²Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Unidad Posta Zootécnica, Tarimbaro Michoacán. ³Universidad del Valle de Atemajac, Campus La Piedad, Mich., Av. Universidad No. 1000, Licenciatura de Nutrición

PALABRAS CLAVE

Receptores gustativos;

Ácidos Grasos de Cadena Corta;

GPR43.

RESUMEN

El sentido del gusto informa al organismo acerca de la calidad de los alimentos ingeridos. Cinco sub-modalidades sápidas permiten la percepción de los estímulos dulces, salados, agrios, amargos y umami contenidos en los alimentos, han sido descritos. Sin embargo, la atracción innata de los mamíferos por los alimentos grasos. Plantea la posibilidad de una nueva modalidad orosensorial dedicada a la percepción de lípidos. Durante mucho tiempo, se pensaba que los lípidos de la dieta sólo se detectaban por el trigémino (textura y viscosidad de la percepción) y por señales retronasales olfativas. En este trabajo se muestran evidencias de que el receptor GPR43 se expresa en células gustativas de rata adulta y permiten apoyar su participación en la percepción de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC).

ABSTRACT

The sense of taste informs the organism about the quality of the diet. Sapid Five sub-modalities allowing the perception of stimuli sweet, salty, sour, bitter and umami in food, have been described. However, the innate attraction of mammals for fatty foods. Raises the possibility of a new mode dedicated to the perception orosensorial lipids. For a long time, it was believed that lipids in the diet was only detected by the trigeminal (texture and viscosity of perception) and retronasal signals, olfactory. In this paper we show evidence that the GPR43 receptor is expressed in taste cells of adult rat and allowed to support their participation in the perception of short-chain fatty acids (SCFA).

KEYWORDS

Taste receptor;

short-chain fatty acids;

GPR43

INTRODUCCIÓN

El sentido del gusto forma parte del sistema sensorial químico o de quimiorrecepción de los mamíferos. El complejo proceso de la degustación comienza cuando las moléculas sápidas contenidas en los alimentos se liberan en la saliva y son registradas dentro de la cavidad oral. Células especializadas localizadas principalmente en la superficie de la lengua permiten la detección de los compuestos sápidos, a través de la expresión de receptores específicos para la detección de las diferentes modalidades gustativas identificadas

y aceptadas actualmente por ejemplo para el sabor dulce y umami se han asociado a los receptores T1R (Damak et al. 2003, Kitsukawa, et al. 2001, Li et al., 2001, Montmayeur et al., 2001), sabores amargos, receptores T2R (Miyoshi et al., 2001, Mueller et al., 2005), sabores salados, canales iónicos (Chaudhari et al. 1996)

*Autor correspondiente
Laboratorio de Neurobiología, Facultad de Químico Farmacobiología, Calle Tzintzuntzan No. 173 Col. Matamoros Morelia, Mich., Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tel 3 14 21 52 . Tel cel: 44 32 27 75 36.

Correo electrónico:
rafaelortizalvarado@yahoo.com.mx

y sabores agrios (Herness et Sun, 1999, Richter, et al., 2004) y de esta manera se permite la liberación posiblemente de algunos neurotransmisores (Herness et al., 2005) los cuales portan la señal a través de los nervios como el glossofaríngeo o trigémino (Munger, 1993) hasta el sistema nervioso central, donde las señales gustativas son decodificadas y los sabores específicos son identificados (Shiffman, 2000).

Otro mecanismo quimiosensorial, que colabora en la identificación de los sabores y sensaciones nociceptivas de los alimentos es a través de terminaciones nerviosas como el nervio trigémino. Sin embargo, entre los mamíferos y particularmente el hombre se ha documentado una particular apetencia por los alimentos que son suplementados con lípidos (Khan, 2009) como los ácidos grasos de cadena larga y ácidos grasos de cadena corta, los cuales imparten cualidades sápidas y nociceptivas agradables a los alimentos y pueden tener un impacto sobre el consumo de alimentos ricos en lípidos (Dileo et al., 1994). Hasta ahora solo se ha identificado al CD36 lingual, el cual es un fuerte candidato a ser considerado como un receptor específico para la detección de ácidos grasos de cadena larga en los alimentos Gaillard, et al., 2008, Laugerette et al., 2005), pero no se ha demostrado la expresión de receptores específicos para la detección de ácidos grasos de cadena corta, los cuales imparten ciertas cualidades sápidas a ciertos alimentos de origen lácteo (De la Fuente, et al., 2009). Así en este trabajo se muestran evidencias de que el receptor GPR43 se expresa en ciertas células gustativas provenientes de rata adulta, el cual puede participar en la detección de moléculas lipídicas contenidas en la dieta de los mamíferos.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se utilizaron 6 ratas macho adultas de la cepa Wistar, de 200 g de peso; las cuales se mantuvieron en condiciones 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 calciforme, localizada en la parte posterior de la lengua, posteriormente la papila calciforme se homogeneizó en 1000 µl de Trizol™, se almacenaron las muestras a -80°C hasta su uso.

Biología molecular

Extracción del acidos ribonucleicos totales (ARN) de papilas calciformes de rata:

La extracción de los ARN totales de las papilas calciformes se realizó utilizando el reactivo Trizol™ de Invitrogen, basado en el método descrito por Chomczynski and Sacchi (1987). La concentración y la pureza del ARN se determinó espectrofotométricamente a 260 y 260/280 nanómetros (nm) respectivamente.

Experimentos de retro transcripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Para la obtención el Acido Desoxirribonucleico complementario ADN (ADNc) se utilizó el sistema de retrotranscripción *AMV de PROMEGA™*, en cada reacción se utilizó un control negativo los cuales fueron tratados de manera idéntica a las muestras denominadas control positivo. Se utilizaron los oligonucleótidos para rata (*Rattus norvegicus*) del receptor GPR43 (NM_001005877.1)

Oligonucleótido sentido:

5' - GCACCATCGTCATCATCGTT - 3';

antisentido,

5' - GCCAATAGCAGAAGATGG - 3.

Las condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron las siguientes, una fase inicial de desnaturalización de 5 minutos a la temperatura de 94°C y 40 ciclos de 60 segundos a 94°C, 60 segundos a 55°C y 72°C durante 90 segundos y un ciclo final de extensión de 8 minutos a 72°C.

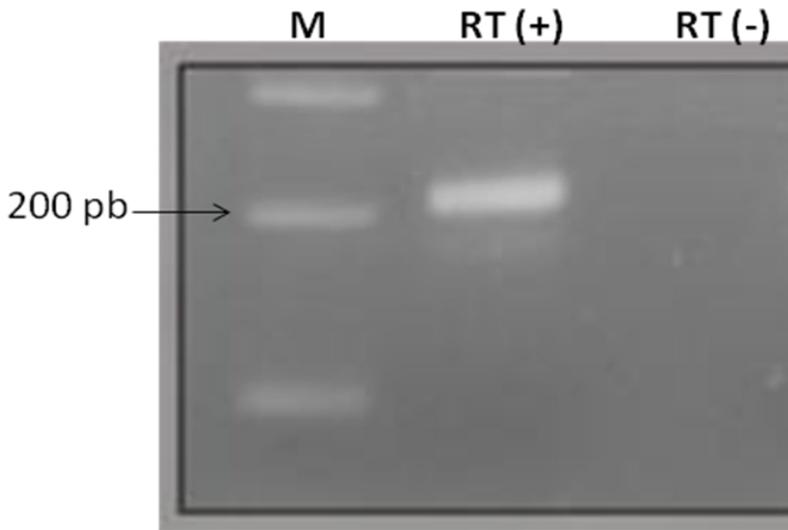


FIGURA 1. Imagen de gel de agarosa al 1.5%, M: Marcador de ADN de 100 pb; RT(+): control positivo para el gen *gpr43* y RT (-) control negativo.

Obtención del tejido

Los papilas caliciformes provenientes de las ratas fueron colectadas y puestas en solución de fijación, para-formaldehído, al 4% en PBS y conservadas a 4°C, durante 6 horas, después, las papilas fueron colocadas secuencialmente en una solución de sacarosa al 10%, 20% y 30% de concentración en PBS, en cada solución de sacarosa los tejidos se encontraron en el fondo del tubo. Las papilas después de su crioprotección fueron orientadas en moldes de plástico y embebidas en Tissutek, provisto por ASPENLABS de México, y enseguida congeladas

a -25 °C y preservadas a -20 °C; se realizaron cortes en un criostato Leica, a -20 °C y un espesor de 30 µm, posteriormente colectadas sobre laminillas Super Frost tratadas con Polilisina (Sigma™). Los cortes de las papilas fueron conservadas a -25 °C hasta su uso.

Inmunohistoquímica:

Los cortes de la papila caliciforme fueron sacados a la temperatura ambiente durante un período de 60 minutos, posteriormente hidratados con buffer de fosfatos (PBS), e incubados durante 60 minutos

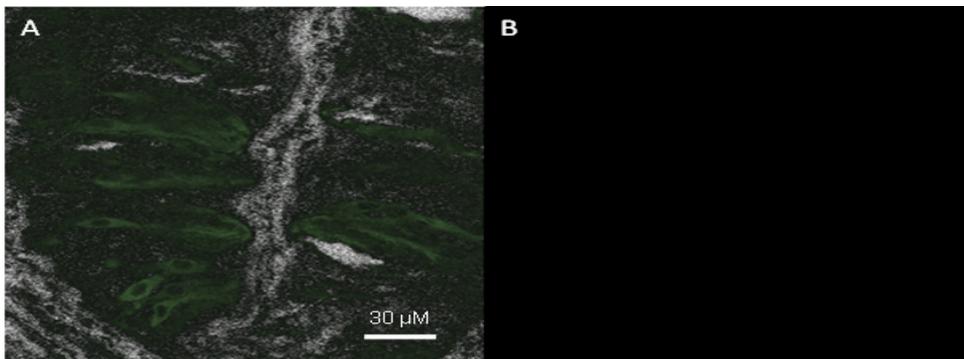


FIGURA 2. A) Micrografía de microscopia de epifluorescencia para inmunofluorescencia positiva en corte transversal de papila caliciforme de rata. La escala corresponde a 30 µm. (aumento x680). B) Control negativo de microscopia de epifluorescencia en corte transversal de papila caliciforme de rata.

a temperatura ambiente con la solución de bloqueo: 0.3% de triton X-100 (Sigma™) y 10% de suero normal de asno (Sigma™) en PBS. Enseguida, la incubación con el anticuerpo primario anti-GPR43 (anticorps-enligne.fr™) diluido (1:200) en la solución de incubación 0.3% de tritón X-100 (Sigma™) y 2% de suero normal de asno (Sigma™) en PBS, la incubación transcurrió durante 48h a 4 °C.

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 (Molecular Probes) diluido 1:250 en PBS fue incubado a temperatura ambiente durante 2 h. Enseguida se lavaron los cortes con PBS tres veces durante 5 minutos cada ocasión y montadas con solución Pro-Long Antifade de Molecular Probes observadas y documentadas con el microscopio de epifluorescencia Nikon.

RESULTADOS

La figura 1, muestra la imagen proveniente del gel de agarosa al 1.5% y se muestra la expresión del gen del receptor gpr43 expresado en papilas caliciformes de las lenguas de los animales adultos utilizados en el presente trabajo, el producto de amplificación corresponde a aproximadamente 190 pares de bases (pb), de acuerdo a lo esperado por los oligonucleótidos utilizados (ver material y métodos) en los experimentos de RT-PCR.

La figura 2, A) muestra células gustativas con una inmunoreacción positiva del anticuepo anti-GPR43 en cortes transversales de papila caliciforme provenientes de al menos 4 animales diferentes; se muestra la especificidad de la señal de fluorescencia y describe la estructura clásica bipolar de las células gustativas en los corpuslos gustativos de la papila caliciforme. La micrografía ha sido obtenida a través del microscopio de epifluorescencia con el objetivo 63X. B) Inmunoreacción negativa, correspondiente al control negativo en cortes transversales de papila

caliciforme, en donde no se agrego el anticuerpo primario (anti-GPR43), pero se realizó el revelado normal con el anticuerpo secundario. La observación fue realizada en el microscopio de epifluorescencia con el objetivo 63X.

DISCUSIÓN

El presente trabajo muestra la expresión del gen correspondiente al receptor gpr43 en papilas caliciformes de rata por medio de RT-PCR y por la inmunohistoquímica específica para las células gustativas en papilas caliciformes de lengua de ratas adultas. Este receptor se ha reportado que se encuentra expresado tanto en células enteroendocrinas del intestino, así como en adipocitos (Hou, et al., 2008, Karaki et al. 2006), además este receptor se une con sus ligandos correspondientes: butirato, propionato y acetato, los cuales se encuentran en ciertos alimentos, pero también son producidos por la flora microbiana que se encuentra en la mucosa del intestino grueso, esto como producto de la degradación de la fibra dietética en su fracción soluble. Se reconocen actualmente cinco modalidades gustativas, las cuales a nivel molecular para poder ser detectadas por las células gustativas, se necesita que estas células localizadas 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). En la última década se ha propuesto 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, solo se ha descrito la expresión a nivel lingual y solo en papilas fungiformes de ratón del CD36 (Gaillard, et al. 2008) del cual se ha verificado puede unirse a sus ligandos correspondientes, ácidos grasos de cadena larga, también se ha podido establecer 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. Se debe de considerar que existen ácidos grasos de cadena corta contenidos en la dieta (De la Fuente et al., 2009) que pueden eventualmente ser

detectados a nivel de cavidad oral y en donde algún receptor puede mediar la interacción con sus ligandos correspondientes (butirato, propionato, acetato).

CONCLUSIONES

Así el presente trabajo reporta por primera vez la expresión del receptor GPR43 en esta estructura lingual (papila caliciforme) de rata adulta, lo cual sienta las bases para trabajos posteriores en los cuales se pueda establecer **i)** el tipo celular gustativo que media la vía de señalización a nivel intracelular, **ii)** si existe la posible liberación de neurotransmisores y **iii)** las implicaciones fisiológicas de interacción de los ligandos butirato, propionato y acetato con el receptor GPR43 expresado a nivel.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por el PROGRAMA DE MEJORAMIENTO DEL PROFESORADO (PROMEP), FOLIO UMICH-139, y el Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología del Estado de Michoacán.

REFERENCIAS

Barlow L. A. (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. The taste of monosodium glutamate: membrane receptors in taste buds. (1996). *The Journal of neuroscience*. 16(12):3817-26.

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.

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. *J Dairy Sci*.92(8):3791-9.

Dileo, M.D., Amedee R.G. Disorders of taste and smell.(1994). *The Journal of the Louisiana State Medical Society*. Oct. 146(10):433-7.

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. *J. Biol. Chem*.283(19):12949-12959.

Farbman AI, Mbiene JP. (1991). Early development and innervation of taste bud-bearing papilla on the rat tongue. *The Journal of comparative neurology*. 304(2):172-186.

Gaillard D, Laugere 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 J*. May;22(5):1458-68.

Herness M.S. and Sun X.D. (1999). Characterization of chloride currents and their noradrenergic modulation in rat taste receptor cells. *Journal of Neurophysiology*. 82, 260-271.

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.

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.

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 Res*. 324(3):353-360.

Khan NA. (2009). Oro-sensory perception of dietary lipids: new insights into the fat taste transduction. *Biochim Biophys Acta*.149-155.

Kitsukawa M., Kusakabe Y., Miura H., Ninomiya Y., Hino A. (2001). Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for

- sweet taste. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283, 236-242.
- Li X, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M, Adler E. Human receptors for sweet and umami taste. (2002). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 99(7):4692-4696.
- 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.
- Montayeur J.P., Liberles, S.d., Matsunami H., and Buck L.B. (2001). A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus. *Nature Neuroscience.* 4:492-498.
- Mueller K.L., Hoon M.A., Erlenbach I., Chandrashekar J., Zuker Ch. S. et Ryba J. P. (2005). The receptor and coding logic for bitter taste. *Nature*, 434, 225-229.
- Munger B.L. (1993). The general somatic terminals in oralmucosae. In : *Mechanisms of taste transduction*, edited by S.A. Simon and Roper, Boca Raton, FL: CRC Press, p 83-104.
- Laugurette 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. *J. Clin. Invest.* 115(11): 2965-2977.
- 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.
- Schiffman SS. (2000). Taste quality and neural coding: implications from psychophysics and neurophysiology. *Physiology & behavior.* 69(1-2):147-59.