

Reducción de los corpúsculos gustativos en la papila caliciforme en ratas administradas con para-cloro-fenilalanina

Acosta Chávez Jaime¹, Villagrán U. J. ² y Mercado Camargo Rosalio¹

¹PIMCB-Facultad de Química Farmacobiología. U.M.S.N.H.

²Lab. de Patología. Hospital Civil. SSM.

Resumen

La percepción de las diversas modalidades gustativas inicia en la lengua, en la cual existen estructuras especializadas conocidas como corpúsculos gustativos, los corpúsculos se encuentran ubicados en las papilas gustativas, las cuales se han clasificado en papilas fungiformes, foliadas y caliciformes. El desarrollo del sistema gustativo en la rata inicia en etapas tempranas del desarrollo embrionario y termina cuando el animal es adulto. Se ha descrito la participación de diversos factores moleculares durante el desarrollo del sistema gustativo, como entre los cuáles se encuentra la serotonina (5-HT). Se ha confirmado la participación de la serotonina en diversos procesos de desarrollo, a nivel de la corteza cerebral, en el tejido cardíaco, en el intestino y en la mandíbula. Actualmente se desconoce el efecto de la serotonina sobre el desarrollo de los corpúsculos gustativos, por lo que en el presente trabajo se decidió administrar un inhibidor específico de la síntesis de serotonina, la ρ -cloro-fenilalanina (PCPA) durante el desarrollo de la papila caliciforme. Se realizó disección de la papila caliciforme a los 17 días de gestación, así como a los 0, 7, 14, 21 y 60 días postnatales, se procedió a realizar cortes histológicos y tinción de hematoxilina-eosina. Posteriormente se realizó conteo de corpúsculos y análisis de la morfología. Los resultados obtenidos mostraron alteraciones en la morfología de la papila caliciforme y reducción en el número de corpúsculos gustativos en los animales tratados con PCPA. Los datos mostrados apoyan la hipótesis de la existencia de un sistema serotoninérgico inherente al epitelio lingual, donde la serotonina participa probablemente como factor trófico durante el desarrollo de la papila caliciforme de la rata.

Palabras clave: Serotonina, PCPA, corpúsculo gustativo, Morfología.

Abstract

The perception of different taste modalities start in the tongue by specialized structures known as taste buds which are located in the taste papillae's. Taste papillae has been classified in fungiform, foliate and circumvallated. The development of the taste system in the rat starts in early stages of embryonic development and finish at the adult stage. In the development of the taste system has been described various molecular factors such as serotonin (5-HT). It has confirmed the involvement of serotonin in various developmental processes at the level of the cerebral cortex, heart tissue, in the gut and mandible. The serotonin-dependence of taste buds function is currently unknown, so, in the present work we decided to administer a specific inhibitor of serotonin synthesis, the ρ -chloro-phenylalanine (PCPA) during the development of the circumvallated papillae. We performed dissection of circumvallated papillae at 17 days gestation and at 0, 7, 14, 21 and 60 postnatal days; we did histological sections and hematoxylin-eosin staining. Taste buds were counted and morphologically. The results showed alterations in the morphology of the papillae and reduction in the number of taste buds in animals treated with PCPA. These data support the hypothesis of the existence of a serotonergic system inherent to lingual epithelium, where serotonin participates probably as a trophic factor during development of the rat taste papillae.

Key words: serotonin, PCPA, taste buds, Morphology.

Introducción

La detección de las diversas modalidades gustativas es realizada por el sistema gustativo, el primer elemento en el reconocimiento de las moléculas sápidas es llevado a cabo por un tipo de células especializadas conocido como células gustativas (Zuker *et al.*, 2006). Las células gustativas se encuentran agrupadas en corpúsculos gustativos, los cuáles se consideran la unidad funcional del sistema gustativo periférico. Los corpúsculos se encuentran localizados en las papilas gustativas, las cuales han sido clasificadas atendiendo a su morfología en papilas foliadas, fungiformes y caliciformes (Roper, 2007). El desarrollo del sistema gustativo periférico inicia en etapas tempranas del desarrollo embrionario, en la rata se ha propuesto que el desarrollo de la lengua inicia en el día embrionario 9.5 (E9.5) con la inducción de la placa

epibranquial que formara las estructuras primarias de la lengua y de las papilas gustativas durante el periodo comprendido del día embrionario 11 (E11) y hasta el día embrionario 16.5 (E16.5). Los corpúsculos gustativos aparecen a partir del día 20 de gestación y son funcionales hasta después del nacimiento, el desarrollo de la innervación va a la par que el desarrollo de las estructuras primarias de la lengua y del epitelio lingual, en el día 19 de gestación se presentan las primeras vesículas presinápticas al interior del corpúsculo gustativo (Zhang *et al.*, 2001). El desarrollo concluye cuando la rata es un animal adulto a los 60 días postnatales (P60) (Krimm, 2007). Actualmente se han descrito los procesos de desarrollo del sistema gustativo periférico, pero aun existen interrogantes sobre los diversos factores moleculares, así como, las funciones de estos factores durante el desarrollo del

✉ **Autor de correspondencia:** Rosalio Mercado Camargo. Laboratorio de Neurobiología, Facultad de Química Farmacobiología, UMSNH. Av. Tzintzuntzan # 173 col. Matamoros, Morelia Michoacán C.P. 58240. Email: ros421@hotmail.com

sistema gustativo. Se ha confirmado la participación de factores de transcripción de la familia *eyes absent* (Eya) y de la familia SIX, los cuales son fundamentales para asegurar la división celular durante la formación de la placa epibranchial (Zou *et al.*, 2004), de forma paralela se ha demostrado la presencia de moléculas como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), proteína morfogénica del hueso (BMP), neurofinas (NTs) y serotonina (5-OH-triptamina, 5-HT) (Krimm, 2007).

La serotonina en los mamíferos adultos participa en la regulación de los ciclos circadianos, conducta sexual, procesos de aprendizaje y memoria (Cook *et al.*, 2000), además, participa en la regulación de la Na⁺/K⁺-ATPasa en la corteza cerebral (Mercado *et al.*, 1992). Las diversas funciones de la 5-HT son mediadas a través de la activación de receptores específicos, los cuales son conocidos como receptores serotoninérgicos y a la fecha se han aceptado 7 familias y 15 subtipos (Várnäs, 2005). La 5-HT es sintetizada a partir del aminoácido esencial L-triptófano, la vía biosintética consta de dos etapas, en la primera se hidroxila al L-triptófano para formar el 5-hidroxitriptófano, esta es la reacción limitante de la vía y es realizada por la enzima conocida como triptófano-5-hidroxilasa (TPH), de la cual se han descrito dos isoformas TPH1 y TPH2 (Walther, 2009). La segunda reacción consiste en la descarboxilación del 5-hidroxitriptófano para formar la 5-HT, esta reacción es mediada por la enzima conocida como descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos (AADC).

En relación con el sistema gustativo y la 5-HT, se sabe que en humanos adultos la 5-HT participa en la transducción de las modalidades dulce y amarga (Heath *et al.*, 2006), pacientes con problemas en la regulación endógena de serotonina, como es la depresión y la anorexia, han mostrado trastornos en la percepción de las diversas modalidades gustativas. Se ha demostrado también, que las células gustativas del ajolote, ratón, rata, conejo entre otras especies, tienen la capacidad de almacenar y liberar 5-HT (Fujimoto *et al.*, 1987; Kim & Roper, 1995; Yee *et al.*, 2001) y en ratas adultas se ha demostrado la expresión de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₃ en los corpúsculos gustativos de la papila caliciforme (Herness *et al.*, 2004). Por otro lado, se identificó la expresión de la proteína transportadora de la serotonina (5-HTT) en las células gustativas de la rata (Ren *et al.*, 1999), estos antecedentes sugieren la probable participación de la serotonina en los procesos de comunicación celular al interior del corpúsculo gustativo ya sea mediante mecanismos de comunicación convencional o paracrina (Sugita, 2006), así como la presencia de un sistema serotoninérgico inherente al epitelio lingual.

Aunado a las funciones descritas de la serotonina en animales adultos, se ha corroborado el papel como factor trófico de la serotonina durante el desarrollo de diversas especies, por ejemplo, en el cerebro de fetos de rata a los 12 días de gestación aparecen células con fenotipo serotoninérgico (Fujiyima *et al.*, 1986), también, se demostró que al administrar L-triptófano a ratas de 15 días de gestación se produce un incremento en la actividad de la TPH cerebral (TPH2) de los fetos de las ratas (Chagoya & Hernández, 1983), existe evidencia experimental que demuestra que la serotonina es esencial para el desarrollo del corteza cerebral motora de la rata (Vitalis *et al.*, 2007), al igual que participa en los procesos de desarrollo del tallo cerebral mediante la activación

de los receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} (Volgin *et al.*, 2003). La participación de la serotonina como factor trófico no solo se limita al desarrollo del SNC, también se ha puesto en evidencia la dependencia del desarrollo cardíaco hacia la 5-HT, mediante la activación del receptor 5-HT_{2B} (Nabigil *et al.*, 2000), la serotonina al activar los receptores de la familia 5-HT₁ y 5-HT₂ promueve la diferenciación de las neuronas entéricas en embriones de rata (Fiorica-Howells *et al.*, 2000). En relación al sistema gustativo actualmente se conoce que las células gustativas de fetos de ratón de 15 y 17 días de gestación expresan las dos isoformas de la TPH (Ortiz *et al.*, 2006). Actualmente se cuenta con poca información sobre la participación de la serotonina durante el desarrollo del sistema gustativo periférico, por lo cual el objetivo del presente trabajo fue evaluar si existen cambios en el número de corpúsculos gustativos y en la morfología de la papila caliciforme de ratas tratadas con un inhibidor selectivo de la síntesis de serotonina, administrado durante las etapas clave del desarrollo del sistema gustativo.

Materiales y Métodos

Para el presente estudio se utilizaron ratas hembra núlparas adultas de la cepa Wistar, las cuales fueron mantenidas en condiciones estándar en el bioterio de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, con alimentación y agua *ad libitum*. Cumpliendo los protocolos actuales para el uso y manejo de animales de investigación (86-609-ECC).

Las ratas fueron pareadas y el día que se observó el tapón vaginal fue considerado como día embrionario 0 (E0). Se procedió a formar dos grupos, el grupo control y el tratado con el inhibidor selectivo de la síntesis de serotonina el cual fue la PCPA. El grupo tratado con PCPA fue administrado en el día 12 de gestación con una dosis de 300 mg/kg de peso corporal, el efecto inhibitorio fue mantenido del día 13 al 17 de gestación con una dosis diaria de 100 mg/kg de peso corporal. Todas las administraciones fueron realizadas por vía intraperitoneal (IP) y al grupo control se le administró únicamente el vehículo que consistió en Tris-HCl pH = 7.4

Disección de la papila caliciforme: Los corpúsculos gustativos en la rata aparecen al día embrionario (E) 20 (E20), en el presente trabajo se analizó la morfología de la papila caliciforme a partir de E17 y el número de corpúsculos gustativos se analizó a partir del día postnatal cero (P0). Para E17 se procedió a sacrificar a la madre mediante lesión cervical y posteriormente se realizó operación cesárea, los fetos fueron colocados en solución buffer de fosfatos (PBS) con pH = 7.4, en placa fría se realizó disección de la lengua y se procedió a almacenar en PAF al 4% a 4°C. En el caso de las etapas posnatales se realizó disección de la lengua a P0, P7, P14, P21 y P60, las ratas fueron sacrificadas mediante lesión cervical, se realizó disección de la lengua y fue almacenada en PAF al 4% a 4°C. Una vez colectadas las lenguas se procedió a realizar la crioprotección con agarosa, la cual consistió en lavados de 24 h a 4°C con soluciones de sacarosa al 10%, 20% y 30%, al finalizar la etapa de crioprotección se realizó disección de la papila caliciforme y se procedió a incluir la papila en una resina sintética para ser colocada a -70°C durante 24 h. Al finalizar la inclusión se procedió a realizar cortes histológicos en el criostato

del laboratorio de patología del Hospital Civil de Morelia, los cortes fueron realizados con un espesor de 16 μm . Los corpúsculos gustativos fueron contados empleando el método modificado de Bradley *et al* 1980, revisando cada papila en corte secuencial por triplicado tanto de los animales control y tratados con PCPA. La morfología fue evaluada empleando el programa "ImageJ 1.42" tomando en consideración la longitud, amplitud de la trinchera y el tejido epitelial.

Los datos del número de corpúsculos y del análisis de la morfología fueron analizados con el programa GraphPad Prism 3.0, calculando la media $\pm$ error estándar y empleando la prueba de "t de student" para determinar si las diferencias observadas fueron significativas.

Resultados

La **figura 1** muestra los resultados del número de corpúsculos gustativos de la papila caliciforme de animales control y tratados con PCPA. En los animales control se observó una curva de desarrollo con incrementos en el número de corpúsculos, con forme el animal se acerca a la edad adulta hasta llegar a aproximadamente a 200 corpúsculos por papila. En relación a los animales tratados con PCPA se observó una disminución significativa en el número de corpúsculos gustativos, a excepción de P7, en P0 existió una disminución de 60.6%, en P14 se observó una disminución del 28.5%, en P21 la disminución fue del 50.8% y en P60 se presentó una disminución del 26.3%.

En la **figura 2** en el panel A se muestra una fotomicrografía tomada (40X) de la papila caliciforme control en E17, donde se observa la estructura primaria de la papila en desarrollo, no se observan corpúsculos gustativos lo cual corrobora los datos experimentales de la aparición de los corpúsculos hasta el día 20 de gestación (Zhang *et al.*, 2001). En el panel B se muestra una fotomicrografía tomada (40X) de la papila caliciforme en E17 de un animal administrado con PCPA, al igual que en el panel A, no existen corpúsculos gustativos, pero se presentó

un incremento del epitelio (flechas largas) y se observó un adelgazamiento de la parte media de la papila (Flechas cortas). En el panel C se muestra la fotomicrografía tomada (10X) de la papila caliciforme control en P60 donde se distinguieron claramente los corpúsculos gustativos, así como, la morfología en el animal adulto. En el panel D se muestra una fotomicrografía tomada (10X) de la papila caliciforme del animal tratado con PCPA, se observó una disminución en número de corpúsculos, de forma paralela se presentó un incremento en la longitud de la papila (línea punteada), así mismo, se observó un incremento epitelial (flechas) y se observó una reducción en la amplitud de la trinchera (línea negra).

En la **figura 3** se muestra el análisis de la longitud medida en micrómetros (μm) de la papila caliciforme de animales control y tratados con PCPA, en el caso de los animales control se observó una curva de crecimiento con incrementos graduales en la longitud hasta llegar a su longitud final. En relación al animal tratado con PCPA se observó un incremento gradual de la longitud, pero se presentaron alteraciones en el desarrollo, en P21 se presentó una disminución significativa de la longitud de la papila en relación a la papila control, en cambio se observó un incremento significativo en E17 y P60 en los animales tratados con PCPA.

En la **figura 4** se muestra el análisis de la amplitud de la trinchera de la papila caliciforme medida en micrómetros (μm), en la cual se encontró que en la papila de animales control la trinchera fue incrementando de forma gradual, en cambio en los animales tratados con PCPA la trinchera presentó alteraciones en su amplitud, en P0 y P7 se observó un incremento y de forma contraria en P14, P21 y P60 se presentó una reducción.

En la **figura 5** se presenta el análisis del tejido epitelial medido en micrómetros (μm), para los animales control se presentó una curva de desarrollo en la cual se observaron incrementos durante el desarrollo de la papila. Para el caso de los animales administrados con PCPA en E17 y P0 se observa un incremento epitelial, pero a partir de P7 y hasta P60 se presentó una reducción epitelial significativa.

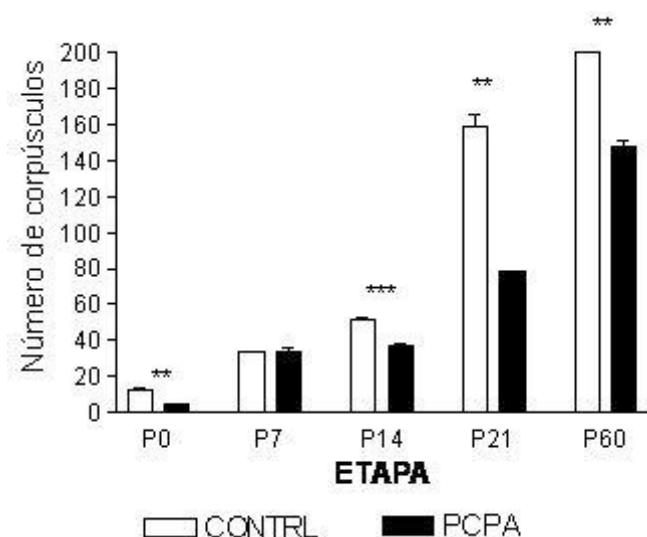


Figura 1. Número de corpúsculos gustativos en la papila caliciforme de animales control y tratados con PCPA. $\bar{X} \pm \text{E.E.}$ de tres papilas medidas por tres observadores independientes. ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ de tres experimentos realizados por triplicado.

Discusión

Existen reportes sobre el número de corpúsculos gustativos en la papila caliciforme de la rata, pero no sobre el incremento gradual de los corpúsculos durante el desarrollo de la papila caliciforme, en este sentido, el presente trabajo muestra las primeras evidencias experimentales sobre la ontogenia de los corpúsculos gustativos, de la misma manera, los resultados mostrados sobre los parámetros morfológicos de la papila caliciforme durante el desarrollo del tejido lingual, determinados en este estudio, son la primera evidencia experimental existente a la fecha. Estos resultados sugieren que en el caso de la papila caliciforme de la rata, la longitud, la amplitud de la trinchera y tejido epitelial se incrementan hasta presentar la morfología característica de la papila del animal adulto. En el caso del número de corpúsculos gustativos, los resultados presentados muestran un incremento gradual hasta llegar a ser aproximadamente 200 corpúsculos por papila, lo cual concuerda con los datos mostrados por otros investigadores (Suzuki, 2007), a pesar de que la papila caliciforme solamente es una en los roedores, ésta representa el 40% de los

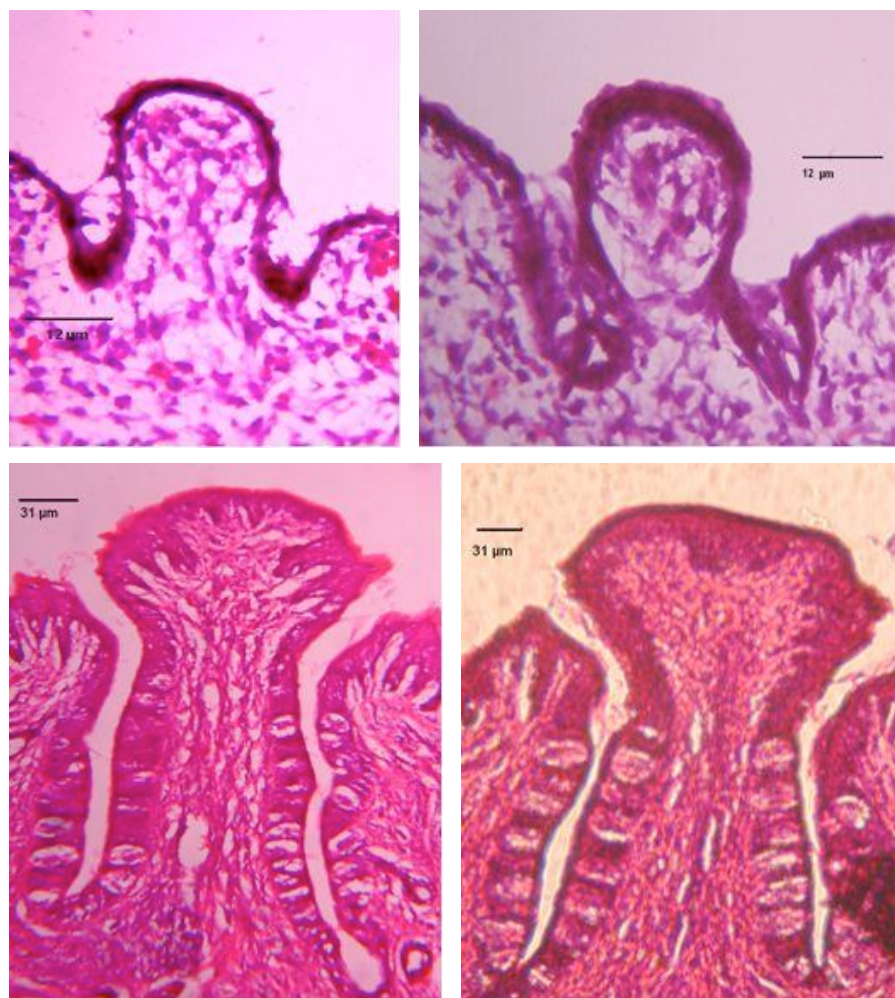


Figura 2.- Panel A fotomicrografía tomada (40X) en E17 a la papila caliciforme de un animal control, no existen corpúsculos gustativos aun. **Panel B** fotomicrografía tomada (40X) en E17 a la papila caliciforme de un animal tratado con PCPA, se presentó incremento epitelial (Flechas largas) y disminución de la parte media (Flechas cortas). **Panel C** fotomicrografía tomada (10X) en P60 de la papila caliciforme de un animal control, se observaron claramente los corpúsculos gustativos, así como, la morfología característica de la papila adulta. **Panel D** fotomicrografía tomada (10X) a la papila caliciforme de un animal tratado con PCPA, la línea punteada indica la longitud de la papila, la línea continua indica la trinchera y las flechas indican el epitelio.

corpúsculos gustativos totales de la lengua, esto permite tener una visión general de lo que pasa en los demás corpúsculos del resto de la lengua, cuando existe alguna alteración durante el desarrollo.

El objetivo principal del presente estudio fue evaluar los cambios en el número de corpúsculos y en la morfología de la papila caliciforme de la rata, cuando es administrado un inhibidor selectivo de la síntesis de serotonina durante las etapas clave del desarrollo del sistema serotoninérgico, en ese sentido la PCPA ha mostrado ser una buena herramienta farmacológica para inhibir la síntesis de serotonina, puesto que atraviesa la placenta al igual que atraviesa la barrera hematoencefálica (Moore & Hampton, 1974), produciendo inhibición de la actividad de la TPH1 y TPH2. En el presente trabajo se empleo 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 PCPA 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 PCPA 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 PCPA 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

muerte celular (Vitalis *et al.*, 2007; Butkevich *et al.*, 2005).

En el caso de los animales del grupo control, los resultados de los parámetros medidos, muestran una curva de desarrollo ontogénico normal, es decir, se presentan incrementos graduales dependientes de la edad del animal. De forma paralela en los animales que fueron administrados con PCPA se observaron cambios en la morfología de la papila caliciforme, estos cambios consistieron en modificaciones en la longitud, amplitud de la trinchera y tejido epitelial, lo cual sugiere que la serotonina podría estar participando en los procesos de desarrollo inherentes a la papila. En relación al número de corpúsculos gustativos se presentó una reducción a P0, P14, P21 y P60, en P7 no se presentó diferencia significativa, lo cual podría eventualmente atribuirse a la activación de por lo menos algún mecanismo molecular en P7 que intenta restablecer la cantidad de corpúsculos en relación al animal control, sin embargo, este mecanismo no es suficiente y termina la papila con una reducción en el total de corpúsculos. En cuanto al comportamiento en los cambios en longitud y amplitud de la papila caliciforme en las diferentes etapas del desarrollo de la rata (nacimiento, destete, madurez) en el grupo administrado con PCPA, se pueden atribuir justamente al efecto de disminución de la concentración de serotonina, la cual en estas diferentes etapas tiene un papel regulador sobre las mismas. La función que presenta la serotonina durante el desarrollo de

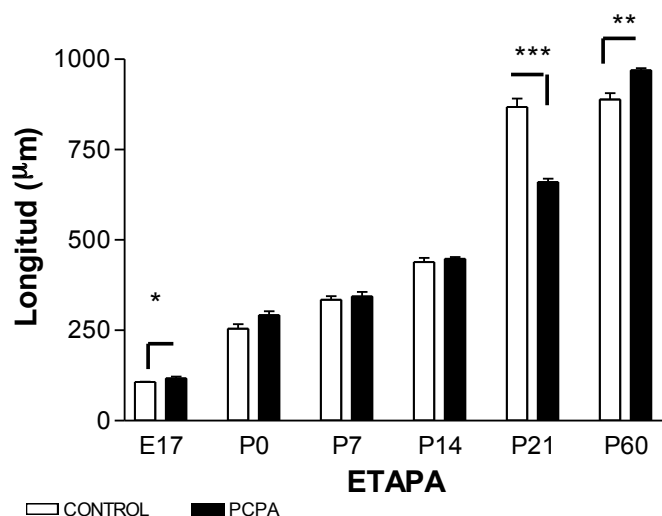


Figura 3. Longitud de la papila caliciforme (μm) de animales control y tratados con PCPA. Se muestra $\bar{X} \pm E.E.$ de 5 papilas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

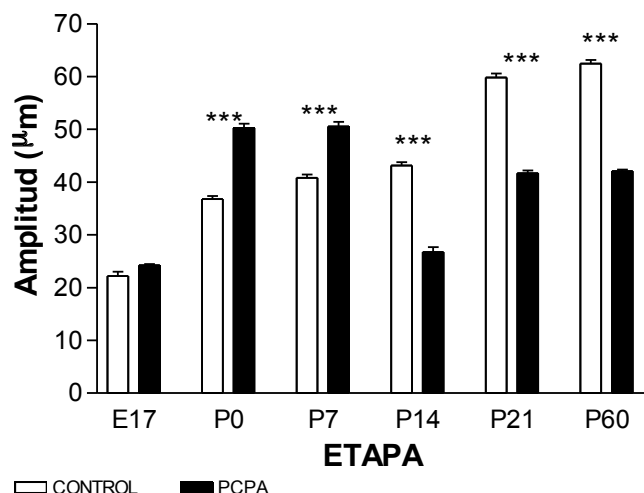


Figura 4.- Amplitud de la trinchera (μm) de la papila caliciforme de animales control y tratados con PCPA. Se muestra $\bar{X} \pm E.E.$ de 5 papilas. *** $p < 0.0001$.

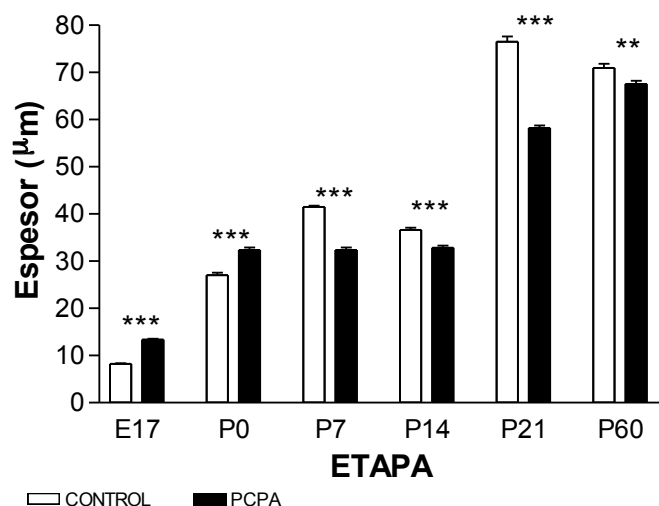


Figura 5.- Espesor de tejido epitelial de la papila caliciforme de animales control y tratados con pCPA. Se muestra $\bar{X} \pm E.E.$ de 5 papilas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

la papila caliciforme no está del todo entendida, el presente trabajo apoya la hipótesis de que la serotonina participa como factor trófico durante la ontogenia de la papila caliciforme, así mismo, los resultados mostrados en el presente trabajo, también sugieren la existencia de un sistema serotoninérgico inherente al epitelio lingual, al disminuir sensiblemente la concentración de la serotonina durante las etapas clave del desarrollo del sistema gustativo se presentan alteraciones en la plasticidad de este sistema.

Se ha demostrado que la participación de la serotonina en los procesos de desarrollo está ligada a la regulación de la actividad de diversas proteínas y/o expresión de diversos genes, los cuales conducen al desarrollo y diferenciación celular. Por ejemplo, al alterar la vía serotoninérgica el desarrollo del corazón en ratones, se presenta pérdida de la diferenciación celular la cual es acompañada de una reducción en la expresión de los receptores para tirosinasa ErbB-2 (Nebigil *et al.*, 2000). De forma complementaria, se ha descrito que al bloquear la acción de la serotonina en cultivos celulares de mandíbula de embriones de ratón, se presentan malformaciones llevando a la par alteraciones en la expresión de genes como la Tenascina, proteína principal de cartilago y proteínas de unión a calcio (Moisewitsch & Lauder, 1997). En el caso de los animales administrados con PCPA los resultados mostraron alteraciones en los procesos de desarrollo y diferenciación celular en la papila, lo cual se observa con la reducción del número de corpúsculos gustativos y las alteraciones morfológicas. Estos eventos pueden involucrar cambios en la regulación de la expresión de diversos genes, por ejemplo, la tenascina, receptores para tirosinasa, proteínas de unión a calcio, proteínasas, entre otras.

Eventualmente será importante determinar qué tipo de receptores serotoninérgicos participan en el desarrollo de la papila caliciforme, así como, describir las posibles alteraciones en la expresión y/o funcionalidad de los posibles receptores implicados y de forma paralela evaluar las posibles modificaciones en la percepción de las diversas modalidades gustativas en los animales que fueron administrados con PCPA.

Referencias

- Bradley, R.M., Cheal, M.L., and Kim, Y.H. (1980) Quantitative analysis of developing epiglottal taste buds in sheep. *J. Anat.* 130: 25-32.
- Butkevich, I.P., Mikhailenko, T.A., Vershinina, A. E., Khozhai, I. L., Grigorev, I., and Alexandrovich, A. V. (2005) Reduced serotonin synthesis during early embryogenesis changes effect of subsequent prenatal stress on persistent pain in the formalin test in adult male and female rats. *Brain Res.* 1042: 144-159.
- 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.
- Cook, H., Anderson, M., and VanderWeele P. (2000) *Pharmacogenetics and the serotonin system: initial studies and future directions.* *Eur. J. Pharmacol.* 410: 165-181.
- Fiorica-Howells, E., Maroteaux, L., and Gershon, M. (2000) *Serotonin and The receptor 5-HT2B 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 Dev.* 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
- Health, P.,** Melichar K., Nutt, D., Melichar, K., (2006) Human Taste Thresholds are Modulated by Serotonin and Noradrenalin. *J Neurosci.* 49: 12664-12671.
- 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.
- Krimm, R.** (2007) Factors that regulated embryonic gustatory development. *Neuroscience*, 8:180-198.
- Mercado, C. R.,** Hernandez J. (1992) *A molecular recognizing system of serotonin in rat fetal axonal growth cones: uptake and high affinity binding.* *Develop. Brain Res.* 69: 133-137.
- Moiseiwitsch, J.R.,** and Lauder, J.M. (1997) Regulation of gene expression in cultured embryonic mouse mandibular mesenchyme by serotonin antagonists. *Anat. Embryol.* 195:71-78.
- Moore, W. T.** and Hampton, J.K. (1974) *Effects of Para-Chlorophenylalanine on pregnancy in the rat.* *Biology of reproduction*, 11: 289-287.
- Nabigil, C.,** Choi D-S, Dierich, A., Hickel, P., Le Meur, M., Messaddeq, N., Launay J-M., and Maroteaux, L. (2009) serotonin 2B receptor is required for heart development. *PNAS.* 17: 9508-9513.
- 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.
- Roper, S. D.** (2006) Cell communication in taste buds. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 1494-1500.
- Sugita, M.** (2006) Taste perception and coding in the periphery. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 2000-2015.
- Suzuki, T.** (2007) Cellular Mechanism in taste buds. *Bull Tokyo Dent.* 45: 151-161.
- 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. Boughter 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.
- Zuker, S.C.,** Ryba, J.P., and Chandrasekar, J. (2006) The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, 444:288-296.