



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**ANÁLISIS DE LA ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA GUSTATIVO MEDIANTE LA TÉCNICA  
DE C-FOS EN EL NÚCLEO DEL TRACTO SOLITARIO ROSTRAL DE RATAS E N  
DESARROLLO**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PRESENTA:**  
**MARIA DIANA LORENA RUBIO NAVARRO**

**DIRECTOR DE TESIS**  
**DR. MANUEL SALAS ALVARADO**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**MÉXICO, D. F. MAYO 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo que me brindo para realizar estudios de Doctorado en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Autónoma de México. Número de becario:  
171332

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Melitón Rubio y María de los Ángeles Navarro<sup>†</sup>, mamá gracias por brindarme la oportunidad.

A mi esposo, Jesús Edgar Sánchez Navarrete, gracias por tu apoyo incondicional y tu amor.

A mis hijas, Ángela Regina Sánchez Rubio y Frida Sofía Sánchez Rubio, por todo el tiempo que les he restado, su alegría, tantos besos y abrazos.

A mis hermanos, Saúl Rubio Navarro, Roberto Melitón Rubio Navarro, Ana Luz Rubio Navarro, por tantos momentos lindos.

A la familia, Sánchez Navarrete, por su comprensión y apoyo incondicional.

A mis amigos de toda la vida.

A mis compañeros de laboratorio.

A mis compañeros de Maestría y Doctorado.

Al Dr. Manuel Salas a Carmelita, por acompañarme en esta aventura, no sólo por apoyo en mi formación académica, también por su invaluable aprecio y tanto amor.

A Mire, por su gran ayuda e invaluable amistad.

## **AGRADECIMIENTOS.**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Neurobiología y al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, por brindarme sus riquezas y la oportunidad de continuar con mi formación profesional.

Al Dr. Manuel Salas Alvarado, por su paciencia, enseñanzas, apoyo, confianza y su amistad.

A los miembros de mi Comité Tutor, Dra. Teresa Morales Guzmán y Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina. Gracias por todas las aportaciones a este trabajo de investigación y sobre todo a mi formación profesional.

A los miembros del jurado, que revisaron esta tesis: Gracias por sus valiosos comentarios y aportaciones a este trabajo de investigación.

Agradezco el apoyo recibido por el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México para realizar una estancia de investigación en el departamento de Biología Celular y Fisiología, en especial agradezco al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina por su valiosa ayuda en la implementación de la técnica de doble inmunomarcaje.

Agradezco el apoyo recibido por la East Tennessee State University para realizar una estancia de investigación en el Quillen College of Medicine, en especial a la Dra. Teresa Harrison por su valiosa ayuda y asesoría técnica.

Agradezco la ayuda y asesoría técnica de las siguientes personas y Unidades de apoyo Académico del Instituto de Neurobiología, M en C. Mirelta Regalado Ortega, Enf. Carmen Torrero Solorio, Ing. Elsa Nydia Hernández, M. V. Z. Martín García Servín, Biol. Lorena López Sánchez, Dra. Dorothy Pless, Sra. Carmen Vázquez y M. en C. Leonor Casanova.

Agradezco el apoyo de la Dra. Aurea Orozco por su valioso apoyo durante mi egreso del programa.

Agradezco el apoyo de PAPIIT IN200413 e IN207310-22 y al CONACyT por la beca que me otorgó (No. 171332) y PAEP por el apoyo económico al proyecto (No. Cuenta 503001915).

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
El sistema gustativo en el modelo de la rata .....	8
1.1 Respuestas a sustancias sápidas de la rata en desarrollo .....	10
1.2 Organización periférica del sistema gustativo.....	17
1.3 Receptores gustativos y transducción de señales gustativas .....	20
1.4 Desarrollo de las papilas gustativas.....	22
1.5 Codificación de la información gustativa .....	24
1.6 Organización anatómica de la vía gustativa en el SNC .....	27
1.7 Tipos neuronales en el NTSr .....	29
1.8 Desarrollo electrofisiológico del NTSr .....	32
1.9 Neurotransmisores en el NTS.....	35
1.9. 1 Papel de GABA en el procesamiento de la información gustativa.....	37
<b>CAPÍTULO II</b>	
Generalidades de la expresión de c-fos .....	40
2.1 c-Fos y la activación neuronal.....	41
2.2 Organización topográfica de las respuestas gustativas en el NTSr .....	42
<b>CAPÍTULO III</b>	
Desarrollo del trabajo de investigación.....	50
3.1 Planteamiento del problema .....	50
3.2 Hipótesis .....	52
3.3 Objetivos .....	52
3.4 Materiales y Métodos.....	54

3.4.1 Animales .....	54
3.4.2 Tratamiento con sustancias sápidas .....	54
3.4.3 Obtención de las muestras .....	55
3.4.4 Inmunohistoquímica para c-Fos .....	56
3.4.5 Doble inmunohistoquímica c-Fos/GAD67 y c-Fos/TH. ....	57
3.4.6 Cuantificación de la inmunoreactividad a c-Fos. ....	57
3.4.6 Análisis estadístico.....	58

## **CAPÍTULO IV**

Resultados .....	59
4.1 Ubicación del NTSr con Nissl.....	59
4.2 Tiempo de separación de la madre.....	59
4.3 Concentración de quinina .....	60
4.4 Distribución general de c-fos en el eje rostro caudal del NTSr en respuesta a los estímulos gustativos .....	65
4.4.1 Distribución específica en los diferentes niveles del NTSr en respuesta a la aplicación de quinina .....	66
4.4.2 Distribución específica en los diferentes niveles del NTSr en respuesta a la aplicación de sacarosa .....	67
4.4.3 Distribución específica en los diferentes niveles del NTSr en respuesta a la aplicación de NaCl .....	67
4.4.4 Distribución específica en los diferentes niveles del NTSr en respuesta a la aplicación de agua .....	68
4.5 Distribución general de c-fos en el eje medio lateral del NTSr en respuesta a los estímulos gustativos .....	71
4.5.1 Distribución específica en los diferentes subcampos del NTSr en respuesta a la aplicación de quinina.....	71
4.5.2 Distribución específica en los diferentes subcampos del NTSr en respuesta a la aplicación de sacarosa.....	72
4.5.3 Distribución específica en los diferentes subcampos del NTSr en respuesta a la aplicación de NaCl y agua.....	72
4.6 Colocalización de c-Fos/GAD 67 .....	75

4.7 Colocalización de c-Fos/TH .....	76
<b>CAPÍTULO V</b>	
Discusión.....	78
<b>CAPÍTULO VI</b>	
Conclusiones.....	86
<b>CAPÍTULO VII</b>	
Referencias .....	87
<b>ANEXOS</b>	
1.- Publicaciones producto del presente trabajo de investigación.....	114
2.- Presentaciones a Congresos Nacionales e Internacionales.....	115

## **RESUMEN**

La modulación del proceso gustativo en el tallo cerebral involucra a diferentes núcleos entre ellos el núcleo del tracto solitario. La ubicación precisa y las características específicas de las neuronas de esta estructura han sido descritas previamente, sin embargo, analizar las neuronas activadas por estímulos sápidos en la porción rostral del núcleo del tracto solitario (NTSr) en ratas crías, es una oportunidad para evaluar la maduración de mecanismos involucrados en la respuesta gustativa. En este estudio se analizó el efecto de la estimulación gustativa en el NTSr en ratas en desarrollo mediante la técnica inmunohistoquímica de c-Fos. Ratas macho de 5, 15 y 25 días de edad fueron aisladas de la madre por 12 h; después fueron estimuladas intraoralmente con agua como solución control, quinina, sacarosa o NaCl, y sacrificadas 90 min después. El grupo estimulado con agua mostró una mínima inmunoreactividad c-Fos (IRF) comparada con los grupos estimulados con sacaros y quinina, que mostraron mayor IRF en el NTSr en las diferentes edades analizadas. En todas las edades analizadas la quinina indujo mayor IRF en el subcampo medial del núcleo, mientras la sacarosa indujo mayor IRF en el subcampo lateral del NTSr. La intensidad de la IRF ambos grupos quinina y sacarosa fue mayor a la edad de 15 días y declinó a los 25 días. Estos resultados proveen bases anatómicas sobre la activación del NTSr que involucra la ingesta temprana de los alimentos y la capacidad de aprendizaje de los recién nacidos.

Palabras clave: sistema gustativo, desarrollo, núcleo del tracto solitario.

## **ABSTRACT**

Modulation of the gustatory process at the brainstem involves several neurochemical systems. The precise location and specific characteristics of taste neurons activated by sapid stimuli in the nucleus of the solitary tract (NTS) in pup rats is an opportunity to analyze the development of mechanism involved in the early gustatory response. The impact of the gustatory stimuli on the rostral portion of the nucleus of the solitary tract (rNST) was investigated in developing rats, by using c-fos immunohistochemical staining. Wistar male rats of 5, 15, and 25 days of age were isolated from the mother for 12 h, then stimulated via the intraoral route with quinine, sucrose, or NaCl, and sacrificed 90 min later. The water-stimulated group showed minimal c-Fos-like immunoreactivity (FLI) compared with quinine and sucrose that exhibited different FLI in the rNST at the different ages. At all ages the quinine-stimulated group induced FLI in the medial subfield, while sucrose induced FLI in the lateral subfield of the rNST. The intensity of FLI in groups, quinine and sucrose was highest at P15, and it declined at P25. These findings provide detailed insight into the anatomical basis of rNST activation that is involved in early food intake and the learning capacity of the newborn.

Keywords: taste system, development, nucleus of the solitary tract.

## **INTRODUCCIÓN**

El sistema gustativo detecta señales no volátiles en el medio ambiente y está involucrado principalmente en la conducta de ingesta de alimento, permitiendo al animal aceptar sustancias nutritivas y evitar sustancias tóxicas (Wang y col., 2004; Sugita y Shiba, 2005). Las células gustativas expresan distintos tipos de receptores gustativos, entre los cuales se encuentran los receptores que son activados por sustancias químicas (vgr. el glicerol, los azúcares, la sacarina, entre otros que en el ser humano están relacionados con sabores dulces), que generan conductas de aceptación o agrado y los receptores activados por otra clase de sustancias químicas (vgr. la quinina, la estricnina, la leucina, etc, que en el ser humano están relacionados con sabores amargos), que provocan conductas de rechazo o desagrado. Estas conductas de aceptación y rechazo de estímulos sápidos ya están presentes al momento de nacer.

Las células gustativas son inervadas por el nervio facial (VII), el nervio glossofaríngeo (IX) y el nervio vago (X), estos nervios son los encargados de llevar la información gustativa de la cavidad oral hacia la porción rostral del núcleo del tracto solitario (NTSr) ubicado en el tallo cerebral (Rubio y col., 2004). Estudios de marcaje neuronal muestran que los campos terminales de los nervios VII, IX y X llegan de manera organizada al NTSr, es decir, las ramas del nervio VII llegan a las zonas más rostrales del NTSr y las ramas de los nervios IX y X alcanzan zonas más caudales del núcleo. Por otro lado, hay evidencia que muestra que esta organización no está

completamente segregada y en algunas zonas incluso se sobreponen los campos terminales de los nervios aferentes en el NTSr (Travers y Nicklas, 1990; Lindemann, 2001).

Estudios electrofisiológicos realizados en el NTSr muestran que la mayoría de las neuronas distribuidas en esta estructura responden a distintos estímulos sápidos como la sacarosa, la quinina y el NaCl, sin embargo, hay neuronas que responden específicamente a la sacarosa, otras que responden predominantemente a la quinina y están distribuidos en la zona medio lateral del núcleo. Sin embargo, estos resultados no permiten establecer una relación clara entre la ubicación y/o el tipo neuronal con el estímulo sávido aplicado (Renehan y col., 1996).

En el sistema gustativo hay información disponible que sugiere un arreglo topográfico (Harrer y Travers, 1996, Travers y Hu 2000 y Travers 2002). A este tipo de organización en el Sistema Nervioso Central (SNC) se le ha denominado representación topográfica, ya que atiende a la ubicación y distribución de los receptores sensoriales en la periferia. Actualmente, se acepta que en los mamíferos la organización topográfica es esencial para la discriminación sensorial (Kaas, 1997) y que estos patrones emergen gradualmente durante el desarrollo cerebral (Constantine-Paton y Law, 1982; Katz y Shatz, 1995; Tessier- Lavigne y Goodman, 1996).

Por otro lado, la inducción de c-fos un gen de expresión temprana ha sido usada en diferentes vías sensoriales como marcador para determinar la ubicación y distribución

anat6mica de neuronas que responden a un est6mulo espec6fico (Sagar y col., 1988; Sheng y Greenberg, 1990; Morgan y Curran, 1991; Mack and Mack, 1992; Harrer y Travers, 1996; Melzer y Steiner, 1997; Travers, 2002; Chan y col., 2004).

La inmunohistoqu6mica para detectar la prote6na c-Fos en el sistema gustativo, muestra un patr6n de inmunoreactividad distinto para la quinina y la sacarosa en el NTSr. Despu6s de la aplicaci6n de sacarosa se observa mayor inmunoreactividad en las zonas laterales, mientras que el est6mulo de quinina induce mayor inmunoreactividad en las zonas mediales, lo que sugiere cierto arreglo topogr6fico que representa las cualidades del est6mulo (dulce y amargo), que puede estar relacionado con circuitos involucrados en las respuestas de aceptaci6n y rechazo (Harrer y Travers, 1996; Travers y Hu 2000; Travers, 2002).

Hasta el momento se desconoce el tipo celular de las neuronas que expresan c-Fos en el NTSr asociado a est6mulos s6pidos, se conoce que las neuronas ovoides forman el 49% del total de las neuronas del NTSr, el resto est6 formado por neuronas fusiformes y multipolares. Se ha descrito por diferentes estudios que las neuronas fusiformes y multipolares son encargadas de proyectar a los siguientes relevos de la v6a (el n6cleo parabraquial y n6cleos del tallo cerebral) y que las neuronas ovoides no proyectan a otras zonas (Davis y Jang, 1988; Lasiter y Kachele, 1988; Whitehead, 1988; King y Hill, 1993). Por sus caracter6sticas morfol6gicas y por estudios de marcajes retr6grados se ha reconocido que el NTSr contiene interneuronas que participan en la actividad de los circuitos locales (Norgren, 1978; Lasiter y Kachele, 1988; Travers, 1988; Whitehead,

1990; Beckman y Whitehed, 1991; Davis, 1993). Por otra parte, la inmunoreactividad para la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD67), necesaria para la síntesis de ácido gama amino butírico (GABA), muestra que las neuronas inmunoreactivas a GAD67 son de soma pequeño (80-120  $\mu\text{m}$ ), que corresponde con la morfología de las neuronas ovoides, característica de las interneuronas en el NTS (Leonard y col., 1999). Lo anterior sugiere que posiblemente las neuronas GABAérgicas tengan un papel importante en la integración de la información en el NTSr y que probablemente la activación de neuronas por estímulos gustativos pueda incluir a neuronas de tipo GABAérgico.

Por otra parte, las neuronas que expresan TH (tirosina hidroxilasa limitante en el metabolismo de las catecolaminas) están presentes al momento de nacer y se distribuyen en el NTS, sugiriendo que ellas puedan recibir entrada de los nervios craneales y contribuir en la modulación de la información en la vía gustativa del SNC. Aunque actualmente se desconoce la participación de este tipo neuronal en el procesamiento de estímulos sápidos en el NTSr de ratas jóvenes (Beverly y Bockstaele, 2006).

A pesar de estos antecedentes sobre la organización topográfica en el sistema gustativo adulto, no se ha determinado aún si este patrón de activación neuronal del NTSr inducido por estímulos sápidos emerge durante el desarrollo, o ya está presente al momento de nacer. Así, en la primera fase de este trabajo, se pretende establecer el protocolo de estimulación y detección de la proteína c-Fos como indicador de

activación neuronal en animales en desarrollo, para determinar si este patrón de marcaje neuronal en ratas adultas está presente al nacimiento o si se reorganiza y refina durante el desarrollo. Por otra parte, es desconocido el tipo neuronal activado por estímulos sápidos en el NTSr, para lo cual se realizaron dobles inmunomarcajes con el objetivo de establecer la participación de las neuronas GABAérgicas y catecolaminérgicas asociada a la aplicación de estímulos sápidos durante el desarrollo temprano de la rata.

## **CAPÍTULO I**

### **El sistema gustativo en el modelo de la rata**

Las crías de especies altriciales nacen en un ambiente en el que dependen fundamentalmente de los cuidados maternos debido a su notable inmadurez. Así, regulan pobremente su temperatura, su locomoción es reducida, sus ojos y oídos están aún cubiertos por membranas que reducen la entrada de estímulos sensoriales. Sin embargo, cuentan con sistemas que son relativamente funcionales al nacer, como lo son el somatosensorial, el olfatorio y el gustativo, que les permite interactuar con su madre para satisfacer sus necesidades básicas primarias (Brake y col., 1982; 1982a).

La reacción inicial de los mamíferos al nacer es oler o probar sustancias disponibles en el contexto de la succión y es fundamental para establecer vínculos con la madre y promover futuros contactos (Menella y Beauchamp, 1996). En la rata recién nacida la madre es la única fuente de alimento y agua para el neonato durante los primeros días, lo provee tanto de alimento como de líquido por medio de la succión a través de la leche. Cuando la cría se aproxima a la etapa del destete (alrededor de los 15 días), sucede una etapa de transición, la cría depende menos de la madre y comienza a tener experiencia del medio para probar fuentes alternas de nutrimentos como los restos de los perdigones del alimento de la madre, el aserrín y las heces fecales. Finalmente, para los 25 días de edad ocurre el destete y la cría muestra la conducta de ingesta adulta (Schwartz y Grill, 1985).

La leche del ser humano y la leche de otros mamíferos, es rica en sabores que reflejan directamente los alimentos y especias consumidas por la madre y sus atributos sensoriales contribuyen al patrón y duración de la succión de la cría y en esta etapa es la principal fuente de experiencia a los sabores (Menella y Beachamp, 1996). El sabor es un determinante importante en la conducta de ingesta de los mamíferos, junto con las variaciones fisiológicas y la experiencia (las conductas de ingesta aprendidas luego de sus consecuencias postingestivas durante el desarrollo), por lo que conforme el animal madura, su sistema nervioso se desarrolla y debe organizarse para lograr efectivamente la integración de estos factores, que le permitan mostrar una conducta de ingesta adulta necesaria para su supervivencia.

Con base en lo anterior, la ingesta de un alimento depende del sabor, se denomina habitualmente gusto o sabor a una sensación compleja provocada no solo por la excitación de los receptores gustativos, sino también por la activación de los receptores somatosensoriales y del olfato. En una situación natural, el olfato y el gusto son inseparables de la percepción orosensorial de una sustancia con sabor, por lo tanto, una consideración separada de estos sistemas es en cierta medida artificial, sin embargo, los estímulos que desencadenan los mecanismos responsables de la percepción de los sabores, pueden ser específicos y manipulados en ciertas situaciones experimentales que permiten analizar sus efectos en modelos animales como la rata (Menella y Beauchamp, 1996). El modelo animal de la rata ha sido ampliamente utilizado en las últimas décadas para estudiar la conducta de ingesta, por lo que existe mucha literatura al respecto en esta especie y la mayor parte de estudios

respecto al control de la conducta de ingesta de animales neonatos se ha realizado en ratas pre y post destete, por lo que la rata es el modelo ideal para analizar los mecanismos que subyacen la conducta de ingesta de ratas en desarrollo.

En la rata, la cualidad gustativa de un alimento es importante para determinar si ingiere o rechaza un alimento, a pesar de que cualquier alimento es un estímulo químico complejo y tiene propiedades sensoriales de olor, textura, temperatura y sabor, la respuesta a dicho estímulo está influenciada tanto por el estado interno del sujeto como por sus experiencias. En el presente documento el estado interno y factores como la experiencia se mantuvieron constantes, por lo que las respuestas observadas reflejan principalmente la respuesta de un estímulo químico (sápido) y se restringe el estudio al análisis de la participación de la vía gustativa.

### **1.1 Respuestas a sustancias sápidas de la rata en desarrollo**

El sistema gustativo detecta estímulos químicos no volátiles aplicados sobre el dorso de la lengua; actualmente se han descrito cinco clases de sensaciones gustativas que se asume representan las cinco categorías perceptuales de los sabores primarios en el ser humano: dulce, amargo, ácido, salado y umami; esta clasificación ha dictado los estímulos gustativos que se han elegido para examinar la sensibilidad gustativa de la rata; ejemplos clásicos de las estímulos químicos que han sido ampliamente utilizados tanto en seres humanos como en modelos animales, son sacarosa, quinina, ácido cítrico, cloruro de sodio (NaCl) y glutamato monosódico respectivamente. En la rata se ha estudiado la respuesta a estos estímulos químicos, para determinar cómo cada

categoría produce respuestas distintas en la vía gustativa tanto en ratas adultas como en las neonatas (Yamamoto y col., 1998; Travers, 2002; Lindemann, 2001).

Estudios previos han utilizado diversas aproximaciones para evaluar la respuesta asociada a un estímulo gustativo en ratas adultas. Así, Grill y Norgren en 1978 desarrollaron un procedimiento en el que una solución sávida era colocada directamente sobre la cavidad oral, y se registraban las expresiones faciales y motoras generales producidas; estas conductas proporcionan una medida del comportamiento inmediato inducido por el estímulo gustativo, son fáciles de cuantificar y proveen una medida directa tanto de la ingestión como de la aversión.

Las respuestas que se observan luego de la aplicación de un estímulo sávido sobre el dorso de la lengua son muy variadas en la rata adulta, y comprenden entre otras movimientos rítmicos de la boca de baja amplitud (6.6 Hz), movimientos rítmicos y salientes de la lengua que se extienden más allá del plano de los dientes incisivos en la línea media (8.8 Hz), movimientos laterales de la lengua que se extienden hacia ambos lados de la boca con una duración de 85-215 milisegundos, apertura de la boca de gran amplitud acompañados por retracción de las comisuras bucales que duran aproximadamente 116 milisegundos, fricción de la boca y la zona de la barbilla contra la superficie de la cámara de ensayo, temblor de las extremidades anteriores, movimientos activos de las patas delanteras, movimientos laterales de la cabeza (60Hz) y goteo del estímulo colocado en la boca en ausencia de cualquier otro movimiento observable (Grill y Norgren, 1978).

En la rata recién nacida se han evaluado los reflejos gustofaciales, que consisten en una respuesta inmediata producida por un estímulo gustativo colocado en el dorso de la lengua, que provoca al menos 3 reflejos gustofaciales (RGF). Así, una gota de 8  $\mu$ l aplicada en la superficie de la lengua induce apertura rítmica de la boca, lamido de los labios y movimientos de la lengua, lo que sugiere una reacción de agrado. Por el contrario, la aplicación de un estímulo ácido o amargo provoca retiramiento de la cabeza, torsión del cuello, movimientos activos de la lengua y apertura de la boca, lo que se asocia a una reacción de desagrado. En cambio, un estímulo salado causa una respuesta intermedia a las antes mencionadas que se asemeja a la conducta que se genera por la aplicación de agua (Steiner, 1979; Rico y col., 2003, Salas y col., 2012). Estas respuestas aparecen en la rata recién nacida aún sin que haya tenido experiencia previa a los estímulos sápidos, lo que permite suponer que al nacer ya estén funcionando al menos tres mecanismos motores en la manifestación de la conducta de ingesta, a pesar de no haber alcanzado aún su pleno desarrollo (Hall y Bryan, 1980; Vigorito y Sclafani, 1988; Schwartz y Grill, 1985; Johanson y Shapiro, 1986).

Estudios previos mostraron el desarrollo de estas conductas, en ratas de 10 días de edad por la aplicación de sacarosa mediante un catéter intrabucal, que genera movimientos rítmicos en la apertura de boca, con pocos movimientos de extremidades y mayor consumo de la sustancia sávida; mientras que la aplicación de quinina produce apertura acelerada de la boca, movimientos bruscos de cabeza y extremidades y menor consumo de la sustancia sávida (Johanson y Shapiro, 1986).

A la edad de 15 días la rata muestra el pico de preferencia por sacarosa y aumenta la aversión por estímulos amargos, las respuestas de ingesta y los RGF son proporcionales a la concentración de los estímulos utilizados. No es sino hasta la edad de 25 días en que la respuesta a la sacarosa es similar a la del adulto, y para el caso del NaCl las ratas de 3 y 6 días no generan un RGF claro, sin embargo, se conoce que ingieren mayor cantidad de agua sola, que agua con NaCl. Por otra parte, a los diez días de edad se observa cierta preferencia por el NaCl comparado con el agua (Jacobs y Sharma, 1969) y su preferencia aumenta tres veces más, comparada con la preferencia de un adulto en relación al agua. Finalmente en edades más avanzadas (48 días) el NaCl produce aversión en concentraciones altas (Jacobs y Sharma, 1969; Hall y Bryan, 1980; Kehoe y Blass, 1985). Las diferencias reportadas en la percepción del dulce en ratas pequeñas pueden deberse a que el mecanismo neural de la conducta de succión está funcionando bastante bien al nacer, mientras que los componentes que controlan la ingesta independiente aún son inmaduros en la rata recién nacida y se van consolidando en las etapas tempranas de desarrollo.

Estudios previos utilizaron un modelo de implantación de una cánula intraoral en ratas crías con la intención de evaluar la aceptación o rechazo de una sustancia sávida durante el desarrollo, a través de la cánula se liberan diferentes estímulos sápidos mientras succionan las crías, la aplicación de sabores dulces produce una mayor ingesta, pasan mayor tiempo succionando y con mayor frecuencia comparada con el agua, y hacia los 6 días de edad muestran una clara discriminación entre estas sustancias; lo que da evidencia de que a las pocas horas del parto las crías muestran

preferencias por sabores dulces, (Hall y Bryan, 1980; Vigorito y Sclafani, 1988; Johanson y Shapiro, 1986). Por el contrario las ratas de 5 días pasan considerablemente menos tiempo en el pezón de una madre anestesiada cuando se libera quinina a través de la cánula que cuando se aplica agua (Kehoe y Blass, 1985). En este mismo contexto, ratas de 11-13 días de edad rechazan fluidos que contienen quinina alejándose del pezón y/o disminuyendo el tiempo y frecuencia de la succión (Pelchat y Brake, 1987).

En 2000 Petrov y col., diseñaron un pezón artificial con la intención de que los estímulos llegaran a la cría de una forma más natural que a través de cánulas, con esto observaron que ratas neonatas, con pocas horas de haber nacido y antes de que tuvieran alguna experiencia de succión son capaces de detectar propiedades gustativas de un fluido disponible a través de un pezón artificial, y modifican su patrón de succión dependiendo del estímulo (Nizhnikov y col., 2002). La fijación al pezón y la ingestión a través de un pezón que contienen quinina fue considerablemente menor que la de un pezón que provee agua, mientras que la aplicación de sacarina a través de pezón artificial aumenta el tiempo de fijación al mismo, la ingesta de sacarina excede significativamente a la ingesta de agua, en animales que nacieron por cesárea y evaluados a las 3 ó 5 horas de nacer y animales de 1 ó 2 días de edad nacidos por parto y que tuvieron experiencia de succión láctea (Petrov y col., 2001).

Estos datos sugieren que la rata recién nacida posee la habilidad para detectar propiedades gustativas de los estímulos aplicados. Con este fundamento, se acepta

que las crías tienen un amplio rango de respuestas que utilizan para aceptar sustancias agradables o para rechazar sustancias aversivas, y que estas respuestas, se van refinando durante el desarrollo. Entre ellas puede mencionarse la expresión facial, expresión corporal, sujetarse o retirarse del pezón materno, disminuir o aumentar la frecuencia, tiempo y fuerza de la succión, y la selección del consumo de sustancias (ver Tabla 1) (Brake y col., 1982).

Por lo tanto, el sistema gustativo en la rata recién nacida es importante para ingerir nutrimentos o evitar sustancias tóxicas, los experimentos conductuales mencionados anteriormente muestran que el sistema gustativo de la rata al nacer y sin amplia experiencia gustativa es funcional ya que tiene la capacidad de discriminar entre sacarosa, quinina, agua y que los patrones conductuales se van modificando durante el desarrollo. Estos paradigmas han sido exitosamente aplicados para investigar la ontogenia de las preferencias y las respuestas a los diferentes sabores (Hall y Blass, 1977; Hall, 1979).

<b>Tabla 1. Cambios en la conducta de ingesta de sustancias sápidas con la edad en la rata</b>					
<b>Edad (días)</b>	<b>Especie</b>	<b>Respuesta conductual a la</b>	<b>Respuesta conductual</b>	<b>Respuesta conductual a la quinina</b>	<b>Referencias</b>
G 80-110	oveja	Aumenta la conducta de deglución	Sin cambio	Disminuye la deglución	Bradley y Mistretta 1975
Recién nacido (P0)	rata	Muestra el RGF característico a sabores dulces, Apertura rítmica de la boca, se lame los labios y mueve la lengua	Con relación a la respuesta de sacarosa la sensibilidad por las sales está disminuida, la RGF es intermedia entre la sacarosa y la quinina	El RGF a los sabores amargos es evidente, al aplicar quinina, se lleva las extremidades a la zona orofacial, retracción de la cabeza, torsión del cuello, movimientos activos de la lengua y apertura de la boca	Steiner, 1979, Rico, 2003
P 3-6	rata	Aumenta la ingesta de sabores dulces (sacarosa) versus agua	Mayor ingesta de agua comparada con solución acuosa de NaCl	Al inyectar quinina en el conducto galactóforo la rata se retira del pezón	Kehoe y Blass, 1985
P 7-9	rata	Pico de preferencia de la sacarosa. Al inyectar sacarosa en el conducto galactóforo la rata aumenta el tiempo de fijación y succión al pezón	Aumenta la preferencia por el NaCl	Discrimina entre la sacarosa y la quinina, al inyectar quinina en el ducto galactóforo la rata disminuye la frecuencia y fuerza de succión retirándose del pezón	Jacobs y Sharma, 1969
P 15	rata	La preferencia por sacarosa es proporcional a la concentración	No se reporta	Aumenta la aversión por los sabores amargos	Jacobs y Sharma, 1969, Hall y Bryan, 1980 y Kehoe y Blass 1985.
P 25	Rata	Respuesta a la sucrosa similar a la del adulto	Aumenta tres veces más su preferencia por NaCl comparado con la preferencia de un adulto con relación al agua	No se reporta	Jacobs y Sharma, 1969, Hall y Bryan, 1980 y Kehoe y Blass 1985.
P 48	rata		Aversión por soluciones con alta concentración de NaCl	No se reporta	Brake y col., 1982

## **1.2 Organización periférica del sistema gustativo**

El sistema gustativo en la rata recién nacida es importante para identificar y consumir nutrimentos y evitar toxinas y materiales no digeribles colocados en la cavidad oral. (Wang y col., 2004). El sabor de los alimentos es una experiencia sensorial que combina tanto el gusto como el olfato, sin embargo, en el presente documento se analizarán sólo los efectos de las señales gustativas, que se originan en órganos sensoriales ubicados en la cavidad oral (botones gustativos) y que son generados por moléculas químicas no volátiles que hacen contacto con la zona apical de las células epiteliales de los botones gustativos.

Las células especializadas del sistema gustativo están organizadas en grupos de 50-100 unidades formando una estructura esférica denominada botón gustativo, los botones son estructuras que contienen diversos tipos celulares que interactúan entre sí y con las terminales nerviosas aferentes que llevan la información hacia el sistema nervioso central (SNC), el mecanismo es complejo y aún no está completamente descrito (Harrison, 2011). Sin embargo, se conoce que los botones gustativos están distribuidos sobre la superficie dorsal de la lengua y en la cavidad oral. El botón gustativo tiene en promedio una altura de 70  $\mu\text{m}$  y un diámetro de 40  $\mu\text{m}$ . Un gran porcentaje de botones gustativos se encuentran en la superficie dorsal de la lengua en pequeñas elevaciones denominadas papilas gustativas. Existen 3 tipos de papilas que se han clasificado por su morfología en: papilas fungiformes (Pfu), llamadas así por su forma de hongo y contienen en su parte apical un botón gustativo, están distribuidas en

la parte anterior de la lengua, papilas foliadas (Pfl) están sobre el margen posterolateral y cada una tiene alrededor de 30 crestas paralelas con aproximadamente 100-200 botones gustativos y la papila circunvalada (PC), que se encuentra en la parte posteromedial de la lengua y que contiene de 200-500 botones gustativos (Fig. 1). El resto de los botones están dispersos en el epitelio del conducto nasoincisor, el paladar blando, en la superficie laringe de la epiglotis y la parte superior del esófago (Harada y col., 2000).

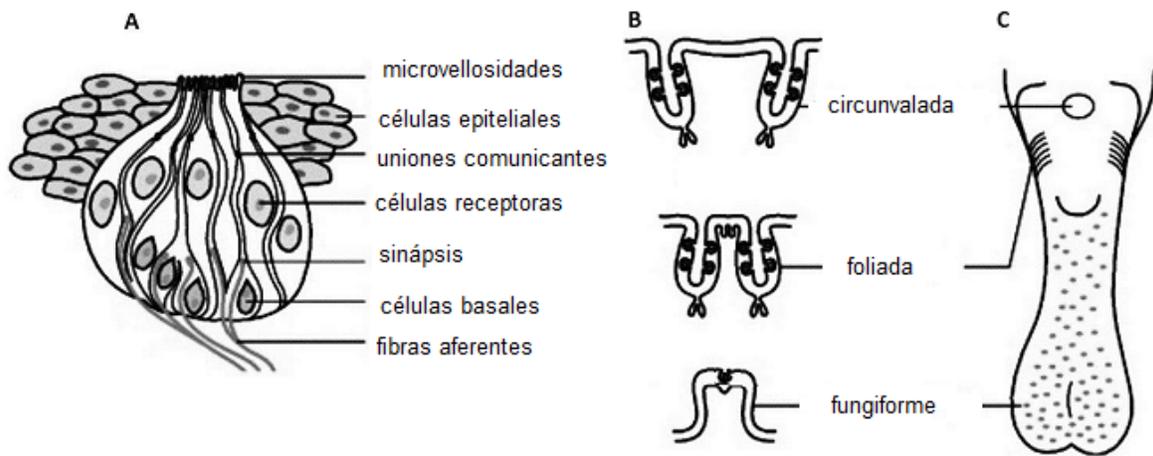


Fig. 1. A. Agrupamiento de las células gustativas en un botón gustativo, B. Representación de la morfología de las papilas gustativas y disposición de los botones gustativos en los distintos tipos de papilas y C. Lengua de rata y ubicación de las papilas gustativas. Modificado de Rubio y col. 2011.

La diversidad de las células en los botones gustativos ha sido clasificada morfológicamente y se han definido cuatro tipos: tipo I, tipo II, tipo III y tipo IV. Las células tipo I son células de soporte, las células tipo IV son células basales, que aparentemente están participando en el recambio celular constante que ocurre

aproximadamente cada 10 días; no obstante, las propiedades de estos tipos celulares no están del todo conocidas. Las células tipo II y III en su morfología son mas grandes con formas circulares y ovales, con procesos que se extienden a la zona apical de poro gustativo. Las células tipo II y las fibras nerviosas aferentes están en estrecho contacto con las células tipo III. El papel de las células tipo II es aún controversial al parece transmiten información a las células tipo III a través de uniones comunicantes (Tipo gap) (Dando y Roper, 2009). Respecto a las células tipo III Murray reportó que son las que forman contactos sinápticos con las terminales nerviosas y por lo tanto son las que generan la salida de información del botón gustativo hacia el SNC (Fig. 2). En mamíferos el neurotransmisor de la mayoría de las células gustativas que forman sinapsis con las terminales nerviosas es la serotonina (Suzuki, 2007).

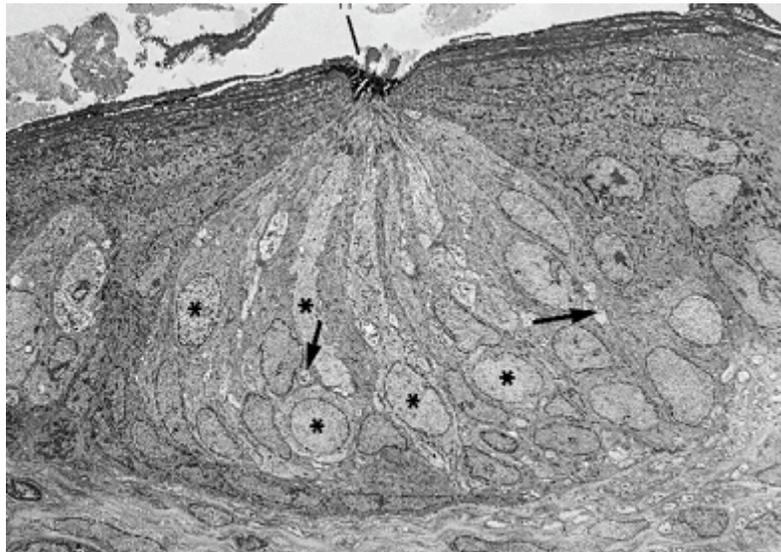


Fig. 2 Micrografía electrónica de un botón gustativo de conejo, se observan células con citoplasma oscuro y claro y la silueta de los nervios (flechas) y los asteriscos señalan las células receptoras modificado de Royer y Kinamon, 1991.

### **1.3 Receptores gustativos y transducción de las señales gustativas**

El comienzo de la transducción quimiosensorial se lleva a cabo en las células gustativas. Los receptores para las sustancias sápidas se localizan en las microvellosidades que emergen de la superficie apical de las células gustativas y que se agrupan en un pequeño orificio del botón gustativo en la superficie de la lengua denominado poro gustativo (Harada y col., 2000).

En un panorama general, los efectos de los estímulos químicos son mediados por los receptores de la superficie celular acoplados a vías de señalamiento intracelular o por la acción directa sobre los canales. Las sinapsis sobre las dendritas aferentes de los distintos nervios craneales se efectúan en la superficie basal de las células receptoras, las vesículas sinápticas en las células gustativas contienen neurotransmisores y neuromoduladores que dependen del aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular para fusionarse con la membrana presináptica y liberar su contenido en la hendidura sináptica. La liberación del neurotransmisor excita las aferentes nerviosas para despolarizar la membrana y generar un potencial de acción, el cual es llevado al primer relevo sináptico en el SNC. (Uga y Hama, 1976; Kinnamon y col., 1985; Yamamoto y col., 1998).

Para sustancias con sabor salado como el NaCl, el  $Na^+$  ingresa a través de canales de  $Na^+$  sensibles a la amilorida, la apertura de canales de  $Na^+$  despolariza la célula, la cual a su vez activa a los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje, dando por resultado la

liberación del neurotransmisor. Los protones que son fundamentalmente responsables de los sabores ácidos también interactúan con canales específicos que despolariza la célula. Los compuestos químicos de sabores dulces, amargo y umami, se une a receptores acoplados a proteínas G (gusducina y transducina), también llamados TRCs, por sus siglas en inglés taste receptor cells (Hoon y col., 1999), y a través de la vía de fosfoinositol aumentan la concentración de IP<sub>3</sub> y produce aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular, lo que da por resultado la liberación del neurotransmisor. Estos receptores son miembros de una familia de diferentes receptores unidos a proteínas G (Adler y col., 2000; Chandrashekar y col., 2000; Matsunami y col., 2000; Conte y col., 2002; Conte y col., 2003).

Los receptores gustativos responsables de los sabores dulces y umami comprenden una gran familia de receptores diméricos con un dominio N-terminal grande llamados T1r1, T1r2 y T1r3, que se expresan en distintas regiones de la lengua, T1r1 se expresa en los botones de la Pfu y muy poco en los botones de la PC. El T1r2 se expresa poco en los botones de la PFu, pero tiene una mayor expresión en los botones de la PC y T1r3 es expresado en botones de ambas papilas (Max y col., 2001). Así se especula que las sustancias dulces son detectadas por el heterodímero T1r2 y T1r3, mientras que el heterodímero formado por T1R1 y T1R3 se unen y funcionan como receptores al glutamato monosódico (sabor umami) (Montmayeur y col., 2001; Bachmanov y col., 2001; Nelson y col., 2001).

Los sabores amargos son detectados por la familia de receptores T2r, estos receptores tiene un amplio rango de sensibilidad, algunos son activados por 2 ó 4 compuestos amargos, mientras que otros son activados por distintos compuestos químicos. Una célula gustativa puede expresar entre 4 a 11 diferentes T2r, lo que en parte, explicaría el amplio rango para detectar sustancias potencialmente tóxicas (Meyerhof y col., 2010). De estudios previos, se sabe que una célula gustativa puede expresar uno o más tipos de receptores gustativos (Nelson y col., 2001; Zhang y col., 2003; Mueller y col., 2005).

#### **1.4 Desarrollo de las papilas gustativas.**

El desarrollo de las papilas gustativas comienza durante la etapa de gestación, en la rata la PC y la PFI inician su formación alrededor del día 14 y 15 de la gestación (Mistretta y Bradley, 1985; Mbiene y Mistretta, 1997). Al día 16 de gestación el epitelio que cubre la lengua se invagina en el mesénquima, y los nervios pueden ser observados en el centro de la papila circunvalada (Mbiene y Mistretta, 1997). En el día 20 de gestación los botones pueden ser identificados morfológicamente y conforme transcurre el desarrollo, el epitelio de la papila va tomando forma, formándose la hendidura que la caracteriza, y así van surgiendo más botones gustativos en esta región (Bradley y Mistretta, 1975; Mistretta y Bradley, 1985).

De manera general la maduración de un botón gustativo se ha establecido morfológicamente cuando se observa un poro en la parte apical; este poro es la

estructura que permite la interacción de las sustancias químicas (contenidas en los alimentos) y los receptores de la célula gustativa. La rata al nacer cuenta con 127 botones gustativos en el paladar blando (PB), de ellos solo el 53% cuenta con poro gustativo. En las Pfu se observaron 110 botones y solo el 12% con poro gustativo, el número se incrementa y alcanza un nivel estable con aproximadamente 200 botones tanto en el PB como en la PFu, y en la primera semana de edad cuentan con el 90% y el 80% de los botones gustativos maduros respectivamente, lo que indica que la maduración de estas papilas esta casi completa en la primer semana de edad (Harada y col., 2000).

Por otra parte, se observan pocos botones gustativos con poros al momento de nacer en las PFI y PC, durante la primera semana la PFI y PC alcanzan alrededor de 100 botones gustativos. Su desarrollo continúa de forma acelerada hacia la segunda semana del nacimiento con el 52% de los botones con poro gustativo, y la PC con cerca del 68% de sus alrededor de 200 botones con poro gustativo. El número se incrementa de forma continua hasta alcanzar aproximadamente 400 botones en la semana cuatro, lo que muestra que la maduración de los botones gustativos del PB y PFu precede al desarrollo de los botones gustativos de la PC y PFI. (Fig. 3) (Harada y col., 2000).

Es indiscutible que en etapas tempranas del neonato ocurre la mayor y más rápida adición de botones gustativos (Hosley y Oakley, 1987; Oakley, 1991). Lo que sugiere

que los cambios de la conducta de ingesta observados en las primeras semanas de vida, pueden relacionarse al menos en parte con el desarrollo de las papilas y sus botones gustativos.

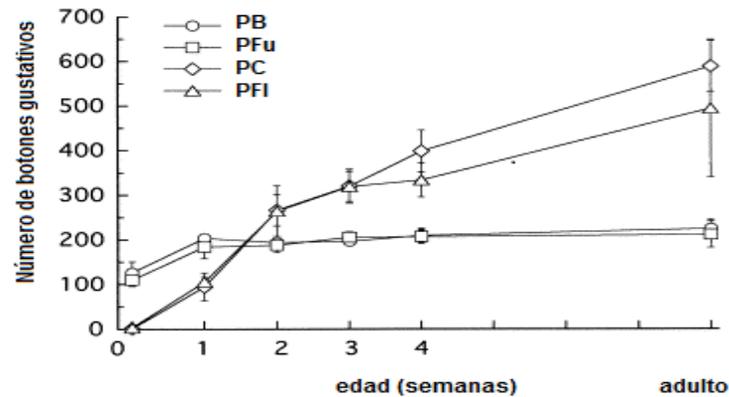


Fig. 3. Número de botones gustativos localizados en el paladar blando (PB), papila fungiforme (PFu), papila circunvalada (PC) y papila foliada (PFI). (Modificado de Harada y col., 2000).

### 1.5 Codificación de la información gustativa

Los cambios de las conductas desencadenadas por estímulos gustativos durante el desarrollo, dependen tanto de eventos morfogenéticos que caracterizan la aparición y maduración de los botones, como de los cambios que se presentan en los elementos neurales aferentes. La codificación de la información gustativa, se refiere a cómo la información acerca de la identidad y concentración de la sustancia sávida, está representada en los patrones de potenciales de acción que son transmitidos hacia el SNC (Hamilton y Norgren, 1984).

Las fibras aferentes responsables de llevar la información de los botones gustativos hacia el SNC son: la cuerda del tímpano (CT) que inerva los botones de las PFu en la zona anterior de la lengua y las PFI ubicadas en la parte posterolateral de la lengua; el nervio petroso superficial mayor (GSP) que inerva botones del PB, del ducto nasoincisor y el órganos de geschmckstreifen. Los cuerpos celulares de las fibras de la CT y el GSP están en el ganglio geniculado, el cual está localizado en la bula timpánica. El nervio glossofaríngeo que inerva la PC y una porción de las PFI ubicadas en la zona posterior de la lengua, tiene sus cuerpos celulares en el ganglio petroso, localizado en el borde medial de la bula timpánica, los tres nervios envían las fibras de su porción distal de forma ipsilateral al núcleo del tracto solitario (Whitehead y Frank, 1983, Hamilton y Norgren, 1984, Harada y col., 1997 y Krimm y Hill, 1997, Carleton y col., 2010) (Fig.4).

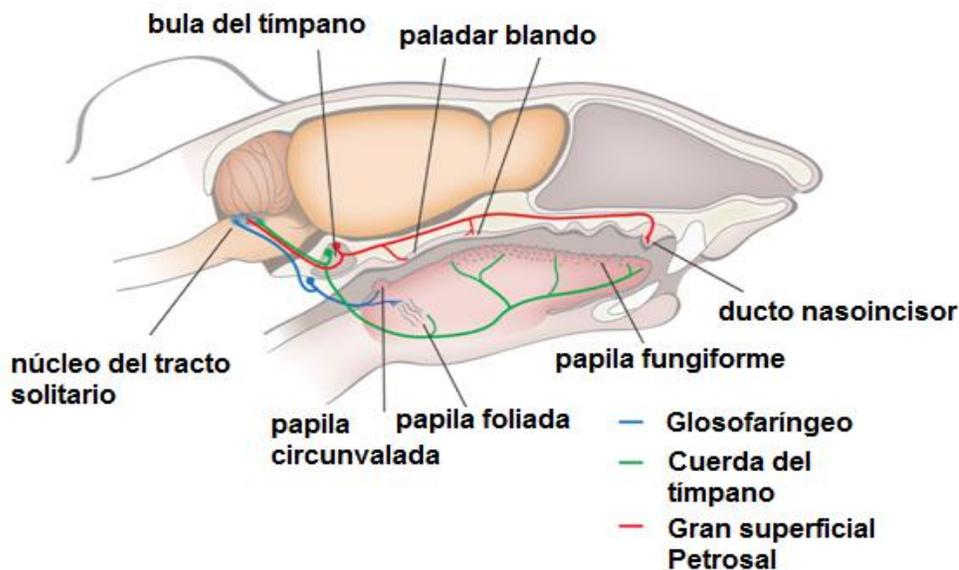


Fig. 4. Organización anatómica del sistema gustativo periférico y el primer relevo sináptico en el SNC, el núcleo del tracto solitario. Modificado de Dudgeon y Hill, 2011.

La respuesta de los nervios del GSP y CT ante la estimulación de seis distintos azúcares al 0.5M, producen una respuesta robusta especialmente la sacarosa en el GSP comparada con CT, esta respuesta específica a sustancias dulces en el nervio del GSP sugiere su importante participación al mediar esta información en su ruta hacia el tallo cerebral (Harada y col., 1997; Yamaguchi y col., 2001).

Ninomiya y col., 1991, compararon la respuesta de la CT y del nervio glossofaríngeo (GF) en ratones de 7 a 10 días de edad ante la aplicación de NaCl, observando incremento significativo en la frecuencia de la respuesta. Entre los 14 y 20 días de edad aproximadamente el 90% de las fibras de la CT responden a 0.10 y 0.50 M de soluciones de NaCl, LiCl y KCl y NH<sub>4</sub>Cl. A los 45 días de edad la magnitud de la respuesta al NaCl y LiCl disminuye llegando a respuestas similares a las de los adultos. La principal razón de los cambios relacionados con la edad en la respuesta de la CT al NaCl y LiCl, involucran cambios diferenciales en la sensibilidad individual de las fibras a estas sales. Por lo tanto, el incremento durante el desarrollo en la sensibilidad en la CT al NaCl y al LiCl, resulta de un incremento en la proporción de fibras que responden más robustamente al NaCl y al LiCl, como en el aumento de la sensibilidad de fibras individuales a estos estímulos, y un efecto contrario puede suceder en el adulto cuando la respuesta disminuye (Hill y col., 1986).

Estos resultados indican que la respuesta de las fibras aferentes se modifica y es muy robusta para los azúcares lo que correlaciona con el mayor número de botones en las

PFu y en el PB, lo que sugiere que facilitan la habilidad de la cría para distinguir el sabor de los azúcares de la leche durante la conducta de succión. También muestran que la CT tiene diferentes formas de respuesta, y puede estar relacionada con cambios postnatales en los componentes de la membrana intracelular involucrados en la transducción del estímulo, alteraciones en la afinidad del receptor, en el incremento en la densidad de los receptores y modificaciones de sistemas de segundos mensajeros. Los estudios electrofisiológicos de la CT han mostrado que el sistema gustativo periférico es funcional en etapas tempranas del desarrollo, inclusive estas respuestas ocurren mucho antes de que los botones gustativos adquieran su madurez electrofisiológica (Farbman y Hellekant, 1978; Hill y Almli, 1980; Ferrell y col., 1981; Mistretta y Bradley, 1985; Suwabe y col., 2011).

### **1.6 Organización anatómica de la vía gustativa en el SNC**

Una vez que sucede el proceso de liberación del neurotransmisor las fibras aferentes producen potenciales de acción que se transmiten a través de fascículos y se dirigen hacia el núcleo del tracto solitario (NTS) (Paxinos y Watson, 1986). El NTS es una columna longitudinal de neuronas que se extiende desde el primer segmento cervical de la médula espinal, hasta la porción más rostral que se ubica junto a la rodilla del nervio facial (Torvick, 1956; Hamilton y Norgren, 1984). La zona a la que llega la información gustativa es el extremo rostral del NTS (NTSr), que puede definirse por estudios de electrofisiología basados en la ubicación de las neuronas que responden eléctricamente a estímulos sápidos, o anatómicamente por la distribución de las ramas

nerviosas que llevan información gustativa.

El área gustativa se extiende desde el extremo rostral del NTSr hasta el punto donde el borde medial del núcleo toca el cuarto ventrículo (Paxinos y Watson, 1986). La información quimiosensorial de la cavidad oral, faríngea y laríngea viaja a través de los nervios de la CT (VII), y GSP (IX) en forma ipsilateral al NTSr (Torvik, 1956; Hamilton y Norgren, 1984). Las aferencias gustativas al NTSr han sido definidas con detalle mediante técnicas de trazado neuronal. Los campos terminales de la CT, proyectan al polo rostral del NTSr, las ramas del GSP, terminan en zonas más caudales a la zona de proyección de la CT y las aferencias del nervio vago que inerva las porciones posteriores de la cavidad oral junto con el tracto digestivo, el nervio vago terminan en zonas caudales a la zona de proyección del GSP (Whitehead y Frank, 1983; Whitehead, 1988; Smith y Hanamori, 1991). Sin embargo, Hamilton y Norgren (1984) mostraron que las zonas de proyección no están completamente segregadas y sugiere que hay zonas de transición donde las fibras aferentes se superponen en el NTS (Fig. 5b).

Las neuronas eferentes del NTSr (multipolares y fusiformes), envían sus axones al siguiente relevo ascendente, el núcleo parabraquial (NPB) ubicado en el puente. Otras proyecciones en el tallo cerebral son a la formación reticular (FR), y los núcleos motores de los nervios craneales. La información del NPB continua al siguiente relevo que es el componente parvocelular medial del complejo ventrobasal del tálamo (VPMpc), este

núcleo talámico proyecta al área cortical gustativa (CGA). Otras proyecciones ascendentes del NPB se extienden al hipotálamo lateral, el núcleo central de la amígdala (CeA), al núcleo rojo y a la estría terminalis (Fig. 5a). Por otra parte, las aferentes descendentes al NTSr provienen de la corteza gustativa, el núcleo paraventricular (NPv) y el núcleo central de la amígdala (CeA), proyecciones del núcleo rojo y de la estría terminalis (Yamamoto y col., 1998; Travers y col., 1999; Felizardo y col., 2009).

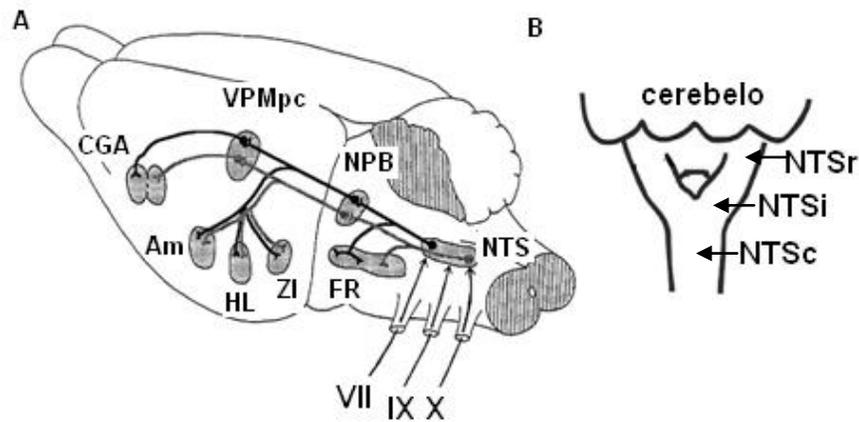


Fig. 5. A. Vía gustativa en la rata. B. Divisiones del NTS de la rata adulta. VII, nervio facial; IX, nervio glossofaríngeo, X, nervio vago; NTS, núcleo del tracto solitario, NPB, núcleo parabraquial, FR, formación reticular, ZI, zona incierta, HL, hipotálamo lateral, AM amígdala, VPMpc, núcleo ventral posteromedial del tálamo, CGA, corteza gustativa. (Modificado de Yamamoto y col., 1998).

### 1.7 Tipos neuronales en NTSr

Estudios realizados en ratas y hamsters con la técnica de Golgi-Cox en el NTSr muestran que hay al menos tres tipos de neuronas; neuronas multipolares (forman el

35% del total de neuronas del NTSr) con forma triangular o poligonal, y tres o cinco dendritas primarias; fusiformes (16%) que se caracterizan por tener un soma alargado y dos dendritas primarias que emergen en lados opuestos. Así mismo, neuronas ovoides (49%), que tienen un soma de diámetro pequeño, tres o cinco dendritas primarias y muchas arborizaciones (Fig. 6) (Davis y Jang, 1988; Lasiter y Kachele, 1988; Whitehead, 1988; King y Hill, 1993).

En particular las neuronas ovoides, tienen un área somática de 80-120 $\mu$ m, pocas ramas dendríticas, volumen dendrítico corto y por lo tanto su área de influencia es pequeña. El número de dendritas primarias es de  $3.1\pm 0.1$ , el largo dendrítico es de  $1,377\pm 103$   $\mu$ m, y la máxima densidad de espinas se encuentra entre el segundo y tercer orden dendrítico (King y Bradley, 1994). Estudios de inmunomarcaje muestran que no proyectan ascendentemente a estructuras suprayacentes como el puente, la FR o núcleos motores del tallo cerebral. Esta disposición estructural sugiere que sean neuronas de proyección local o de interconexión, mejor conocidas como interneuronas (Norgren, 1978; Lasiter y Kachele, 1988; Travers, 1988; Whitehead, 1990; Beckman y Whitehed, 1991; Davis, 1993).

El uso de marcadores retrógrados ha mostrado que las neuronas de proyección del NTSr son las neuronas multipolares y las neuronas fusiformes, el conjunto de neuronas que se encuentra en la parte dorsal proyecta al siguiente relevo, el NPB. La zona ventral del NTSr proyecta a la formación reticular (FR) y a núcleos motores de los nervios

craneales V, VII, IX, X y XII. Asimismo, está relacionado con la motilidad del tubo digestivo, la secreción de jugos digestivos, la secreción de saliva entre otras funciones (Blessing y Gai, 1997).

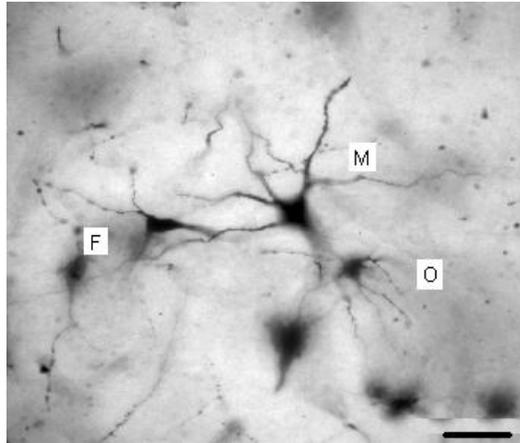


Fig. 6. Fotomicrografía de neuronas multipolares (M), ovoides (O) y fusiformes (F) del NTSr, teñidas con la técnica de Golgi-Cox. Calibración 50  $\mu$ m. (Rubio y col., 2011).

Las características morfológicas de las células del NTSr muestran que son las neuronas multipolares y las neuronas fusiformes con extensiones dendríticas mayores que las neuronas ovoides, las que extienden sus procesos a otras subdivisiones del NTS. Estas características sugieren que tipos neuronales puedan ocupar una región más amplia dentro del núcleo, formando zonas de transición que reciben aferentes gustativas y viscerales del tracto digestivo (Davis y Jang, 1988; Lasiter y Kachele, 1988; Whitehead, 1988; King y Hill, 1993)..

### **1.8 Desarrollo electrofisiológico del NTSr**

Para entender cómo un animal inmaduro procesa un estímulo y genera el

reconocimiento de un sabor para producir distintos patrones conductuales, es necesario considerar que el estímulo gustativo debe ser transducido en los receptores gustativos. Además que se genere un potencial de acción y que las fibras aferentes transmitan potenciales de acción a las neuronas de diferentes niveles en la vía, incluyendo al primer relevo (NTSr) en el SNC.

Las neuronas en el NTSr, el NPB, el tálamo y la corteza gustativa responden a varias sustancias sápidas, hay evidencia de que responden preferentemente a la cualidad del estímulo (si genera respuesta de aceptación o rechazo) (Halpern y Nerlson, 1965). La información gustativa que llega al NTSr está sujeta a diversas modulaciones que sugieren afinación de los perfiles de respuestas, permitiendo así que el sistema extraiga información específica acerca de las sustancias químicas colocadas en la cavidad oral. En general, la codificación de la información gustativa en el SNC probablemente comprende conjuntos de neuronas a través de todos los relevos. Por cuestiones de interés, el estudio se centra en los cambios de respuesta en el NTSr, por ser el primer relevo de la vía gustativa, y por estudios previos en los que se ha observado que ciertas respuestas de aceptación y rechazo están mediadas por grupos neuronales en el tallo cerebral (Grill y Norgren, 1978; Norgren, 1983; Hamilton y Norgren, 1984).

Hill y colaboradores en 1983 realizaron registros multiunitarios en el NTSr después de aplicar distintos estímulos entre ellos 0.1M y 0.5M de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{LiCl}$ ,  $\text{KCl}$ , ácido

cítrico, 0.01M clorhidrato de quinina, 1.0M sacarosa. Las respuestas a los estímulos gustativos de neuronas del NTSr de animales inmaduros (5 a 7 días) se compararon con las de los animales adultos (50 a 60 días). Se encontró que los animales inmaduros responden a menor número de sales y a elevadas concentraciones, mientras que las ratas mayores a 14 días responden a concentraciones menores y a todos los estímulos gustativos. Los mayores cambios en la respuesta a los diferentes estímulos químicos ocurren entre la primera y segunda semana de vida, siendo pocos los cambios que se suceden después de esta edad.

Los cambios en el desarrollo de la frecuencia de la respuesta en el NTSr pueden reflejar cambios en las fibras de la CT; sin embargo, el análisis de la frecuencia de respuesta entre el NTSr y CT, muestra que los cambios en el NTSr suceden después de los cambios en la CT. Los cambios morfológicos pueden estar asociados a las diferencias en la frecuencia de respuesta debido a la reorganización que sufre el NTSr *per se*. Es decir, la sinaptogénesis, el remodelamiento de las dendritas, convergencia de aferentes gustativas y de otros núcleos en la médula espinal y cerebro anterior, inclusive puede ser que, ciertos tipos neuronales del NTSr sean funcionales antes que otros (Travers y Smith, 1979; VanBuskirk y Smith, 1981; Rubio y col., 2004).

Hay pocos estudios que muestren una clara correlación de los cambios neurofisiológicos con cambios en la conducta ante ciertos estímulos durante el desarrollo, sin embargo, la descripción de casos clínicos, revela que los recién

nacidos no tienen la capacidad de discriminar el sodio contenido en la dieta en edades tempranas. La descripción de un caso clínico, donde por error confundieron la sal con azúcar en la preparación de la fórmula láctea para pacientes infantes, causó serios malestares en los infantes que la consumieron. Además, revelan una inmadurez en el reconocimiento del sabor salado en infantes que correlaciona con los cambios morfológicos y neurofisiológicos que ocurren en los elementos estructurales del sistema gustativo en etapas tempranas del desarrollo (Finberg y col., 1963; Amirlak y Dawson, 2000; Moritz y Ayus, 2002).

### **1.9 Neurotransmisores en el NTS**

Los neurotransmisores y sus precursores en el NTS han sido identificados por técnicas de inmunohistoquímica que han mostrado que tanto las neuronas de los ganglios periféricos que conduce la información de los botones gustativos, como las neuronas en el NTSr contienen sustancia P, tirosina hidroxilasa, polipéptido intestinal vasoactivo, péptido relacionado con el gen de calcitonina y galanina y aspartato (Czyzyk-krzeska y col., 1991; Helcke y Rabcheusky, 1991; Ichikawa y col., 1991; Finley y col., 1992; Okada y Miura, 1992) . No es sorprendente que el glutamato y GABA se encuentren como neurotransmisores y neuromoduladores en el NTSr (Fong y col., 2005). El glutamato es liberado de las fibras gustativas aferentes (Li y Smith, 1997) y también se encuentra en los cuerpos neuronales del NTSr y en algunas de las proyecciones neuronales hacia el NPB (Gil y col., 1999). La inmunotinción para GABA también ha sido detectada en el NTSr, principalmente en las neuronas ovoideas, las cuales se cree

tiene un papel principalmente como interneuronas inhibitorias (Davis y Jang, 1988; Davis, 1993; Leonard y col., 1999).

Con el uso de técnicas de marcaje retrógrado se ha observado que la inyección con dextran en el núcleo central de la amígdala (CeA) marca fibras con terminales en zonas medial, central y ventral del NTSr (Halsell, 1998; Whitehead y col., 2000). Cuando se inyecta la toxina B de cólera en el NTS, muchas células en el CeA son marcadas, generalmente las influencias de las fibras descendentes del cerebro anterior hacia el NTS son excitatorias, no obstante se ha mostrado que estas fibras provenientes de la amígdala tiene un efecto inhibitorio en la rata (Hayama, 1985; Smith y Li, 2001). En la rata hay evidencia que sugiere que estas proyecciones gabaérgicas de alguna forma pueden estar modulando las conexiones locales primarias, con menor efecto en el tracto del NTS que lleva información gustativa hacia relevos neuronales superiores (Saha y col., 2001).

El procesamiento de la información gustativa esta modulad por información descendente de diferentes núcleos del cerebro anterior como resultado de la experiencia sensorial. En el NTSr se localizan receptores a opioides, los cuales reciben aferentes del CeA, sugiriendo otra posible modulación de la información gustativa en el NTS. También se han encontrado receptores a oxitocina y catecolaminas que provienen de estructuras hipotalámicas y posiblemente modulan el aspecto hedónico generado por las señales gustativas (Moga y col., 1990; Smith y Li, 2000; Saha y col., 2001).

El NTS recibe fibras aferentes que provienen de la lengua (Hamilton y Norgren, 1984) y fibras viscerales de los nervios glossofaríngeo y vago de diferentes modalidades y que incluyen baroreceptores y tienen funciones quimiorreceptoras (Altschuler y col., 1989; Ciriello y col., 1994). Una población de neuronas en el NTS contiene catecolaminas (noradrenalina y adrenalina) (Hokfelt y col., 1984; Kalia y col., 1985), específicamente el grupo A2/C2 y se encuentran distribuidas principalmente en la división medial del NTS (Hollis y col., 2004). El NTS es una zona de convergencia de información aferente, de varios sistemas el cardiovascular, respiratorio y gastrointestinal (Andresen y Kunze, 1994; Saper, 2002). Las neuronas catecolaminérgicas en el NTS se localizan en una zona ideal para coordinar señales aferentes a múltiples regiones del cerebro, incluyendo el hipotálamo, amígdala, núcleo accumbens, y el núcleo motor dorsal del vago (Riche y col., 1990; Petrov y col., 1993; Ueta y col., 2000; Travagli y col., 2006). Un ejemplo de la participación de este tipo celular es la inhibición de la ingesta de comida. Tanto la ingesta de alimento, la distensión gástrica y la CCK (factor de saciedad) producen un incremento en la expresión de c-fos en las neuronas catecolaminérgicas del NTS (Mönnikes y col., 1997; Willing y Berthoud, 1997; Rinaman y col., 1998). Estas señales estimulan la liberación de catecolaminas en sus sitios de proyección (Buller y Day, 1996; Onaka, 2000; Ueta y col., 2000).

Finalmente las neuronas que expresan TH (tirosina hidroxilasa enzima limitante en el metabolismo de las catecolaminas) están presentes al momento de nacer y se distribuyen en toda la porción rostral del NTS, sugiriendo que ellas puedan recibir

entrada de los nervios craneales y contribuir en la modulación de la información en la vía gustativa del SNC. Las características específicas de las neuronas gustativas activadas por estímulos sápidos en el NTSr de ratas jóvenes se desconocen, y su papel en el procesamiento de la información gustativa tampoco está claro (Beverly y Bockstaele., 2006).

### **1.9.1 Papel del GABA en el procesamiento de la información gustativa**

El NTS está ubicado en el tallo cerebral y es un sitio de integración periférica e interna que recibe aferentes primarias gustativas, cardiovasculares, respiratorias y gastrointestinales, que están fuertemente moduladas por neuronas gabaérgicas (Smith y col., 1998; Kumada y col., 1990; Van Giersbergen y col., 1992; Wang y Bradley, 1993; Dampney, 1994; Lawrence y Jarrot, 1996).

Los estudios inmunohistoquímicos han mostrado que aproximadamente una de cada cinco neuronas en el NTSr adulto contienen ácido gama amino butírico (GABA) (Lasiter y Kachele, 1988). Por otra parte, los estudios morfológicos muestran que el soma de las neuronas inmunoreactivas a GABA es menor a 120  $\mu\text{m}$  y de cuerpo ovoideo, lo que sugiere que este tipo de neuronas esté involucrado en un circuito local de tipo inhibitorio (Leonard y col., 1999).

Investigaciones previas muestran que un componente importante de la actividad sináptica en el NTSr es la excitación, y que la modulación por el neurotransmisor

GABA juega un papel importante en el procesamiento de información gustativa que se da en la rata adulta (Lasiter y Kachele, 1988; Leonard y col., 1999).

Se sabe que las interneuronas pueden ejercer su efecto sobre la descarga de las fibras aferentes, ya que hacen sinapsis con los cuerpos celulares o con las dendritas primarias de las neuronas multipolares y fusiformes modulando su patrón de descarga eléctrica por influencia GABAérgica (Lasiter y Kachele, 1988; Davis, 1993). Esto puede tener repercusión en la descarga de salida de las neuronas, y alterar la transmisión de la información gustativa a estructuras pontinas, límbicas, hipotalámicas y corticales (King y Bradley, 1994).

La magnitud de respuestas de las neuronas gustativas del NTSr disminuye durante el desarrollo y que puede estar asociado a la acción de circuitos inhibitorios (McLaughlin y col., 1975; Renehan y col., 1997). A pesar de que se reconoce la importancia del GABA en el circuito local del NTSr sobre la modulación de la respuesta de las neuronas que responden a estímulos gustativos en animales adultos, se conoce poco acerca de la participación de GABA en el NTSr durante el desarrollo asociado a la inducción de estímulos sápidos.

Es posible que el GABA pueda contribuir al incremento en la magnitud de la respuesta asociada a estímulos sápidos en animales inmaduros, ya que se ha mostrado que este neurotransmisor ocasionalmente despolariza neuronas del NTSr en edades

tempranas (contrario a la hiperpolarización que ocurre en animales adultos) (Krimm y Hill, 1997). Cuando se registran células completas en rebanadas de tejido de rata de 1-7 días de edad, las neuronas del NTSr son más sensibles al GABA que las de los adultos, y responden con despolarización. A la edad de 20 días la cantidad de GABA disminuye como lo indican el inmunomarcaje y el número de sinapsis, GABAérgicas en el NTSr que ya alcanza los niveles del adulto (Brown y col., 2000).

En contraste a los datos que se conocen sobre el papel del GABA en la modulación de la información gustativa en el NTSr de la rata adulta, se conoce poco sobre la presencia de neuronas inmunoreactivas a GABA en la rata en desarrollo, y si este tipo celular puede participar en la activación de circuitos neuronales generados por la aplicación de estímulos sápidos. Así, se sabe que la magnitud de la respuesta de las neuronas que responden a estímulos sápidos, disminuye durante el desarrollo pero se desconoce si este incremento en la selectividad está relacionado con circuitos inhibitorios gabaérgicos.

## **Capítulo II**

### **Generalidades de la expresión de c-fos**

Los genes de respuesta temprana fueron originalmente descritos en el campo de la regulación del crecimiento, son rápidamente inducidos por estímulos extracelulares y codifican proteínas necesarias para eventos que ocurrirán en la célula como:

crecimiento, reparación y replicación del genoma (Curran y Morgan, 1995). Actualmente, han sido identificadas principalmente 4 proteínas de la familia Fos: c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2 (Greenberg y Zif, 1984; Cohen y Curran, 1988; Zerial y col., 1989). Estas proteínas son codificadas por genes que contienen cuatro exones y tres intrones (Van Straaten y col., 1983; Harrison, 2001). También poseen un cierre de leucina que promueve la heterodimerización con miembros de la familia Jun (c-Jun, JunB y JunD) para formar un factor de transcripción llamado proteína activadora-1 (AP-1) (Hughes y Dragunow, 1995).

Como se mencionó los heterodímeros (Fos/Jun) funcionan como factores de transcripción, los cuales se unen específicamente a una secuencia del ADN, al unirse al ADN se activa el sitio AP-1, el cual regula la expresión de varios genes relacionados con el crecimiento, la reparación y la replicación del genoma. Las proteínas Fos y Jun son miembros de una gran familia de factores de transcripción, que coordinan grupos y subgrupos de genes brindando posibilidad a las células de responder a las demandas medio ambientales.

## **2.1 c-Fos y la activación neuronal**

Existen dos características de la expresión de c-fos que ponen a este gen de acción temprana como una excelente herramienta de mapeo, para localizar células activadas por estímulos específicos; estas características son:

1. Bajos niveles de transcripción de c-fos en condiciones basales

2. Su inductibilidad ante un amplio rango de estimulación transináptica/transcripcional.

En condiciones basales, el ARN mensajero (ARNm) de c-fos y la proteína Fos se encuentran en niveles muy bajos (Hughees y cols., 1992). En cultivos celulares así como en varias regiones cerebrales *in vivo* el RNAm es inducido en un par de minutos después del estímulo y el pico se encuentra entre 30 y 90 minutos. El nivel máximo de la proteína Fos ocurre en un rango de 1 y 3 horas, y desaparece gradualmente del núcleo celular entre 3 y 4 horas después del estímulo (Sonnenberg y col., 1989; Chan y col., 1993; Imaki y col., 1993; Ding y col., 1994; Kovacs y Sawchenko, 1996; Kovacks, 1998).

Se considera que la inducción de la proteína Fos refleja la actividad funcional de las neuronas (Sagar y col., 1988; Dragunow y Faull, 1989; Duncan y col., 1993). Sin embargo, áreas con altos niveles de actividad neuronal, como la corteza visual (Kaczmarek y Chaudhuri, 1977) o células neurosecretoras magnocelulares durante la succión (Fenelon y cols., 1993), no muestran expresión significativa de c-fos, por lo tanto, parece que la sola actividad no es suficiente para inducir la respuesta de este gen.

La expresión cuantificable de la proteína c-Fos se obtiene solo después de realizar ciertas manipulaciones experimentales que permitan obtener una expresión basal, por

ejemplo en el sistema visual, la inducción de c-Fos se provoca después de un periodo de privación sensorial y cuando las ratas son expuestas a un estímulo novedoso (Kaczmarek y Chaudhuri, 1997). El patrón de c-Fos es específico para el tipo de estímulo aplicado, por ejemplo cuando se inyecta una solución hipertónica en la rata se localizan células inmunoreactivas a Fos en zonas involucradas en la regulación de fluidos del cuerpo (Giovannelli y Bloom, 1992). Lo mismo sucede cuando se somete a las ratas a tareas motoras, la expresión se localiza en regiones cerebrales implicadas con estos estímulos y no en otras áreas (Scammell y col., 1993). Lo anterior pone de manifiesto que las regiones donde la actividad neuronal es detectada, por la expresión de la proteína Fos, dependen del tipo de estímulo aplicado. Por lo tanto, la detección de las proteínas inducidas por genes tempranos como fos, refleja las regiones neuronales involucradas en el procesamiento de un estímulo determinado.

Existen distintos factores que inducen la expresión de c-fos: factores neurotróficos, neurotransmisores, despolarización, incremento del flujo de calcio y elevación del calcio intracelular e intranuclear. Así, la detección inmunohistoquímica de la proteína c-Fos, se ha utilizado ampliamente como un marcador de actividad neuronal que ocurre en respuesta a una gran variedad de estímulos homeostáticos o sensoriales.

## **2.2 Organización topográfica de las respuestas gustativas en el NTS**

Se ha utilizado la detección de la proteína Fos como una técnica para medir la respuesta de los circuitos neuronales involucrados en la ingesta de alimento, sobre

todo en respuesta a la aplicación de estímulos sápidos (Harrer y Travers, 1996; Travers, 2002; Chan y col., 2004). Algunos trabajos en los que se ha utilizado la detección inmunohistoquímica de esta proteína como marcador de actividad neuronal, sugieren que las sustancias que son colocadas sobre el dorso de la lengua generan un patrón de activación espacial característico para la quinina y la sacarosa en el NTSr, lo que sugiere una organización topográfica, asociada principalmente a la cualidad gustativa de los estímulos clásicos que generan, aversión y aceptación respectivamente (Fig. 8). Comparado con animales no estimulados y estimulados con agua, la sacarosa y la quinina inducen un incremento significativo en la inmunoreactividad a Fos (IRF) en el NTSr, que coincide con la región que recibe fibras aferentes de los receptores gustativos. (Di Nardo y Travers, 1997; Travers y col., 1999; Hironaka y col., 2000; Yamamoto y Sawa, 2000; Travers y Hu, 2000; Harrison, 2001; Travers, 2002; King, 2003; Chan y col., 2004).

Los protocolos experimentales en ratas adultas que incluyen la cuantificación de la IRF asociada a la aplicación de estímulos sápidos han sido ampliamente estudiados. Una cantidad basal de la IRF se logra al privar de alimento y agua a los animales adultos durante dos horas, luego de la liberación del estímulo sávido se mantiene a los animales durante 90 a 120 minutos en sus cajas para ser sacrificados y extraerles el cerebro y posteriormente ser procesados por la técnica de inmunohistoquímica para c-fos. Estrategias adicionales se utilizan para tener mayor control del protocolo, utilizando agua como un estímulo insípido control. Así los primeros estudios mostraron que la IRF

en el NTS, producida por la liberación de quinina se concentró en la zona medial (con relación al cuarto ventrículo), mientras que la estimulación con sacarosa produjo mayor IRF en zonas mediolaterales del núcleo (Travers y col., 1999). En animales descerebrados la IRF inducida por quinina y ácido cítrico es mayor y se mantiene en la misma zona que en animales normales, lo que sugiere que incluso en animales descerebrados la aplicación de estímulos amargos induce la activación de las mismas estructuras que participan en el reflejo oromotor de rechazo (Travers y col., 1999).

En estudios posteriores se analizaron la participación de las fibras aferentes sobre la IRF en el NTS asociada a estímulos sápidos, por lo que se realizaron secciones del nervio glossofaríngeo que es responsable de la inervación de la zona posterior de la lengua y luego de aplicar quinina se observaron cambios en el patrón de distribución espacial, similar al patrón generado por animales estimulados con agua. En el mismo caso de estimulación con quinina pero con sección de la CT no tiene efecto sobre el número de IRF y distribución en el NTSr, lo que sugiere que la integridad del GL es fundamental para generar el patrón característico de IRF en el NTSr inducido por quinina (King y col., 1999). Estudios posteriores revelaron que cuando se estimula eléctricamente la CT en animales anestesiados, el patrón de IRF coincide con los campos terminales de la CT, no obstante, la inmunoreactividad fue menor que en animales conscientes (Harrison, 2001).

El reconocimiento de diferentes estímulos sápidos amargos con diferente estructura

química pero del mismo grupo de los alcaloides (quinina, denatonio, propiltiouracilo) generan el mismo patrón de respuesta de rechazo oromotor, todos ellos producen IRF en la zona medio lateral con pequeñas diferencias en el número de neuronas inmunoreactivas, lo que apoya la idea de que esta zona puede estar relacionada con el circuito involucrado en la conducta de rechazo oromotor. Los estudios han incluido el análisis de la IRF en distintas concentraciones de un mismo estímulo sávido, la quinina a diferente concentraciones (0.3mM, 3mM ó 30mM) produce IRF en la zona medial con cambios en el número de IRF relacionado solo con la concentración aplicada. Por otra parte, también se han probado distintos estímulos sápidos como el ácido cítrico un estímulo no aversivo para la rata y se observa la IRF en las zonas lateral y central similar a la inducida por la sacarosa. (Fig. 7) (Travers, 2002; Chan y col., 2004).

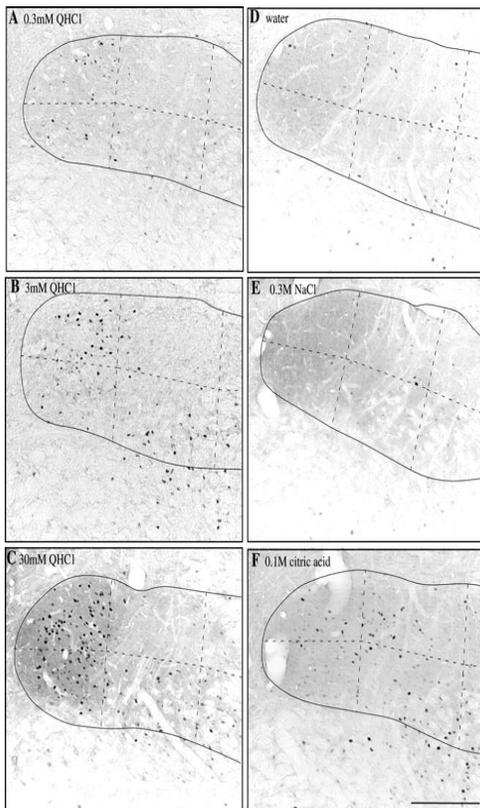


Fig. 7. A. Fotomicrografías del NTSr que muestran la distribución de la IRF para quinina (QHCl) en diferentes concentraciones, A. 0.3mM, B. 3mM y C. 30mM, D. agua, E. 0.3M NaCl y F. ácido cítrico 0.1M. Calibración 200  $\mu$ m. Tomado de Travers, 2002.

El reconocimiento de un estímulo químico no depende únicamente del sistema gustativo, sino que también está involucrado el sistema trigeminal; sin embargo, estímulos que producen irritación (nicotina y capsaicina ) aplicados sobre el dorso de la lengua inducen mayor IRF en el núcleo caudal trigeminal, en el núcleo intersticial (paratrigeminal) y en el área postrema; con mínima marca en el NTSr, lo que muestra que no todos los estímulos colocados sobre el dorso de la lengua producen una cantidad cuantificable de IRF en el NTSr (Boucher y col., 2003).

El estímulo químico que es aplicado sobre la lengua al ser ingerido, puede estimular una gran variedad de receptores distribuidos por todo el tracto digestivo y considerando que la información de esas zonas es llevada a través del nervio glossofaríngeo al NTS, se especuló que este efecto se podría estar sumando a la IRF observada por la aplicación de estímulo sápidos. Para descartar el efecto de factores postingestión en la IRF en el NTSr, Yamamoto y Sawa (2000), compararon la IRF al aplicar diversos estímulos sápidos incluyendo los clásicos (quinina, sacarosa, NaCl, sacarina, ácido cítrico, entre otros) sobre el dorso de la lengua y directamente en la cavidad gástrica. Así, se observó que la mayor IRF se detectaba en la zona caudal del NTS y en mucho menor grado en la zona rostral del NTS, comparados con los animales a lo que se les colocó el estímulo en el dorso de la lengua. Esto confirmaba una vez más que la IRF inducida en el NTSr es asociada principalmente por los estímulos sápidos aplicados sobre el dorso de la lengua.

Aunque los datos son consistentes hasta el momento, lo que se conoce es que la aplicación de estímulos sápidos sobre el dorso de la lengua induce la expresión de c-Fos en el NTSr en la rata adulta, y se ha mostrado un patrón de activación característico para los estímulos sápidos que generan el reconocimiento de sabores dulces y amargos (sacarosa y quinina), probablemente esté asociado a la respuesta de rechazo. Los datos que aporta la técnica de c-Fos son valiosos, ya que otras técnicas utilizadas previamente (registros electrofisiológicos, conductuales, anatómicos, trazadores, etc.), no han mostrado una clara organización en sus efectos. Sin embargo, los datos que se han obtenido con esta técnica apoyan estudios previos en los que la IRF coincide con los campos de las terminales de los nervios que inervan distintas zonas de receptores sobre el dorso de la lengua. No obstante, la revisión de diversos estudios sobre la zona de llegada de las aferentes y el estímulo al que responde mejor no es muy constante, lo más claro es que hay una sobreposición de los campos terminales, y que puede ser que las neuronas del NTSr sean activadas en respuesta a la cualidad del estímulo que es aplicado sobre la lengua. (Tabla 2) (King y col. 1999).

La idea de la existencia de los mapas de sabores se ha retomado recientemente, ya que mediante el uso de diversas técnicas y distintos enfoques se ha hecho posible confirmar su existencia en el sistema gustativo al menos en el NTSr y en el NPB (King y Bradley 1994; Travers, 2002, Chen y col., 2011).

No obstante la relevancia del tema y del soporte experimental que dan estos trabajos, en la actualidad no existe un estudio que muestre si esta organización que se observa en el adulto está presente al momento de nacer, o si se va organizando durante el curso del desarrollo (King y Bradley, 1994; Renehan y col., 1996; Harrison, 2001; Travers, 2002; Di Lorenzo y Victor 2003).

**TABLA 2 CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS Y ELECTROFISIOLÓGICAS DE NERVIOS GUSTATIVOS EN LA RATA**

<b>Nervios gustativos</b>	<b>Inervación de la cavidad oral</b>	<b>Ubicación de los campos terminales en el NTSr +</b>	<b>Estímulo al que mejor responde la zona de inervación *</b>	<b>Referencias</b>
Cuerda del tímpano rama del nervio facial (VII)	Zona anterior de la lengua	rostral	Sales de sodio y ácidos	Pfaffman, 1955, Frank y col., 1983
rama superficial del nervio facial (VII)	Paladar blando	Zona rostral	Azúcares	Cleaton-Jones, 1976, Harada y col., 1997
Rama lingual tonsilar del nervio glosofaríngeo (IX)	Zona posterior de la lengua	Zona caudal del NTSr	Alcaloides y ácidos	Guth, 1957, Yamada, 1966, Dahl y col., 1997
Rama Laríngea superior del nervio vago (X)	Epitelio laríngeo	Zona caudal del NTSr y caudal del NTS	Agua	Andrew, 1956, Miller, 1977, Travers y Nicklas, 1990,

+ Hamilton y Norgren (1984) denotan la porción gustativo del NTS que representa el lugar de mayor densidad de terminales

\*Estímulo al que mejor responde, se refiere al estímulo químico que produce mayor respuesta electrofisiológica en relación a otros estímulos.

Modificado de King y col., 1999.

## **CAPÍTULO III**

### **Desarrollo del trabajo de investigación**

#### **3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Actualmente la caracterización de la organización topológica es uno de los temas primordiales en el estudio del sistema gustativo. Al respecto se ha mostrado que hay un patrón diferente de activación de neuronas inducido por sacarosa y quinina, lo que sugiere una organización topológica esencial para la expresión funcional (King y col., 1999; Travers, 2002). Por otra parte, se ha señalado que esta organización estructural y funcional es esencial para la modulación de conductas de ingesta y rechazo de alimento (Di Nardo y Travers, 1997). Sin embargo, si esta organización está presente al nacer o si se va adquiriendo durante el desarrollo se desconoce y es una oportunidad para comprender los mecanismos de maduración del sistema gustativo. Si bien en otros sistemas sensoriales como el olfativo se ha propuesto que la organización topológica no se modifica durante el desarrollo, en el gustativo es nula la evidencia experimental que sustente la organización funcional de este sistema durante el desarrollo.

Por otra lado, se conoce que las neuronas GABAérgicas y catecolaminérgicas en el NTSr de la rata adulta tienen un papel preponderante en la modulación de la información aferente, la integración ascendente y los procesos perceptuales involucrados en conductas de ingesta (Smith y col., 1988), resulta entonces relevante considerar el papel de las neuronas GABAérgicas y catecolaminérgicas durante el establecimiento del circuito neuronal.

Con base en lo anterior, en este trabajo se generó evidencia experimental que apoya la idea de la presencia de una organización topológica funcional del sistema gustativo. En particular este estudio muestra la posible relación entre la activación neuronal inducida por estímulos sobre los tipos celulares asociados en particular de células gabaérgicas y catecolaminérgicas durante el desarrollo temprano de la rata.

### **3.2 HIPÓTESIS**

La aplicación de estímulos sápidos (quinina y sacarosa) sobre el dorso de la lengua inducirá activación neuronal en distintas zonas del NTSr en ratas neonatas y este patrón de organización se modificará durante el desarrollo.

Las neuronas gabaérgicas y catecolaminérgicas serán activadas por estímulos sápidos en ratas durante el desarrollo.

### **3.3 Objetivo general I**

- Evaluar la distribución espacial de las neuronas IRF en el NTSr asociados a estímulos sápidos específicos de ratas en desarrollo.

#### **Objetivo específico I**

- Establecer un protocolo de inducción de c-Fos confiable en ratas neonatas.
- Cuantificar la IRF en respuesta a la aplicación de NaCl, quinina, sacarosa y agua en el NTSr de ratas en desarrollo a los 5, 15 y 25 días de edad en el plano medio lateral mediante la técnica de inmunohistoquímica para c-Fos.
- Cuantificar la IRF en respuesta a la aplicación de NaCl, quinina, sacarosa y agua en el NTSr de ratas en desarrollo a los 5, 15 y 25 días de edad en el plano rostro caudal, mediante la técnica de inmunohistoquímica para c-Fos.

## **Objetivo general II**

- Determinar si las células que son IRF en el NTSr por estímulos sápidos son de tipo gabaérgicas y/o catecolaminérgicas, a través de la colocación por dobles inmunomarcajes, para considerar la posible participación de estas poblaciones en el procesamiento de la información gustativa.

## **Objetivo específico II**

- Determinar si existe colocación del doble inmunomarcaje de c-Fos/GAD67 en el NTSr asociado a la aplicación de estímulos sápidos de la rata a los 15 días de edad.
- Establecer la colocación del doble inmunomarcaje de c-Fos/TH en el NTSr asociado a la aplicación de estímulos sápidos de la rata a los 15 días de edad.

### **3.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.4.1 Animales**

Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Local de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM, y estuvieron acordes con las normas internacionales utilizadas en el manejo y uso de animales de experimentación. El estudio se realizó en sujetos machos de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) descendientes de una cepa original adquirida de Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, USA, mantenidos en un cuarto con control automático de temperatura (22 +2°C), en un ciclo de 12 h de luz/oscuridad (luz a las 0700 h) y con alimento (chow Purina) y agua *ad libitum*. Para la cruce de ratas, un macho se colocó en una caja de plástico transparente (50X60X20 cm<sup>3</sup>) conteniendo 3 hembras (250-300gr). Las hembras que en el frotis vaginal diario (09:00-11:00h) mostraron esperma se consideró que estaban en el día 0 de gestación; a esas hembras se les colocaron en cajas de plástico de maternidad individuales (50X40X20 cm<sup>3</sup>) con piso de aserrín (3 cm) para construir el nido. Al día siguiente del nacimiento las crías se pesaron, se separaron por sexo y se ajustaron a 4 hembras y 4 machos distribuidos al azar con una madre.

#### **3.4.2 Tratamiento con sustancias sápidas**

Para este estudio se utilizaron ratas macho de 5, 15 y 25 días de edad, provenientes de diferentes camadas que fueron distribuidos en diferentes grupos experimentales (n=4 cada grupo). Las crías fueron aisladas de la madre durante la noche, a las 9:00h se les aplicó una dosis de 10 µl cinco veces durante los siguientes 25 minutos (en la

cavidad oral sobre el dorso de la lengua con ayuda de una micro pipeta) con uno de los siguientes estímulos: sacarosa 1M, NaCl 1M y quinina, 0.003 M y agua; noventa minutos después de iniciar la estimulación los animales fueron anestesiados y perfundidos. Se formaron dos grupos más como controles: uno al que no se le aplicó estímulo, solo se le realizó la manipulación y un grupo más que se mantuvo en aislamiento hasta el momento del sacrificio.

### **3.4.3 Obtención de las muestras**

En todos los casos los sujetos fueron anestesiados con éter etílico (Baker) e inmediatamente después se perfundieron por vía intracardíaca, para lo cual se utilizó solución salina fisiológica al 0.9% para eliminar la sangre en el tejido, y después se utilizó una solución de paraformaldehído al 4% en PBS 0.1 M para fijar el tejido. Posteriormente, se decapitaron y se extrajeron los cerebros que fueron posfijados en paraformaldehído al 4% en PBS a 4°C durante 24 h, y después se colocaron en sacarosa 30% hasta que las muestras descendieron al fondo del frasco. El área del tallo cerebral fue montada en el criostato para realizar cortes en el plano coronal a 50µm, se obtuvieron 4 series de cortes, que fueron preservados en solución crioprotectora fría y almacenados a -20°C hasta el momento del procesamiento histoquímico. Se utilizó una de las series de tejido colectadas, la cual se procesó con la tinción de Nissl para referencia anatómica, una más para inmunohistoquímica de la proteína c-Fos y una serie más para doble inmunomarcaje (c-Fos/GAD67).

#### **3.4.4 Inmunohistoquímica para c-Fos**

La inmunodetección de la proteína Fos se realizó por flotación, con el siguiente protocolo. Las rebanadas de cerebro se lavaron con KPBS dos veces durante 10 min a temperatura ambiente, con agitación constante para eliminar la solución anticongelante. Se bloqueó la peroxidasa endógena con una solución de 50 ml DH<sub>2</sub>O y 0.5 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% durante 10 min y se lavó inmediatamente después con KPBS dos veces, cada una de 10 min. Para eliminar los grupos aldehídos producidos por la fijación del tejido con paraformaldehído, se agregó la solución de borohidruro de sodio al 1% en KPBS durante 8 min. Inmediatamente después se lavaron los cortes con KPBS en dos sesiones de 5 min y dos por 10 min. Los cortes se incubaron con el anticuerpo primario policlonal anti-c-Fos inducido en conejo (5µl de anticuerpo αFos/Santa Cruz, 400 µl de NGS, y 20 mL de KPBS + Triton 0.3%). Durante 48 horas a 4°C. Se lavaron los cortes en KPBS dos veces, cada una de 10 min. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado de cabra anti-conejo (Vector, Vectastain) junto con KPBS y 0.3% de tritón a temperatura ambiente durante una hora. El exceso de anticuerpo se eliminó mediante dos lavados de PB cada uno de 10 min. Se agregó el complejo Avidina Biotina por una hora, se realizaron dos lavados por 10 minutos con KPBS. Para el revelado se incubaron las preparaciones en una solución de diaminobenzidina de 2 a 5 min. La reacción de revelado se inactivó mediante lavados con hidróxido de Na dos veces cada una de 5 min. Se montaron los cortes en porta-objetos tratados con Poly-L-lisina y 24 horas, después se procedió a la deshidratación para finalmente cubrir los tejidos con resina.

### **3.4.5 Doble inmunohistoquímica c-Fos/GAD67 y c-Fos/TH.**

La doble inmunohistoquímica se realizó con el mismo procedimiento solo que al terminar el procedimiento de inmunohistoquímica para la proteína c-Fos, se lavó nuevamente con PB y se incubó con el anticuerpo primario GAD67 o TH anti mouse. Se incubaron con un anticuerpo secundario anti mouse y se reveló con diaminobenzidina omitiendo el níquel para obtener una marca color café claro. El control negativo de la inmunotinción consistió en omitir el anticuerpo primario.

### **3.4.6 Cuantificación de la inmunoreactividad a c-Fos.**

Se determinó la cantidad de inmunoreactividad a la proteína c-Fos con el uso de un microscopio (Leica DiaStar) y se tomaron fotografías de secciones representativas de las áreas de interés. La cuantificación de la inmunoreactividad a la proteína c-Fos (IRF) se realizó en cuatro cortes para cada sujeto, basados en los campos terminales de las fibras aferentes de los nervios gustativos (Hamilton y Norgren, 1984), y siguiendo los criterios anatómicos de los subcampos del NTSr establecidos por Travers, 2002. La zona NTSr inicia en la parte caudal del núcleo coclear dorsal (NCD), en esta zona ocurre la llegada de las aferentes de la cuerda del tímpano (CT) donde se toma el primer corte para su análisis (Bregma  $-10.52$  a  $-11.96$ ) al que se le denominó N1. La siguiente zona de análisis es la parte intermedia del NTSr la cual recibe información proveniente del glossofaríngeo (GL), sin descartar la sobreposición de las aferentes de la CT. Esta zona se ubica aproximadamente en Bregma  $-12.30$  a  $-12.80$  y se le denominó N2. El tercer corte se toma de la zona que recibe preferentemente terminales del GL y se ubica a aproximadamente en Bregma  $-13.24$

a  $-13.3$  y se le nombró N3. El último corte se obtuvo a nivel del área postrema (AP), donde se sabe que no se reciben aferencias gustativas directas, se ubican aproximadamente en Bregma  $-13.68$  a  $-14.08$  y se le denominó N4. Para cuantificar la distribución espacial de la inmunoreactividad a Fos, en cada sección coronal del NTSr se dividió en tres subcampos, trazando dos líneas paralelas separadas a la misma distancia en cada nivel a los que por su ubicación medial, media y lateral se les denominó subcampos 1, 2 y 3 respectivamente (King y col., 1999). La inmunoreactividad para c-Fos se reconoció como núcleos teñidos de color café oscuro. Se consideraron solo aquellos núcleos que estaban teñidos en su totalidad, oscuros y redondos.

### **3.4.7 Análisis estadístico**

Se analizó el número total de neuronas inmunoreactivas a Fos (IRF) en el NTSr por medio de un análisis de varianza ANOVA de dos factores, 6(estímulos sápidos: quinina, sacarosa, NaCl, agua, manipulado y no estimulado) X 3(edades: 5, 15 y 25). Para ver el efecto específico en cada uno de los niveles se realizó un ANOVA de tres vías 4(niveles) X 6(estímulos sápidos) X 3(edades), seguido de un análisis post-hoc para cada uno de los días y de los niveles. Para verificar el efecto en la distribución de las células en cada subcampo se utilizó un ANOVA de tres vías para el NTS 3(subnúcleos) X 6(estímulos sápidos) X 3(edades), seguido por un análisis *post-hoc*, prueba de Fisher LSD para cada uno de los niveles. El nivel mínimo de significación se fijó cuando  $p \leq 0.05$ .

## **CAPTULO IV**

### **Resultados**

#### **4.1 Ubicación del NTSr con Nissl**

El primer acercamiento al NTSr se realizó con ayuda del atlas de Paxinos y Watson, 1986, para la rata adulta. Considerando que no hay atlas de la rata postnatal del tallo cerebral, y para corroborar su ubicación anatómica de animales en desarrollo, se utilizó una serie de cortes del tallo cerebral de ratas de 5, 15 y 25 días de edad para ser procesados con la tinción de Nissl. En la Fig. 8, se pueden observar una serie de cortes teñidos con Nissl de una rata de 15 días de edad, que muestran los diferentes niveles donde se realizó el conteo de las células IRF lo que coincide con estudios previos que muestran que la zona del tallo cerebral está bastante desarrollada al momento de nacer, y que los núcleos de esta zona se encuentran en la ubicación que tendrán en la etapa adulta (Hironaka y col., 2000; Wickstrom y col., 2002; Lai y col., 2004).

#### **4.2 Tiempo de separación de la madre**

Con el objetivo de establecer un protocolo confiable de estimulación en ratas neonatas se realizaron diversas manipulaciones. En la Fig. 9, se muestra la inmunoreactividad a C-Fos (IRF) y una muestra control donde se omitió el anticuerpo primario de ratas de 15 días a las que se les aplicó quinina 0.003M. La primera manipulación que se realizó fue determinar el tiempo de separación de la madre que mayor IRF produjera, para lo cual se utilizaron tres periodos de separación de la madre de 2, 6 y 12 horas, se utilizaron animales de 15 días de edad a los que se les aplicó quinina 0.003 M y se observó mayor inmunoreactividad en el grupo que se separó por 12 horas (Fig. 10).

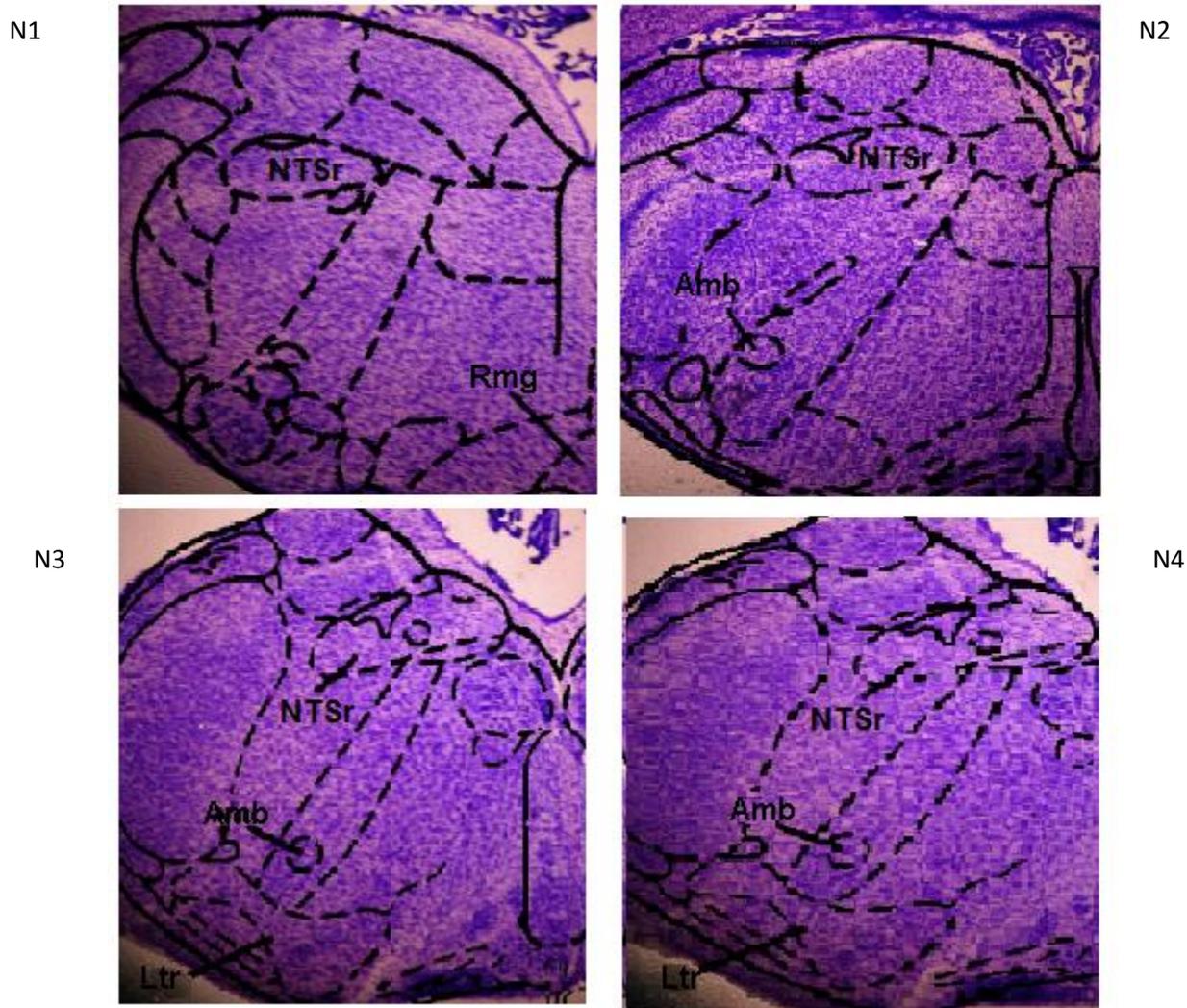


Fig. 8. Fotomicrografías de cortes coronales del tallo cerebral teñidos con la técnica de Nissl de una rata de 15 días de edad. Los niveles aquí representados (N1, N2, N3 y N4) muestran el lugar donde se realizó el conteo de las células IRF en el NTSr. Núcleo del tracto solitario rostral (NTSr), núcleo raphe magno (Rmg), núcleo ambiguo (Amb), formación reticular lateral (Ltr).

### 4.3 Concentración de quinina

Otra variable que se consideró para establecer el protocolo general fue la concentración de los estímulos sápidos utilizados. Se conoce que en ratas adultas la concentración adecuada para la inducción de c-Fos en el NTSr es quinina 0.003 M, NaCl 1 M y

sacarosa 1 M. Sin embargo, los estudios conductuales muestran que 0.0003 M, generan reflejos gustofaciales, por lo que no teníamos clara la concentración adecuada. Para responder esta pregunta se utilizaron animales de 15 días de edad a los que se les aplicó quinina en distintas concentraciones 0.03 M, 0.003 M y 0.0003 M y se observó la cantidad de IRF.

Los resultados que se obtuvieron fueron contradictorios ya que cantidades mínimas inducen mayor inmunoreactividad en zonas más rostrales del NTSr comparado con las otras concentraciones, y la concentración mayor produce IRF en zonas rostrales pero no en zonas más caudales. Sin embargo, el dato más confiable que se tuvo fue la concentración intermedia ya que produjo mayor IRF que la concentración más alta y menos que la concentración más baja; por lo cual se decidió utilizar la concentración de 0.003 M por las siguientes razones: induce IRF en las zonas del NTSr asociadas a la repuesta de estímulos amargos, es la concentración que se ha usado para inducir c-Fos en animales adultos, la cual produce cantidades cuantificables de c-Fos, y permite tener una referencia clara para comparar nuestros resultados con estudios previos de inmunomarcaje a c-Fos (Fig. 11).

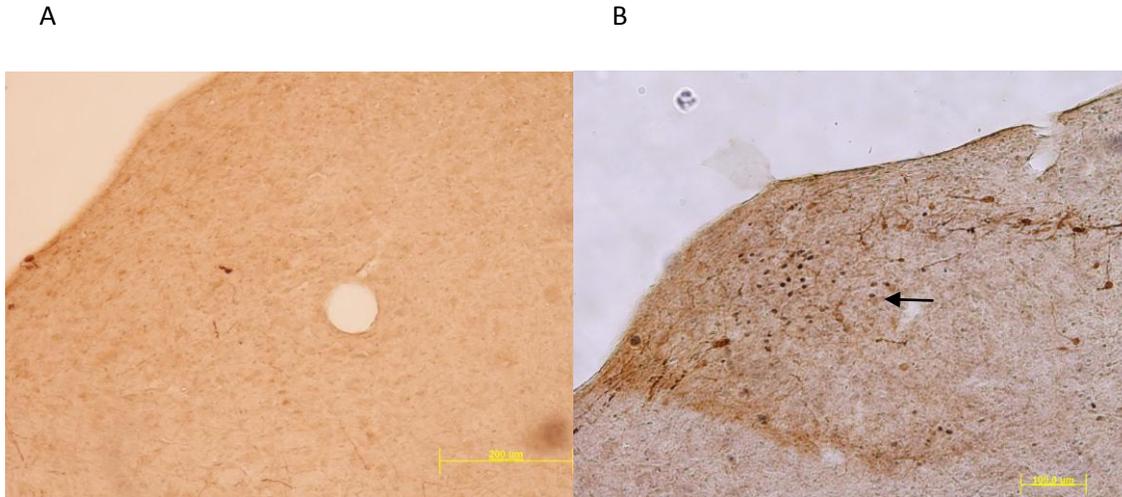


Fig. 9. Fotomicrográficas de cortes coronales del NTSr A. En el control negativo se omitió el anticuerpo primario. B. Fotomicrográficas posteriores a la aplicación de quinina 0.003 M en una rata de 15 días de edad, se aprecian células IRF (flecha).

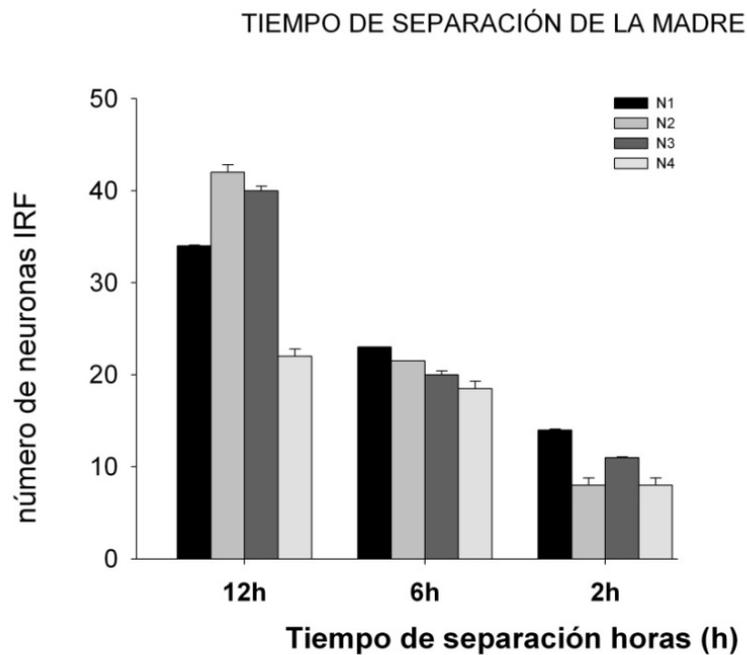


Fig. 10. Número de neuronas (Media  $\pm$  EEM) IRF en el NTSr, en respuesta a la aplicación de quinina 0.003 M en diferentes tiempos de separación de crías de 15 días de edad. Las gráficas muestran los promedios y el error estándar de cada grupo, n=4.

#### DIFERENTES CONCENTRACIONES DE QUININA

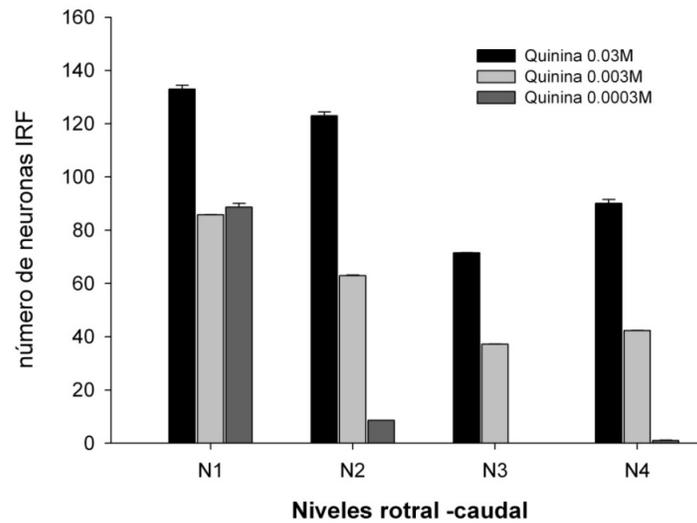


Fig. 11. Número de neuronas (Media  $\pm$  EEM) IRF en el NTSr, en respuesta a la aplicación de quinina en diferentes concentraciones en crías de 15 días de edad en el NTSr. Las gráficas muestran los valores promedio y el error estándar de cada grupo, n=4.

Con base en los resultados anteriores el tiempo de separación que se utilizó fue de 12 horas para establecer el protocolo general de estimulación. La concentración de los estímulos fue la siguiente: sacarosa 1M, NaCl 1M y quinina, 0.003 M. Se incluyó un grupo al que solo se le aplicó agua por considerar que todos los estímulos están diluidos en agua y debido a sus propiedades insaboras, como grupo control. Para descartar el efecto de la manipulación que se realizó en los grupos al aplicarles el estímulo, se formó otro grupo que fue sometido a la manipulación sin aplicación de estímulo sávido (M). Finalmente, se agregó otro grupo control que no fue manipulado en ningún momento sino hasta el sacrificio (SE) Fig. 12.

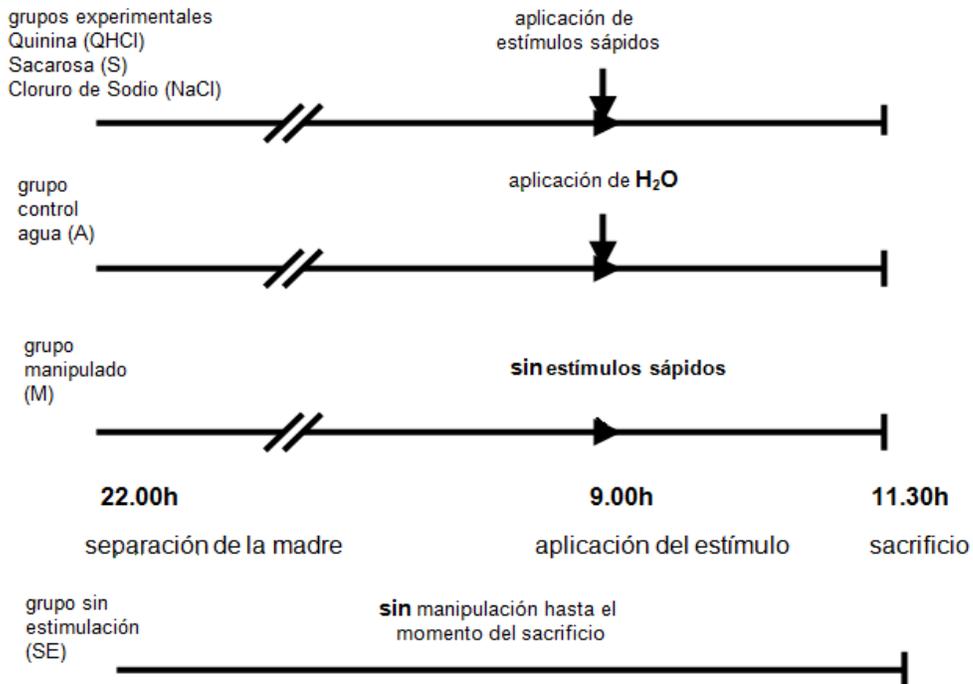


Fig. 12. Organización de los diferentes grupos experimentales que muestra la hora de separación, la hora de aplicación de los distintos estímulos y la hora del sacrificio.

Los resultados que se presentan de este apartado en adelante fueron obtenidos según la descripción de la metodología anterior (Fig. 12). El análisis de las secciones coronales del NTSr de ratas lactantes sujetas a condiciones experimentales muestra que el aislamiento y la restricción de alimento y agua produce un nivel basal de expresión de c-Fos en todas las edades estudiadas. Este nivel basal fue técnicamente importante porque se logró inducir una respuesta significativamente mayor en los grupos estimulados con sustancia sápidas (quina y sacarosa) (Fig. 13).

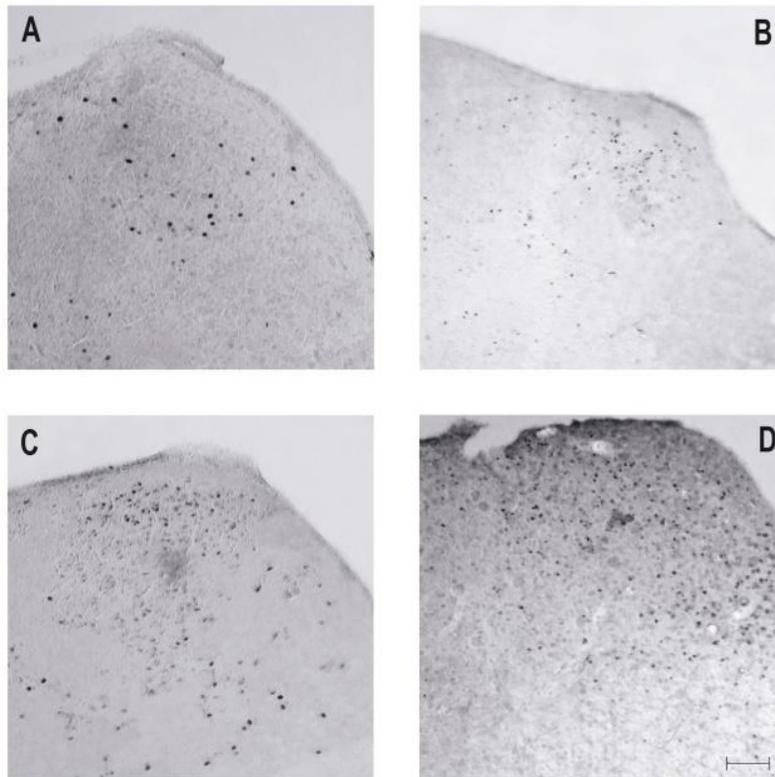


Fig. 13. Fotomicrografías de secciones coronales del NTSr al nivel de Bregma -13.24 mm (N2) del presente estudio. A. Agua y B Estimulación con NaCl fueron asociados con una menor IRF. Por el contrario, después de la estimulación con C. sacarosa y D. quinina la IRF fue mayor. Calibración 200  $\mu$ m.

#### **4.4 Distribución general de c-Fos en el eje rostro caudal del NTSr en respuesta a los estímulos gustativos**

Para el análisis de los datos en los diferentes niveles y subcampos del NTS se descartaron a los grupos SE y M por inducir muy poca IRF en todas las áreas y edades evaluadas, sólo se consideraron los grupos experimentales con estímulos sápidos y el grupo estimulado con agua como control. La media del número de neuronas IRF de los

tres subcampos fue sumada y cuantificada en las diferentes edades estudiadas en el NTSr para analizar la inmunoreactividad en los diferentes niveles rostro caudales como se muestra en la Fig. 14. El ANOVA general muestra que la IRF indica un efecto significativo asociado a las diferentes condiciones de estimulación gustativa,  $F(5,216)=5651.8$ ,  $p<0.001$ , fue modificado por la edad,  $F(2,216)=29$ ,  $p<0.001$  y por los niveles del NTSr  $F(3,216)=20.9$ ,  $p<0.001$ . Adicionalmente, hubo interacciones significativas entre el estímulo gustativo y la edad,  $F(10,216)=14.8$ ,  $p<0.001$ ; estímulo gustativo y los niveles del NTSr,  $F(15,216)=13.9$ ,  $p<0.001$ , y también se observaron interacciones entre estímulo gustativo, edad y niveles del NTSr,  $F(30,216)=1.9$ ,  $p<0.003$ . Las comparaciones *post hoc* en cada edad de desarrollo y estímulo gustativo se muestran en la Fig. 14.

#### **4.4.1 Distribución específica en el eje rostro caudal del NTSr en respuesta a quinina**

Comparaciones estadísticas en el número de IRF en las ratas estimuladas con quinina muestran diferencias significativas asociadas con la edad,  $F(2,9)=86.14$ ,  $p<0.001$ , y niveles del NTSr,  $F(3,27)=9.98$ ,  $p<0.001$ . Adicionalmente, no se obtuvieron interacciones entre la edad y los niveles del NTSr. Las comparaciones *post hoc* en diferentes niveles y edades se muestran en la Fig. 15. A lo largo del análisis, la quinina induce consistentemente mayores valores de IRF comparados con sacarosa, agua y NaCl, excepto la sacarosa en los días 5 y 25 de edad en el N1, adicionalmente la

quinina induce mayor IRF en la edad de 15 días y de forma consistente en los en los cuatro niveles analizados, con mayor IRF en los niveles N3 y N4 comparado con la sacarosa, el NaCl y agua. (Fig. 14).

#### **4.4.2 Distribución específica en el eje rostro caudal del NTSr en respuesta a sacarosa**

La sacarosa indujo mayor IRF comparada con el agua y el análisis estadístico muestran diferencias significativas asociadas a la edad,  $F(2,9)=31.4$ ,  $p<0.001$ , y los niveles del NTSr,  $F(3,27)=31.5$ ,  $p<0.001$ . No se observaron interacciones entre estos factores. La comparación *post hoc* en cada edad de desarrollo analizada se muestran en la Fig. 14.

La sacarosa induce mayor IRF que los grupos estimulados con NaCl y agua y menor que la quinina. De forma general induce mayor IRF en el N1 que en los niveles más caudales del NTSr, adicionalmente hay un incremento asociado a la edad Fig. 14.

#### **4.4.3 Distribución específica en eje rostro caudal del NTSr en respuesta a NaCl**

La comparación estadística en el número de IRF en el grupo estimulado con NaCl no indica efectos asociados con la edad, pero fueron modificados por el nivel del NTSr,  $F(3,27)=5.97$ ,  $p<0.001$ . Por otra parte, no se observaron interacciones significativas entre las edades y los niveles del NTSr. Las comparaciones *post hoc* en las diferentes edades del desarrollo se muestran en la figura 14.

El NaCl provoca menor IRF que la quinina, la sacarosa y el grupo estimulado con agua en los niveles evaluados y en las distintas edades (Fig. 14).

#### **4.4.4 Distribución específica en el eje rostro caudal del NTSr en respuesta a agua**

Las comparaciones estadísticas de la IRF en el grupo estimulado con agua no muestran diferencias significativas asociadas a la edad, pero fueron modificadas por los niveles de NTSr,  $F(3,27)=3.03$ ,  $p<0.046$ ; no se observaron interacciones significativas entre la edad y los niveles el NTSr. La comparación *post hoc* de cada edad en el desarrollo se presenta en la Fig. 14. El agua provoca IRF en el NTSr menor que los grupos estimulados con quinina y sacarosa y similar a la del NaCl en los distintos niveles y edades analizadas.

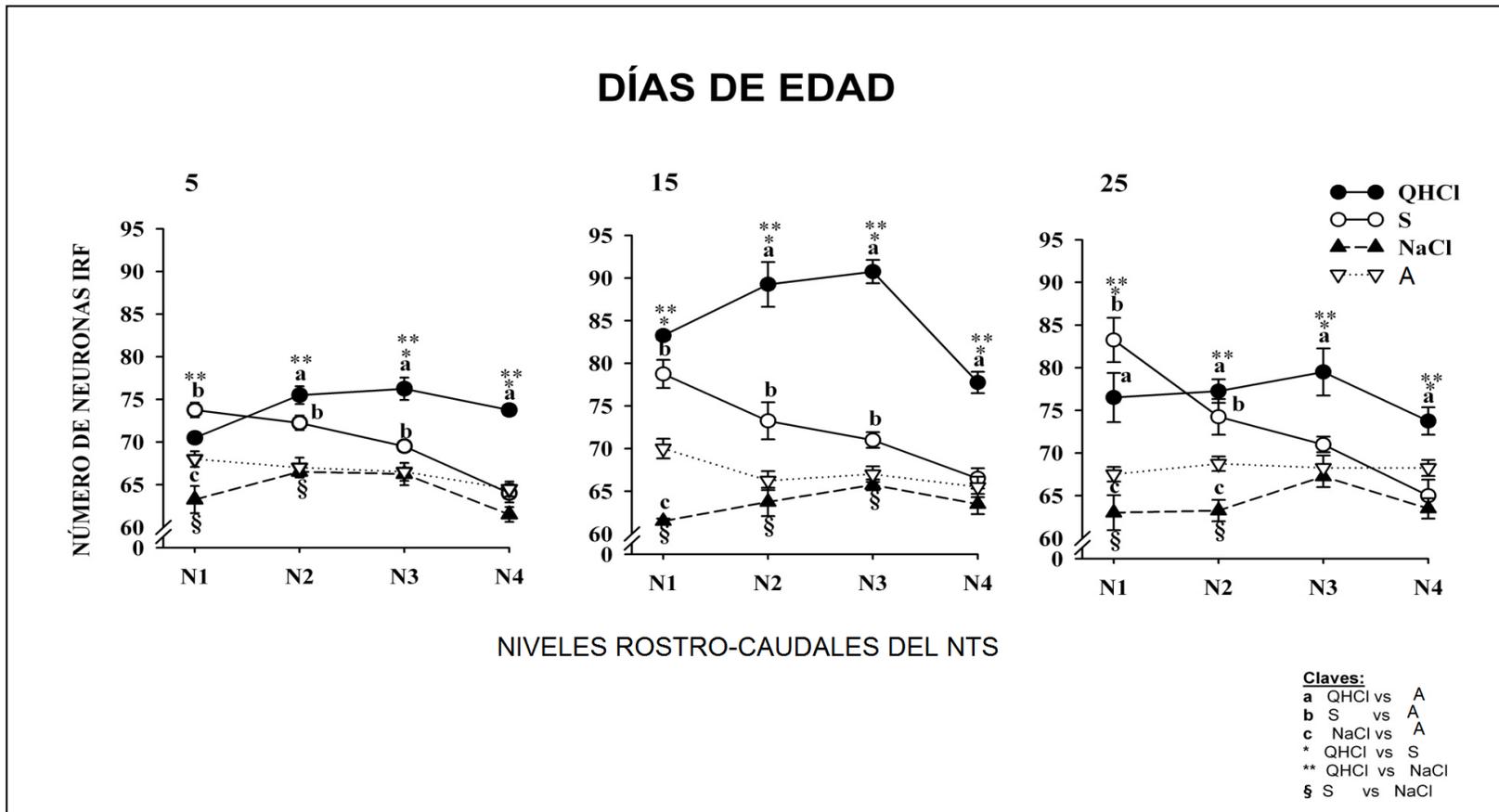


Fig. 14. Número de neuronas (Media  $\pm$  EEM) IRF en diferentes niveles del NTSr. El número de neuronas IRF está sumado en los subnúcleos de animales en cuatro condiciones de estimulación. El análisis *post hoc* indica que ambas quinina y sacarosa resultaron en una mayor IRF comparada con los otros grupos ( $p < 0.05$  indicada por a y b). Pero el incremento en la IRF inducida por NaCl comparado con el agua fue significativo en algunos casos ( $p < 0.05$ ). QHCl, quinina; S, sacarosa; W, agua. a QHCl vs A, b S vs A, c NaCl vs A, \* QHCl vs S, \*\* QHCl vs NaCl, § S vs NaCl.



#### **4.5 Distribución general de c-Fos en el eje medio lateral del NTSr en respuesta a los estímulos gustativos**

La suma de las neuronas IRF en los diferentes niveles permite hacer un análisis en el plano medial así, el número de neuronas IRF distribuidas sobre los subcampos medial, intermedio y lateral del NTSr en las distintas edades se muestra en la Fig. 15. El ANOVA general indica diferencias significativas en función del estímulo gustativo,  $F(5,810)=4323.6$ ,  $p<0.001$ , la edad,  $F(2,810)=22.19$ ,  $p<0.001$  y los subcampos del NTSr,  $F(2,280)=10.80$ ,  $p<0.001$ .

Adicionalmente, se encontraron interacciones significativas entre el estímulo gustativo y la edad,  $F(5,810)=11.30$ ,  $p<0.001$ , los estímulos gustativos y los subcampos,  $F(10,810)=40.88$ ,  $p<0.001$ ; edad y los subcampos del NTSr,  $F(4,810)=4.86$ ,  $p<0.001$ , y estímulo gustativo, edad y los subcampos,  $F(20,810)=5.10$ ,  $p<0.001$ . Las comparaciones *post hoc* de cada edad en el desarrollo se muestran en la Fig. 15.

##### **4.5.1 Distribución específica en los diferentes subcampos del NTSr en respuesta a quinina**

La comparación estadística en el número de neuronas IRF en el grupo estimulado con quinina muestran diferencias significativas asociadas con la edad,  $F(2,44)=24.46$ ,  $p<0.001$  y subcampos del NTSr;  $F(2,88)=125.30$ ,  $p<0.001$ . Adicionalmente, se observaron interacciones significativas entre la edad y los subcampos del NTSr,  $F(4,88)=14.80$ ,  $p<0.001$ . Las comparaciones *post hoc* en cada día del desarrollo

analizado se muestran en la Figura 15. Los valores de IRF inducida por quinina en general mantienen valores altos en los subcampos mediales comparados con los valores inducidos por la sacasora, el NaCl y agua y disminuye hacia la zona lateral en las tres edades valoradas.

#### **4.5.2 Distribución específica en los diferentes subcampos del NTSr en respuesta a sacarosa**

El valor medio del número de IRF en el grupo estimulado con sacarosa no fue afectado por la edad pero si por los subcampos analizados  $F(2,88)=34.55$ ,  $p<0.001$ . Por otra parte, se encontraron interacciones significativas entre la edad y los subcampos del NTSr,  $F(4,88)=7.4$ ,  $p<0.02$ . Las comparaciones *post hoc* a lo largo de las diferentes edades del estudio se observan en la Figura 15. El estímulo de la sacarosa produce una mayor IRF en la zona intermedia y lateral comparada con la quinina en las edades analizadas.

#### **4.5.3 Distribución específica en los diferentes subcampos del NTSr en respuesta a NaCl y agua**

La comparación estadística del número de IRF en el grupo estimulado con NaCl de las ratas no fue afecta por la edad y subcampos, y tampoco hubo interacciones entre los factores observados.

La comparación estadística en el número de IRF en el grupo estimulado con agua no muestra diferencias significativas por la edad o subcampos. La interacción entre los

estímulos gustativos y los subcampos en el NTSr muestra diferencias significativas,  $F(4,88)=3.67$ ,  $p<0.01$ . Las comparaciones *post hoc* en los días de estudio se muestran en la Figura 15.

## DÍAS DE EDAD

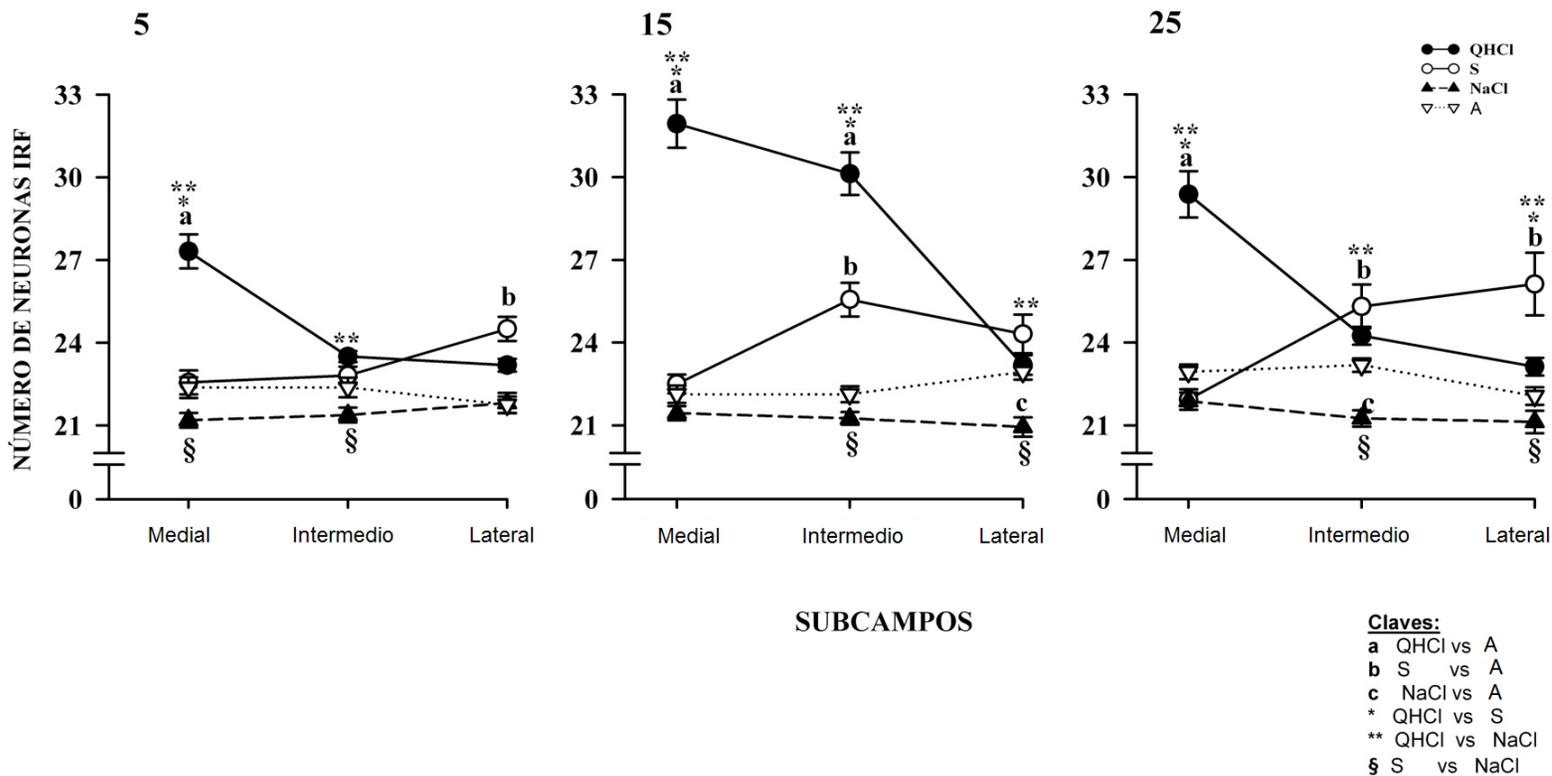


Fig. 15. Número de neuronas (Media  $\pm$  EEM) IRF en diferentes subcampos del NTSr. El número de neuronas IRF está sumado en los niveles de animales en cuatro condiciones de estimulación. El análisis *post hoc* indica que ambas quinina y sacarosa inducen mayor IRF en las zonas medial y lateral respectivamente y significativamente mayor en la edad 25 días. ( $p < 0.05$  indicado por a y b). El incremento de IRF inducido por NaCl comparado con agua fue solo significativo en algunos casos ( $p < 0.05$ ). QHCl, quinina; S, sacarosa; W, agua. a QHCl vs A, b S vs A, c NaCl vs A, \* QHCl vs S, \*\* QHCl vs NaCl, § S vs NaCl.

#### 4.6 Colocalización de c-Fos /GAD67

Respecto a las observaciones realizadas en la doble inmunohistoquímica para c-Fos/GAD67, los resultados son más prometedores, las ratas que fueron estimuladas con quinina a los 15 días de edad en su porción rostral muestran una gran cantidad de somas de neuronas positivas a GAD67 que se continua en la zona intermedia y caudal del núcleo (Fig. 17), sin embargo, la colocalización fue mayor en zonas más rostrales y mediales del NTS. Por lo tanto, se requiere un análisis minucioso y cuantitativo para determinar el porcentaje real de las neuronas en cada zona de análisis, para determinar su participación en el procesamiento de la información gustativa.

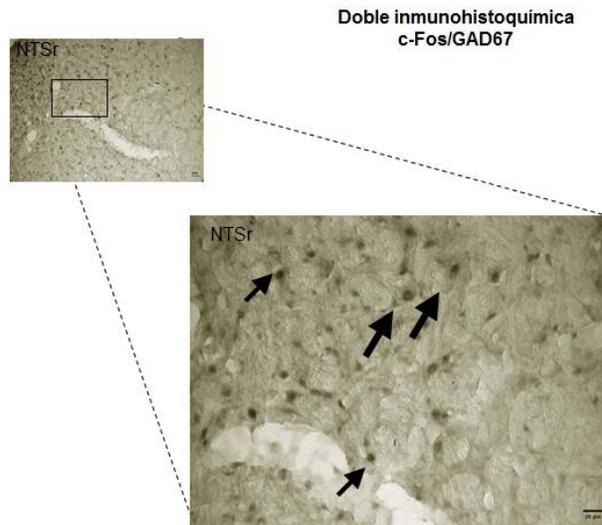


Fig. 17. La doble inmunohistoquímica c-Fos/GAD67 muestra la población de neuronas en la zona rostral del NTSr, de una ratita de 15 días de edad estimulada con quinina. Las flechas indican la colocalización.

Los resultados muestran la colocalización de neuronas activadas (IRF) por la quinina en el NTSr y que son de fenotipo gabaérgico, no se determinó el porcentaje real pero el análisis cualitativo muestra que este tipo neuronal puede tener una participación fundamental en el procesamiento de estímulos aversivos. Por otra parte, la colocalización de c-Fos/TH luego de la aplicación de quinina muestra que hay menor número de neuronas que colocalizan, sin embargo no se conoce el impacto real de las neuronas catecolaminérgicas en el procesamiento.

#### **4.7 Colocalización de c-Fos /TH**

Después de las observaciones de la IRF en el NTS tanto en el plano medio lateral como en el rostro caudal inducidas por los estímulos químicos, se realizó el análisis cualitativo de la doble inmunotinción para Fos y tirosina hidroxilasa, con la intención de determinar si la población de neuronas catecolaminérgicas está involucrada en la respuesta a la aplicación de quinina en ratas a los 15 días de edad comparado con el grupo estimulado con agua. La doble marca IRF/TH reveló que Fos se expresó en neuronas de fenotipo catecolaminérgico en el grupo de quinina y no hubo colocalización en el grupo de agua. La valoración cualitativa muestra que las neuronas catecolaminérgicas se localizan principalmente en las zonas caudales del NTS y en la zona ventral del núcleo, sólo pocas neuronas IRF son de este tipo, sin embargo se requiere un estudio con mayor precisión para determinar el porcentaje real de este tipo neuronal, en los diferentes niveles y subcampos estudiados así como en el resto de las edades involucradas (Fig. 16).

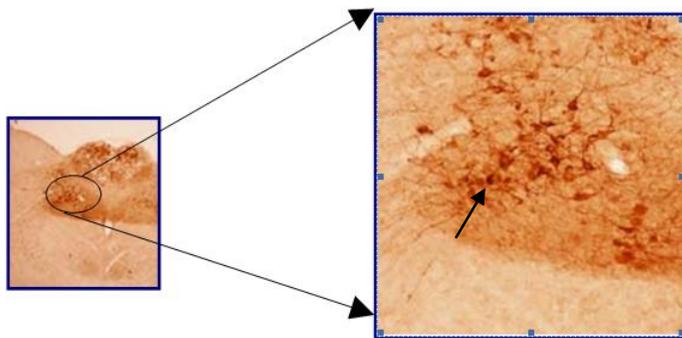


Fig. 16. La doble inmunohistoquímica c-Fos/TH muestra la población de neuronas que contienen la enzima tirosina hidroxilasa en la zona caudal del NTSr, de una rata de 15 días de edad estimulada con quinina. Las flechas indican colocalización.

## **CAPÍTULO V**

### **DISCUSION**

Los resultados del estudio describen la distribución de la IRF en respuesta a la estimulación gustativa provocada en el NTSr de ratas en desarrollo. Esta IRF corresponde al primer relevo sensorial del sistema gustativo que está funcionalmente unido a los botones gustativos en la periferia y al NPB en la ruta ascendente de la vía gustativa hacia la corteza cerebral (Sewards, 2004).

El sistema gustativo es un sistema indispensable para los mamíferos ya que permite la ingesta de alimento y evita el ingreso de sustancias tóxicas. La evidencia conductual disponible indica que los mamíferos altriciales ya poseen respuestas gustofaciales en edades tempranas, incluso al momento de nacer con escasa experiencia previa, antes de que la vía gustativa haya madurado anatómicamente. Los presentes resultados muestran la presencia de IRF en el NTSr inducida por quinina y sacarosa en ratas al día postnatal 5, lo que indica que las conexiones neuronales entre el NTSr y los receptores gustativos son operantes, aunque estructuralmente aún son inmaduras (prefuncionales) en esta etapa de la vida. Comparativamente se han observado resultados similares en el sistema olfativo, donde se detecta mayor actividad a c-Fos evocada por el olor a pimienta comparada con un ambiente libre de estímulos olfativos en ratas a la edad P0 (Guthrie y Gall, 2003). El sistema gustativo y olfatorio al nacer están bastante desarrollados, y en etapas postnatales cursan por un periodo de rápido crecimiento, lo que sugiere que estas respuestas posiblemente subyacen

funciones básicas de los recién nacidos como, la ingesta de alimento, el reconocimiento materno y el establecimiento de aprendizajes asociativos con estímulos gustativos del ambiente del nido como un mecanismo para ganar pronta experiencia y sobrevivir (Moriceau, 2006; Miller y Spear, 2008).

Por otra parte, los resultados dan evidencia de que la quinina induce intensa IRF principalmente en la zona ubicada en la porción medial del NTS justo a un lado del IV ventrículo. Estudios previos de Johanson y Shapiro, 1986 y Salas y col., 2012, muestran que la aplicación intraoral de quinina en ratas recién nacidas con escasa experiencia, muestran una intensa apertura de boca, reducción de lamido de labios y la presencia de gesticulaciones. Esto sugiere que la estimulación de la quinina sobre el dorso de la lengua activa no solo la población neuronal asociada a las características físicas del estímulo, sino también a la población involucrada en el aspecto hedónico y de movimientos faciales que evoca la quinina (Salas y col., 2012). Así que este complejo de respuestas indica que hay participación de grupos neuronales de la formación reticular, núcleo motor del facial y núcleo hipogloso entre otros núcleos del tallo cerebral que gobiernan las respuestas oromotoras (Whitehead 1988; Altshuler y col., 1989; King y col., 1999; Travers 2002; Travers y Travers, 2005). Por otra parte, se ha mostrado que otros estímulos de tipo amargo inducen el reflejo oromotor de rechazo e inducen IRF en la misma zona del NTSr, lo que sugiere que las neuronas IRF por una amplia gama de estímulos amargos incluida la quinina, contribuyen a la participación de las vías que subyacen a la respuesta oromotoras de la apertura de boca asociada a

estímulos aversivos, y que definen la cualidad hedónica de desagrado y por lo tanto, contribuyen como parte del substrato neuronal para la discriminación de esta cualidad gustativa en edades tempranas del desarrollo (Travers y Travers 2005).

No obstante, dan apoyo a esta activación particular estudios en los que la sección del nervio glossofaríngeo produce una clara atenuación de la IRF evocada por la quinina, difícil de distinguir de la producida por el agua en los grupos controles, incluso la apertura de la boca que genera la aplicación de quinina en los animales que tiene la sección del nervio glossofaríngeo, está disminuida, lo cual no ocurre al seccionar la cuerda del tímpano, nervio involucrado en la transmisión de la información dulce y salada (Altshuler y col. 1989; Grill y col., 1992).

Los presentes hallazgos indican que el estímulo gustativo produce IRF en el NTSr, principalmente asociado a la estimulación de los receptores gustativos más que a los receptores de tracto digestivo visceral, activado durante el periodo postingestivo que induce mayor IRF en la zona caudal del NTS. Aunque el tiempo necesario para que se produzca mayor expresión de c-fos es de alrededor de 90 min., esto implica que no se puede eliminar la participación de los receptores del tracto digestivo, sin embargo, se conoce que la estimulación de estas zonas induce mayor IRF en otros núcleos el tallo cerebral y en la zona caudal del NTS (Altshuler y col., 1989; Harrer y Travers, 1996). En resumen, no se puede descartar en los presentes hallazgos que la IRF evocada por quinina pueda ser la

combinación de ambos estímulos, dado que el NTS recibe información tanto de los nervios IX y el X. Sin embargo, esta sugerencia debe ser analizada con más detalle en futuras investigaciones.

Otra posible explicación sobre la mayor IRF inducida por la quinina puede ser la contribución del sistema somatosensorial, ya que todos los estímulos presentados incluida la quinina fueron diluidos con agua. El volumen colocado en la cavidad oral durante la estimulación fue el mismo para todos los estímulos, y estudios previos muestran que la estimulación oral de tipo táctil produce descargas del IX y X pares craneales hacia el NTSr, lo cual se observa en el grupo que solo fue estimulado con agua (Altshuler y col., 1989; Hanamori e Ishiko, 1993; Travers y Norgren, 1995; Harrer y Travers, 1996; Travers y Hu, 2000). Sin embargo, es notoriamente distinto el inmunomarcaje neuronal del correspondiente a la estimulación con sacarosa y quinina.

Los datos muestran que la IRF evocada por la sacarosa en general mantiene bajos valores comparados con los de la quinina, pero mayores a los producidos por el NaCl y el agua a lo largo de todas las edades analizadas. Posteriormente, declina hacia el nivel caudal excepto en el día P5, en que se observa también mayor IRF hacia los subcampos laterales en las diferentes edades analizadas. Este perfil de IRF asociado a la aplicación de sacarosa es congruente con la alta preferencia de los recién nacidos por la sacarosa (Hudson y Distel, 1999).

La IRF inducida por el NaCl en el NTSr en las diferentes edades del estudio fue similar a la producida por el agua, esto puede estar asociado a la concentración que se utilizó en el estudio, posiblemente los receptores gustativos fueron activados a una muy baja intensidad lo cual produjo poca activación neuronal en el NTSr. Por otra parte, estudios previos muestran que el sistema gustativo se comienza a desarrollar desde la etapa de gestación, y el NaCl es un componente básico del líquido amniótico en el cual el feto se desenvuelve. Por lo tanto, esto sugiere que para inducir una mayor activación neuronal asociada a estímulos salados, se deba utilizar una mayor concentración a la utilizada en este estudio.

Actualmente hay mucha especulación acerca de la información de las cualidades gustativas contra la respuesta refleja evocada por estímulos sápidos, que puede ocurrir desde los receptores y continuar en el NTSr y en el NPB en su ruta hacia centros corticales, la otra ruta de proyección es hacia la formación reticular que inicia los reflejos fisiológicos, incluyendo los involucrados en la en la respuesta oromotora desencadenada por la estimulación sávida (Roper, 2009). Al parecer esta topografía esta relacionada con las respuesta específicas de rechazo a sustancias potencialmente tóxicas, lo que en este núcleo se considera topografía el circuito que pudiera estar regulando estas respuesta aún no es claro, sin embargo el hecho de que funcionalmente podamos definir neuronas implicadas con una conducta específica ayuda a entender las conexiones críticas que se establecen durante el desarrollo y los mecanismos que están involucrados en esta respuesta (Travers y col. 2007).

La observación de colocalización c-Fos/GAD67 indica la quinina inducen la expresión de c-Fos en neuronas de tipo gabaérgico y se encuentran ubicadas en la zona ventral y medial del NTSr, zona que proyecta principalmente a la FR coincide con información previa (Halsell y col., 1996), sin embargo, se requiere un análisis cuantitativo detallado para establecer los fenotipos celulares y en particular la participación de GABA en la respuesta de rechazo oromotor a estímulos aversivos.

La técnica de inmunohistoquímica para Fos tiene algunas limitantes, una de ellas es que la expresión de c-fos inducida por estímulos sucede solo en aquellas neuronas en las que se genera una cantidad suficiente de actividad neuronal. En algunas regiones cerebrales, es difícil inducir la expresión de c-fos y eso puede estar relacionado a los mensajeros químicos que regulan la expresión de c-fos o por la expresión preferencial de factores de transcripción diferentes a la de c-fos (Dragunow y Faull, 1989; Sheng y Greenberg, 1990; Morgan y Carrant, 1991). Por lo que no se descarta el hecho de que algunas neuronas activadas por la quinina puedan escapar a la observación, y que las IRF solo represente una subpoblación activada.

Los resultados sugieren una relación topográfica interesante, entre el estímulo gustativo y los patrones de activación neuronal central en el NTSr que operan en etapas tempranas del desarrollo. Las observaciones de IRF en P5 asociada a los diferentes estímulos: sacarosa y quinina muestran una distribución espacial

específica similar a los animales adultos y que cambia en las edades de P15 y P25.

Estos resultados sugieren que este subcampo del NTSr juega un papel importante durante las primeras dos semanas de vida, aunque el detalle de su desarrollo es desconocido. En estos procesos, la sinaptogénesis de las fibras sensoriales aferentes, que se originan en los botones gustativos, y sus proyecciones a la formación reticular, la corteza gustativa, amígdala y otras áreas. Así como la maduración metabólica del tallo cerebral y los niveles de neuromoduladores y neurotransmisores inhibitorios y excitatorios, también puede contribuir a la maduración postnatal y al funcionamiento del NTSr (Zhang y Ashwell, 2001; May y col., 2008).

En este contexto, la edad es un factor importante para modular el desarrollo postnatal en función del número de IRF del día P5 al P15, el momento justo en que los receptores gustativas aún están en fase de maduración. Los resultados sugieren que los patrones de activación específicos a estímulos gustativos en el NTSr se establecen durante el periodo perinatal, y cursan por un periodo de organización, remodelación y funcionalidad durante el periodo neonatal. No obstante se necesitan más estudios al respecto que contribuyan a comprender las propiedades plásticas de las estructuras del tallo cerebral, que son un substrato importante y fundamental para la supervivencia y la adquisición temprana de experiencia del recién nacido. Los hallazgos aquí presentados sobre el gobierno

de la ingesta temprana de alimento, son relevantes porque se suman al bloque de funciones esenciales para la supervivencia del recién nacido del tallo cerebral, en una etapa de la vida en la que el neonato, no dispone aún de todos los recursos anatómico funcionales que lo adapten exitosamente a las demandas medioambientales.

## **CAPÍTULO VI**

### **CONCLUSIONES**

- La estimulación con sustancias sápidas aversivas (quinina) y placenteras (sacarosa) en ratas de 5 días de edad activa los neuronas del NTSr, lo cual confirma la participación del NTSr en la vida temprana.
- La aplicación de quinina y sacarosa induce mayor IRF en la edad de 15 días en comparación a la IRF de los 5 y 25 días, sugiriendo el establecimiento de un cambio plástico del tejido neuronal del sistema gustativo, asociado a los procesos de maduración del sistema gustativo.
- La quinina induce una distribución homogénea en el eje rostro caudal y en mayor IRF en la porción medial del NTSr en todas las edades estudiadas.
- La sacarosa induce mayor IRF en las zonas más rostrales y menos en las regiones caudales y en la porción lateral del NTSr en las edades aquí analizadas.
- Las neuronas IRF tanto para la quinina como para la sacarosa, mantiene desde el nacimiento una distribución característica.

## CAPITULO VII

### REFERENCIAS

Adler E, Hoon M, Mueller K, Chandrashekar J, Ryba N y Zuker C. 2000. A Novel Family of Mammalian Taste Receptors. *Cell*. 100: 693-702.

Altshuler SM, Bao X, Bieger D, Hopkins DA y Miselis RR. 1989. Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the rat: sensory ganglia and nuclei of the solitary and spinal trigeminal tracts. *J Comp Neurol*. 283: 248-268.

Amirlak I y Dawson K. 2000. Hypernatraemia in early infancy. *Ann Trop Paediatr*. 20: 173-177.

Andresen MC y Kunze DL. 1994. Nucleus tractus solitarius Gateway to neural circulatory control. *Annu Rev Physiol*. 56: 93-116.

Andrew BL. 1956. A functional analysis of the myelinated fibers of the superior laryngeal nerve of the rat. *J Physiol*. 133: 420-432.

Bachmanov AA, Li X, Li S, Neira M, Beauchamp GK y Azen EA. 2001. High-resolution genetic mapping of the sucrose octaacetate taste aversion (Soa) locus on mouse Chromosome 6. *Mamm Genome*. 12: 695-699.

Beckman ME y Whitehead MC. 1991. Intramedullary connections of the rostral nucleus of the solitary tract of the hamster. *Brain Res*. 557: 265-279.

Beverly AS y Bockstaele EJ. 2006. Divergent projections of catecholaminergic neurons in the nucleus of the solitary tract to limbic forebrain and medullary autonomic brain regions. *Brain Res.* 117: 69-79.

Blessing WW y Gai WP. 1997. The caudal pons and medulla oblongata. En: Bloom, F. E. (Ed.): *Handbook of Chemical Neuroanatomy; The Primate Nervous System*. Amsterdam: Elsevier Science.

Boucher Y, Simons CT, Cuellar JM, Jung SW, Carstens MI y Carstens E. 2003. Activation of brain stem neurons by irritant chemical stimulation of the throat assessed by c-fos immunohistochemistry. *Exp Brain Res.* 148: 211-218.

Bradley RM y Mistretta CM. 1975. Fetal sensory receptors. *Physiol Rev.* 55: 352-382.

Brake SC, Sager DJ, Sullivan R y Hofer M. 1982. The role of intraoral and gastrointestinal cues in the control of sucking and milk consumption in rat pups. *Dev Psychobiol.* 15: 529-541.

Brake SC, Sullivan R, Sager DJ y Hofer M. 1982a. Short- and long-term effects of various milk-delivery contingencies on sucking and nipple attachment in rat pups. *Dev Psychobiol.* 15: 543-556.

Brown M, Renehan WE y Schweitzer L. 2000. Changes in GABA-immunoreactivity during development of the rostral subdivision of the nucleus of the solitary tract. *Neuroscience.* 100: 849-859.

Buller KM y Day TA. 1996. Involvement of medullary catecholamine cells in neuroendocrine responses to systemic cholecystokinin. *J Neuroendocrinol.* 8: 819-824.

Carleton A, Accolla R y Simon SD. 2010. Coding in the mammalian gustatory system. *Trends in Neuroscience.* 33: 326-334.

Chan RK, Brown ER, Ericsson A, Kovacs KJ y Sawchenko PE. 1993. A comparison of two immediate-early genes, c-fos and NGFI-B, as markers for functional activation in stress-related neuroendocrine circuitry. *J Neurosci.* 13: 5126-5138.

Chan SH, Chang KF, Ou CC y Chan JY. 2004. Nitric oxide regulates c-fos expression in nucleus tractus solitarii induced by baroreceptor activation via cGMP-dependent protein kinase and cAMP response element-binding protein phosphorylation. *Mol Pharmacol.* 65: 319-325.

Chandrashekar J, Mueller KL, Hoon MA, Adler E, Feng L, Guo W, Zuker CS y Ryba NJ. 2000. T2Rs function as Bitter Taste Receptors. *Cell.* 100: 703-711.

Chen K, Yan J, Li J, Lu B y Zhao X. 2011. C-Fos expression in rat brainstem following intake of sucrose or sacarin. *Front Med.* 5: 294-301.

Ciriello, J. 1994. Central projections of baroreceptor afferent fibers in the rat. En: Robin, I., Barraco, A. (Eds.), *Nucleus of the Solitary Tract.* CRC Press, London, pp. 35–50.

Cleaton-Jones P. 1976. A denervation study of taste buds in the soft palate of the albino rat. *Arch Oral Biol.* 21: 79-82.

Cohen DR y Curran T. 1988. fra-1: a serum-inducible, cellular immediate-early gene that encodes a fos-related antigen. *Mol Cell Biol.* 8: 2063-2069.

Constantine-Paton M y Law MI. 1982. The development of maps and stripes in the brain. *Sci Am.* 6: 62-70.

Conte C, Ebeling M, Marcuz A, Nef P y Andres-Barquin PJ. 2002. Identification and characterization of human taste receptor genes belonging to the TAS2R family. *Cytogenet Genome Res.* 98: 45-53.

Conte C, Ebeling M, Marcuz A, Nef P y Andres-Barquin PJ. 2003. Evolutionary relationships of the Tas2r receptor gene families in mouse and human. *Physiol Genomics.* 14: 73-82.

Curran T y Morgan JI. 1995. Fos: an immediate-early transcription factor in neurons. *J Neurobiol.* 26: 403-412.

Czyzyk-Krzeska MF, Bayliss DA, Seroogy KB y Millhorn DE. 1991. Gene expression for peptides in neurons of the petrosal and nodose ganglia in rat. *Exp Brain Res.* 83: 411-418.

Dahl M, Erickson RP y Simon SA. 1997. Neural responses to bitter compounds in rats. *Brain Res.* 756: 22-34.

Dampney RA. 1994. The subretrofacial vasomotor nucleus: anatomical, chemical and pharmacological properties and role in cardiovascular regulation. *Prog Neurobiol.* 42: 197-227.

Dando R y Roper SD. 2009. Cell-to-cell communication in intact taste buds through ATP signalling from pannexin 1 gap junction hemichannels. *J Physiol.* 587: 5899-5906.

Davis BJ y Jang TA. 1988. A Golgi analysis of the gustatory zone of the nucleus of the solitary tract in the adult hamster. *J Comp Neurol.* 287: 388-396.

Davis BJ. 1993. GABA-like immunoreactivity in the gustatory zone of the nucleus of the solitary tract in the hamster. light and electron microscopic studies. *Brain Res Bull.* 30: 69-77.

Di Lorenzo PM y Victor JD. 2003. Taste response variability and temporal coding in the nucleus of the solitary tract of the rat. *J Neurophysiol.* 90: 1418-1431.

Di Nardo LA y Travers JB. 1997. Distribution of fos-like immunoreactivity in the medullary reticular formation of the rat after gustatory elicited ingestion and rejection behaviors. *J Neurosci.* 17: 3826-3839.

Ding JM, Carver WC, Terracio L y Buggy J. 1994. Proto-oncogene c-fos and the regulation of vasopressin gene expression during dehydration. *Brain Res Mol Brain Res.* 21: 247-255.

Dragunow M y Faull R. 1989. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods*. 29: 261-265.

Dudgeon SL y Hill D. 2011. Chorda Tympani nerve terminal field maturation and maintenance is severely altered following changes to gustatory nerve input to the nucleus of the solitary tract. *J Neurosci*. 31: 7591-7603.

Duncan GE, Johnson KB y Breese GR. 1993. Topographic patterns of brain activity in response to swim stress: assessment by 2-deoxyglucose uptake and expression of Fos- like immunoreactivity. *J Neurosci*. 13: 3932-3943.

Farbman AI y Hellekant G. 1978. Quantitative analyses of the fiber population in rat chorda tympani nerves and fungiform papillae. *Am J Anat*. 153: 509-521.

Felizardo R, Boucher Y, Braud A, Carstens E, Dauvergne C, Zerari-Mailly F. 2009. Trigeminal projections on gustatory neurons of the solitary tract: A double-label strategy using electrical stimulation of the chorda tympani and tracer injection in the lingual nerve. *Brain Res*. 1288: 60-68.

Fenelon VS, Poulain DA y Theodosis DT. 1993. Fos synthesis and neuronal activation: analysis of fos immunoreactivity in identified magnocellular neurons during lactation. *Ann N Y Acad Sci*. 689: 508-511.

Ferrell MF, Mistretta CM y Bradley RM. 1981. Development of chorda tympani taste responses in rat. *J Comp Neurol*. 198: 37-44.

Finberg L, Kiley J y Luttrell CN. 1963. Mass accidental salt poisoning in infancy. A study of a hospital disaster. JAMA. 184: 187-190.

Finley JC, Polak J y Katz DM. 1992. Transmitter diversity in carotid body afferent neurons: dopaminergic and peptidergic phenotypes. Neuroscience. 51: 973-987.

Fong AY, Stornetta RL, Foley CM y Potts JT. 2005. Immunohistochemical localization of GAD67-expressing neurons and process in the rat brainstem: subregional distribution in the nucleus tractus solitarius. J Comp Neurol. 493: 274-290.

Frank ME, Contreras RJ y Hettinger TP. 1983. Nerve fibers sensitive to ionic taste stimuli in the chorda tympani of the rat. J Neurophysiol. 50: 941-960.

Gil CF, Madden BP, Roberts LD, Evans L y King MS. 1999. A subpopulation of neurons in the rat rostral nucleus of the solitary tract that project to the parabrachial nucleus express glutamate-like immunoreactivity. Brain Res. 821: 251-262.

Giovannelli L y Bloom FE. 1992. c-Fos protein expression in the rat subfornical organ following osmotic stimulation. Neurosci Lett. 139:1-6.

Greenberg ME y Ziff EB. 1984. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. Nature. 311: 433-438.

Grill HJ y Norgren R. 1978. Neurological tests and behavioral deficits in chronic thalamic and chronic decerebrate rats. *Brain Res.* 43: 299-312.

Grill HJ, Schwartz GJ y Travers JB. 1992. The contribution of gustatory nerve input to oral motor behavior and intake-based preference. I. Effects of chorda tympani of glossopharyngeal nerve section in the rat. *Brain Res.* 573: 95-104.

Guth L. 1957. The effects of glossopharyngeal nerve transection on the circumvallate papilla of the rat. *Anat Rec.* 128: 715-731.

Guthrie KM y Gall C. 2003. Anatomic mapping of neuronal odor responses in the developing rat olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 455: 56-71.

Hall WG y Blass EM. 1977. Orogastric determinants of drinking in rats: interaction between absorptive and peripheral controls. *J Comp Physiol Psychol.* 91: 365-373.

Hall WG. 1979. Feeding and behavioral activation in infant rats. *Science.* 205: 206-209.

Hall, WG y Bryan, TE. 1980. The ontogeny of feeding in rats: II. Independent ingestive behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 94: 746-756.

Halpern BP y Nelson LM. 1965. Bulbar gustatory responses to anterior and to posterior tongue stimulation in the rat. *Am J Physiol.* 209: 105-110.

Halsell CB. 1998. Differential distribution of amygdaloid input across rostral solitary nucleus subdivisions in rat. *Ann. NY. Acad. Sci.* 855: 482-485.

Hamilton RB y Norgren R. 1984. Central projections of gustatory nerves in the rat. *J Comp Neurol.* 222: 560-577.

Hanamori T e Ishiko N. 1993. Cardiovascular responses to gustatory and mechanical stimulation of the nasopharynx in rats. *Brain Res.* 222: 349-358.

Harada S, Yamaguchi K, Kanemaru N y Kasahara Y. 2000. Maturation of taste buds on the soft palate of the postnatal rat. *Physiol Behav.* 68: 333-339.

Harada S, Yamamoto T, Yamaguchi K y Kasahara Y. 1997. Different characteristics of gustatory responses between the greater superficial petrosal and chorda tympani nerves in the rat. *Chem Senses.* 22: 133-140.

Harrer MI y Travers SP. 1996. Topographic organization of Fos-like immunoreactivity in the rostral nucleus of the solitary tract evoked by gustatory stimulation with sucrose and quinine. *Brain Res.* 711: 125-137.

Harrison TA. 2001. Chorda tympani nerve stimulation evokes Fos expression in regionally limited neuron populations within the gustatory nucleus of the solitary tract. *Brain Res.* 904: 54-66.

Hayama T, Ito S y Ogawa H. 1985. Responses of solitary tract nucleus neurons to taste and mechanical stimulations of the oral cavity in decerebrate rats. *Exp Brain Res.* 60: 235-242.

Helcke CJ y Rabcheusky A. 1991. Axotomy alters putative neurotransmitters in visceral sensory neurons of the nodose and petrosal ganglia. *Brain Res.* 551: 44-51.

Hill DL y Almlı CR. 1980. Ontogeny of chorda tympani nerve responses to gustatory stimuli in the rat. *Brain Res.* 197: 27-38.

Hill DL, Bradley RM y Mistretta CM. 1983. Development of taste responses in rat nucleus of solitary tract. *J Neurophysiol.* 50: 879-895.

Hill DL, Mistretta CM y Bradley RM. 1986. Effects of dietary NaCl deprivation during early development on behavioral and neurophysiological taste responses. *Behav Neurosci.* 100: 390-398.

Hironaka S, Shirakawa T, Toki S, Kinoshita K y Oguchi H. 2000. Feeding-induced c-fos expression in the nucleus of the solitary tract and dorsal medullary reticular formation in neonatal rats. *Neurosci Lett.* 293: 175-178.

Hökfelt T, Everitt BJ, Theodorsson-Norheim E y Goldstein M. 1984. Occurrence of neurotensinlike immunoreactivity in subpopulations of hypothalamic, mesencephalic, and medullary catecholamine neurons. *J Comp Neurol.* 222: 543-559.

Hollis Jh, Lightman SL y Lowry CA. 2004. Integration of systemic and visceral sensory information by medullary catecholaminergic systems during peripheral inflammation. *Ann NY Acad Sci.* 1018: 71-75.

Hoon MA, Adler E, Lindemeier J, Battey JF, Ryba NJ y Zuker CS. 1999. Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell*. 96: 541-551.

Hosley MA y Oakley B. 1987. Postnatal development of the vallate papilla and taste buds in rats. *Anat Rec*. 218: 216-222.

Hudson R y Distel H. 1999. The flavour of life: perinatal development of odor and taste preferences. *Schweizerische Med Wochenschr*. 129: 176-181.

Hughes JR, Hunt WK, Higgins ST, Bickel WK, Fenwick JW y Pepper SL. 1992. Effect of dose on the ability of caffeine to serve as a reinforcer in humans. *Behav Pharmacol*. 3: 211-218.

Hughes P y Dragunow M. 1995. Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol Rev*. 47: 133-178.

Ichikawa H, Jacobowitz DM, Winsky C y Helcke CJ. 1991. Calretinin-immunoreactivity in vagal and glossopharyngeal sensory neurons of the rat: distribution and coexistence with putative transmitter agents. *Brain Res*. 557: 316-321.

Imaki T, Shibasaki T, Hotta M y Demura H. 1993. Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor induces c-fos mRNA expression in brain regions related to stress responses: comparison with pattern of c-fos mRNA induction after stress. *Brain Res.* 616: 114-125.

Jacobs HL y Sharma KN. 1969. Taste versus calories: sensory and metabolic signals in the control of food intake. *Ann N Y Acad Sci.* 157: 1084-1125.

Johanson IB y Shapiro EG. 1986. Intake and behavioral responsiveness to taste stimuli in infant rats from 1 to 15 days of age. *Dev Psychobiol.* 19: 593-606.

Kaas JH. 1997. Topographic maps are fundamental to sensory processing. *Brain Res Bull.* 44: 107-112.

Kaczmarek L y Chaudhuri A. 1997. Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity. *Brain Res Brain Res Rev.* 23: 237-256.

Kalia M, Fuxe K y Goldstein M. 1985. Rat medulla oblongata: II. Dopaminergic, noradrenergic (A1 and A2) and adrenergic neurons, nerve fibers, and presumptive terminal processes. *J. Comp. Neurol.* 233: 308-332.

Katz LC y Shatz CJ. 1995. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science.* 5290: 1133-1138.

Kehoe P y Blass EM. 1985. Gustatory determinants of suckling in albino rats 5-20 days of age. *Dev Psychobiol.* 18: 67-82.

King CT y Hill DL. 1993. Neuroanatomical alterations in the rat nucleus of the solitary tract following early maternal NaCl deprivation and subsequent NaCl repletion. *J Comp Neurol.* 333: 531-542.

King CT, Travers SP, Rowland NE, Garcea M y Spector AC. 1999. Glossopharyngeal nerve transection eliminates quinine-stimulated fos-like immunoreactivity in the nucleus of the solitary tract: implications for a functional topography of gustatory nerve input in rats. *J Neurosci.* 19: 3107-3121.

King MS y Bradley RM. 1994. Relationship between structure and function of neurons in the rat rostral nucleus tractus solitarii. *J Comp Neurol.* 344: 50-64.

King MS. 2003. Distribution of immunoreactive GABA and glutamate receptors in the gustatory portion of the nucleus of the solitary tract in rat. *Brain Res Bull.* 60: 241-254.

Kinnamon JC, Taylor BJ, Delay RJ y Roper SD. 1985. Ultrastructure of mouse vallate taste buds. I. Taste cells and their associated synapses. *J Comp Neurol.* 235: 48-60.

Kovács KJ y Sawchenko PE. 1996. The paraventricular nucleus of the hypothalamus and the functional neuroanatomy of visceromotor responses to stress. *Prog. Brain Res.* 107: 201-222.

Kovács KJ. 1998. c-Fos as a transcription factor: a stressful review from a functional map. *Neurochem Int.* 33: 287-297.

Krimm RF y Hill DL. 1997. Early prenatal critical period for chorda tympani nerve terminal field development. *J Comp Neurol.* 378: 254-264.

Kumada M, Terui N y Kuwaki T. 1990. Arterial baroreceptor reflex: its central and peripheral neural mechanisms. *Prog Neurobiol.* 35: 331-361.

Lai CH, Tse YC, Shum DK, Yung KK y Chan YS. 2004. Fos expression in otolith-related brainstem neurons of postnatal rats following off-vertical axis rotation. *J Comp Neurol.* 470: 282-296.

Lasiter PS y Kachele DL. 1988. Organization of GABA and GABA-transaminase containing neurons in the gustatory zone of the nucleus of the solitary tract. *Brain Res Bull.* 21: 623-636.

Lawrence AJ y Jarrott B. 1996. Neurochemical modulation of cardiovascular control in the nucleus tractus solitarius. *Prog Neurobiol.* 48: 21-53.

Leonard NL, Renehan WE y Schweitzer L. 1999. Structure and function of gustatory neurons in the nucleus of the solitary tract. IV: The morphology and synaptology of GABA- immunoreactive terminals. *Neuroscience.* 92: 151-162.

Li CS y Smith DV. 1997. Glutamate receptor antagonist block gustatory afferent input to the nucleus of the solitary tract. *J Neurophysiol.* 77: 1514-1525.

Lindemann B. 2001. Receptors and transduction in taste. *Nature*. 413: 219-225.

Mack KJ y Mack PA. 1992. Induction of transcription factors in somatosensory cortex after tactile stimulation. *Brain Res Mol Brain Res*. 12: 141-147.

Matsunami H, Montmayeur JP, Buck LB. 2000. A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature*. 404: 601-604.

Max M, Shanker YG, Huang L, Rong M, Liu Z, Campagne F, Weinstein H, Damak S y Margolskee RF. 2001. *Tas1r3*, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to sweet responsiveness locus *Sac*. *Nat Genet*. 28: 58-63.

May OL, Erisir A y Hill DL. 2008. Modifications of gustatory nerve synapses onto nucleus of the solitary tract neurons induced by dietary sodium-restriction during development. *J Comp Neurol*. 508: 529-541.

Mbiene JP y Mistretta CM. 1997. Initial innervations of embryonic rat tongue and developing taste papillae: nerves follow distinctive and spatially restricted pathway. *Acta Anat*. 160: 139-158.

Mclaughlin LJ, Eller HD y Korol B. 1975. Acquisition and retention of an avoidance response by rats of different ages. *Dev Psychobiol*. 8: 233-239.

Melzer P y Steiner H. 1997. Stimulus-dependent expression of immediate-early genes in rat somatosensory cortex. *J Comp Neurol*. 380: 145-153.

Menella JA y Beauchamp GK. 1996. Understanding the origin of flavor preferences. *Chemical Sense*. 30: i242-i243.

Meyerhof W, Batram C, Kuhn C, Brockhoff A, Chudoba E, Bufe B, Appendino G y Behrens M. 2010. The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chem Senses*. 35: 157-170.

Miller IJ. 1977. Gustatory receptors of the palate. En: *Food intake and chemical senses*. Katsuki Y, Sato M, Takagi S, Oomura Y Eds. Tokyo: University of Tokyo. Pp 173-186.

Miller SS y Spear. NE. 2008. Olfactory learning in the rat neonate soon after birth. *Dev Psychobiol*. 50: 554-565.

Mistretta CM y Bradley RM. 1985. Development of taste. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol 8, Developmental Process In Psychobiology and Neurobiology. E. Blass, Ed. Plenum. Press, NY. Pp 205-236.

Moga MM, Saper CB y Gray TS. 1990. Neuropeptide organization of the hypothalamic projection to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 295: 662-682.

Mönnikes H, Lauer G y Arnold R. 1997. Peripheral administration of cholecystokinin activates c-fos expression in the locus coeruleus/subcoeruleus nucleus, dorsal vagal complex and paraventricular nucleus via capsaicin-sensitive vagal afferents and CCK-A receptors in the rat. *Brain Res.* 770: 277-288.

Montmayeur JP, Liberles SD, Matsunami H y Buck LB. 2001. A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus. *Nat Neurosci.* 4: 492-498.

Morgan JI y Curran T. 1991. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci.* 14: 421-451.

Moriceau S y Sullivan RM. 2006. Maternal presence serves as a switch between learning fear and attraction in infancy. *Nat Neurosci.* 9: 1004-1006.

Moritz ML y Ayus JC. 2002. Disorder of water metabolism in children: hyponatremia and hypernatremia. *Pediatr Rev.* 23: 371-380.

Mueller KL, Hoon MA, Erlenbach I, Chandrashekar J, Zuker CS y Ryba NJ. 2005. The receptors and coding logic for bitter taste. *Nature.* 434: 225-229.

Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba N y Zuker CS. 2001. Mammalian Sweet Taste Receptors. *Cell.* 106: 381-390.

Ninomiya Y, Tanimukai T, Yoshida S y Funakoshi M. 1991. Gustatory neural responses in preweanling mice. *Physiol Behav.* 48: 913-918.

Nizhnikov ME, Petrov ES, Varlinskaya EI y Spear NE. 2002. Newborn rats' first suckling experience: taste differentiation and suckling plasticity. *Physiol Behav.* 76: 181-198.

Norgren R. 1983. Afferent interactions of cranial nerves involved in ingestion. *J Auton Nerv Syst.* 9: 67-77.

Norgren, R. 1978. Projections from the nucleus of the solitary tract in the rat. *Neuroscience.* 3: 207-218.

Oakley B. 1991. Neuronal-epithelial interactions in mammalian gustatory epithelium. *Ciba Found Symp.* 160: 277-287.

Okada J y Miura M. 1992. Transmitter substances contained in the petrosal ganglion cells determined by a double-labeling method in the rat. *Neurosci Lett.* 146: 33-36

Onaka T. 2000. Catecholaminergic mechanisms underlying neurohypophysial hormone responses to unconditioned or conditioned aversive stimuli in rats. *Exp Physiol.* 85: 101S-110S.

Paxinos G y Watson Ch. 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.*

Pelchat ML y Brake SC. 1987. Sapid savvy in sucklings: the effect of quinine hydrochloride on intraoral negative pressure and intake by 11-13-day-old rat pups. *Dev Psychobiol.* 20: 261-275.

Petrov ES, Nizhnikov ME y Smotherman WP. 2000. Milk delivery schedules and stomach preloading alter patterns of suckling behavior by newborn rats on a surrogate nipple. *Behav Neurosci.* 114: 783-796.

Petrov ES, Varlinskaya EI, Spear NE. 2001. Self-administration of ethanol and saccharin in newborn rats: effects on suckling plasticity. *Behav Neurosci.* 115: 1318-1331.

Petrov T, Krukoff TL y Jhamandas JH. 1993. Branching projections of catecholaminergic brainstem neurons to the paraventricular hypothalamic nucleus and the central nucleus of the amygdala in the rat. *Brain Res.* 609: 81-92.

Pfaffman C. 1955. Gustatory nerve impulses in rat, cat, and rabbit. *J Neurophysiol.* 18: 429-440.

Renehan WE, Jin Z, Zhang X y Schweitzer L. 1996. Structure and function of gustatory neurons in the nucleus of the solitary tract: II. Relationships between neuronal morphology and physiology. *J Comp Neurol.* 367: 205-221.

Renehan WE, Massey J, Jin Z, Zhang X, Liu YZ y Schweitzer L. 1997. Developmental changes in the dendritic architecture of salt-sensitive neurons in the nucleus of the solitary tract. *Brain Res Dev Brain Res.* 102: 231-246.

Riche A, De Pommery J y Menetrey D. 1990. Neuropeptides and catecholamines in efferent projections of the nuclei of the solitary tract in the rat. *J. Comp. Neurol.* 293: 399–424.

Rico Y. 2003. Desarrollo de los reflejos gustofaciales en la rata (*Rattus norvegicus*) afectada por la desnutrición durante el periodo prenatal y neonatal. Tesis de licenciatura.

Rinaman L, Baker EA, Hoffman GE, Stricker EM y Verbalis JG. 1998. Medullary c-Fos activation in rats after ingestion of a satiating meal. *Am J Physiol.* 275: R262-R268.

Roper SD. 2009. Parallel processing in mammalian taste buds? *Physiol Behav.* 97:604-608.

Royer SM y Kinnamon JC. 1991. HVEM serial-section analysis of rabbit foliate taste buds: I. Type III cells and their synapses. *J Comp Neurol.* 306: 49-72.

Rubio L, Torrero C y Salas M. 2011. Basic brainstem taste responsivity: effects of perinatal influences. *eNeurobiología.* 2: 090511.

Rubio L, Torrero C, Regalado M y Salas M. 2004. Alterations in the solitary tract nucleus of the rat following perinatal food restriction and subsequent nutritional rehabilitation. *Nutr Neurosci.* 7: 291-300.

Sagar SM, Sharp FR y Curran T. 1988. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science.* 240: 1328-1331.

Saha S, Sieghart W, Fritschy M, Mc William PN y Batten TF. 2001. Gamma-aminobutyric acid receptor GABA(A) subunits in rat nucleus tractus solitarii (NTS) revealed by polymerase chain reaction (PCR) and immunohistochemistry. *Mol Cell Neurosci.* 17: 241-257.

Salas M, Torrero C, Regalado M y Rubio L. 2012. Development of the gustatory facial reflex in perinatally undernourished rats. *Journal of Behavioral and Brain Science.* 2: 308-314.

Saper CB. 2002. The central autonomic nervous system: conscious visceral perception and autonomic pattern generation. *Annu Rev Neurosci.* 25: 433-469.

Scammell TE, Price KJ y Sagar SM. 1993. Hyperthermia induces c-fos expression in the preoptic area. *Brain Res.* 618: 303-307.

Schwartz GJ y Grill HJ. 1985. Comparing taste-elicited behaviors in adult and neonatal rats. *Appetite.* 6: 373-386.

Sewards TV. 2004. Dual separate pathways for sensory and hedonic aspect of taste. *Brain Res Bull.* 62: 271-283.

Sheng M y Greenberg ME. 1990. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron.* 4: 477-485.

Smith DV y Hanamori T. 1991. Organization of gustatory sensitivities in hamster superior laryngeal nerve fibers. *J Neurophysiol.* 65: 1098-1114.

Smith DV y Li CS. 2000. GABA-mediated corticofugal inhibition of taste-responsive neurons in the nucleus of the solitary tract. *Brain Res.* 858: 408-415.

Smith DV, Li CS y Davis BJ. 1998. Excitatory and inhibitory modulation of taste responses in the hamster brainstem. *Ann N Y Acad Sci.* 855: 450-456.

Sonnenberg JL, Macgregor-Leon PF, Curran T y Morgan JI. 1989. Dynamic alterations occur in the levels and composition of transcription factor AP-1 complexes after seizure. *Neuron.* 3: 359-365.

Steiner JE. 1979. Human facial expressions in response to taste and smell stimulation. *Adv Child Dev Behav.* 13: 257-295.

Sugita M y Shiba Y. 2005. Genetic tracing shows segregation of taste neuronal circuitries for bitter and sweet. *Science.* 309: 781-785.

Suwabe T, Mistretta CH, Krull C y Bradley R. 2011. Pre and postnatal differences in membrane, action potential, and ion channel properties of rostral nucleus of the solitary tract neurons. *J Neurophysiol.* 106: 2709-2719.

Suzuki T. 2007. Cellular mechanisms in taste buds. *Bull Tokyo Dent Coll.* 48: 151-161.

Tessier-Lavigne M y Goodman CS. 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science.* 274: 1123-1133.

Torvick A. 1956. Afferent connections to the sensory trigeminal nuclei, the nucleus of the solitary tract and adjacent structures; an experimental study in the rat. *J Comp Neurol.* 106: 51-141.

Travagli RA, Hermann GE, Browing KN y Rogers RC. 2006. Brainstem circuits regulating gastric function. *Annu Rev Physiol.* 68: 279-305.

Travers JB y Smith DV. 1979. Gustatory sensitivities in neurons of the hamster nucleus tractus solitarius. *Sens Processes.* 3: 1-26.

Travers JB, Herman K, Yoo J y Travers SP. 2007. Taste reactivity and Fos expression in GAD-1-EGFP transgenic mice. *Chem Sense.* 32: 129-137.

Travers JB, Urbanek K y Grill HJ. 1999. Fos-like immunoreactivity in the brain stem following oral quinine stimulation in decerebrate rats. *Am. J. Physiol.* 277: R384–R394.

Travers JB. 1988. Efferent projections from the anterior nucleus of the solitary tract of the hamster. *Brain Res.* 457: 1-11.

Travers SP y Hu H. 2000. Extracellular projections of rNTS neurons expressing gustatory- elicited Fos. *J Comp Neurol.* 427: 124-138.

Travers SP y Nicklas K. 1990. Taste bud distribution in the rat pharynx and larynx. *Anat Rec.* 227: 373-379.

Travers SP y Norgren R. 1995. Organization of orosensory responses in the nucleus of the solitary tract of the rat. *J Neurophysiol.* 73: 2144-2162.

Travers SP y Travers JB. 2005. Reflex topography in the nucleus of the solitary tract. *Chem Senses.* 30: i180-i181.

Travers SP. 2002. Quinine and citric elicit distinctive Fos-like immunoreactivity in the rat nucleus of the solitary tract. *Am. J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 282: R1798-R1810.

Ueta Y, Kannan H, Higuchi T, Negoro H, Yamaguchi K y Yamashita H. 2000. Activation of gastric afferents increases noradrenaline release in the paraventricular nucleus and plasma oxytocin level. *J Auton Nerv Syst.* 78: 69-76.

Uga S y Hama K. 1976. Electron microscopic studies on the synaptic region of the taste organ of carps and frogs. *J Electron Microsc.* 3: 269-277.

Van Buskirk RL y Smith DV. 1981. Taste sensitivity of hamster parabrachial pontine neurons. *J Neurophysiol.* 45: 144-171.

Van Giersbergen PL, Palkovits M y De Jong W. 1992. Involvement of neurotransmitters in the nucleus tractus solitarii in cardiovascular regulation. *Physiol Rev.* 72: 789-824.

Van Straaten F, Muller R, Curran T, Van Beveren C y Verma IM. 1983. Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. *Proc Natl Acad Sci.* 80: 3183-3187.

Vigorito M y Sclafani A. 1988. Ontogeny of polycose and sucrose appetite in neonatal rats. *Dev Psychobiol.* 21: 457-465.

Wang L y Bradley RM. 1993. Influence of GABA on neurons of the gustatory zone of the rat nucleus of the solitary tract. *Brain Res.* 616: 144-153.

Wang Z, Singhvi A, Kong P y Scott K. 2004. Taste representations in the drosophila brain. *Cell.* 117: 981-991.

Whitehead MC y Frank ME. 1983. Anatomy of the gustatory system in the hamster: projections of the chorda tympani and the lingual nerve. *J Comp Neurol.* 220: 378–395.

Whitehead MC, Bergula A y Holliday K. 2000. Forebrain projections to the rostral nucleus of the solitary tract in the hamster. *J Comp Neurol.* 422: 429-447.

Whitehead MC. 1988. Neuronal architecture of the nucleus of solitary tract in the hamster. *J Comp Neurol.* 276: 547-572.

Whitehead MC. 1990. Subdivisions and neuron types of the nucleus of the solitary tract that project to parabrachial nucleus in the hamster. *J Comp Neurol.* 301: 554-574.

Wickstrom HR, Mas C, Simonnea M, Holgert H, Hokfelt T y Lagercrantz H. 2002. Perinatal nicotine attenuates the hypoxia-induced up-regulation of tyrosine hydroxylase and galanin mRNA in locus ceruleus of the newborn mouse. *Pediatr Res.* 52: 763-769.

Willing AE y Berthoud HR. 1997. Gastric distension-induced c-fos expression in catecholaminergic neurons or rat dorsal vagal complex. *Am J Physiol.* 272: R59-R67.

Yamada K. 1966. Gustatory and thermal responses in the glossopharyngeal nerve of the rat. *Jpn J Physiol.* 16: 599-611.

Yamaguchi K, Harada S, Kanemaru N y Kasahara Y. 2001. Age-related alteration of taste bud distribution in the common marmoset. *Chem Senses.* 26: 1-6.

Yamamoto T y Sawa K. 2000. Comparison of c-fos-like immunoreactivity in the brainstem following intraoral and intragastric infusions of chemical solutions in rats. *Brain Res.* 866: 144-151.

Yamamoto T, Nagai T, Shimura T y Yasochima Y. 1998. Roles of chemical mediators in the taste system. *Jpn J Pharmacol.* 76: 325-348.

Zerial M, Toschi L, Ryseck RP, Schuermann M, Muller R y Bravo R. 1989. The product of a novel growth factor activated gene, fos B, interacts with JUN proteins enhancing their DNA binding activity. *EMBO J.* 8: 805-813.

Zhang LL y Ahwell KW. 2001. Development of the cyto and chemoarchitectural organization of the rat nucleus of the solitary tract. *Anat Embryo.* 203: 265-282.

Zhang Y, Hoon GM, Chandrashekar K, Mueller, B. Cook, D. Wu, C. Zuker y Ryba N. 2003. Coding of sweet, bitter, and umami tastes different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell.* 112: 293-301.

## **ANEXOS**

### **1.- Publicaciones producto del presente trabajo de investigación**

Basic brainstem taste responsivity: effects of perinatal influences.

eNeurobiología, Lorena Rubio-Navarro, Carmen Torrero, Manuel Salas.

eNeurobiología. 2:3090511, 2011.

Sweet and bitter tastes evoked different neuronal activation in the rostral portion of the nucleus of the solitary tract of developing rats Lorena Rubio-Navarro,

Carmen Torrero, Mirelta Regalado, Manuel Salas. J Behav and Brain Science. 2:

291-298, 2012.

## 2.- Presentaciones a Congresos Nacionales e Internacionales

### 2.1.- Congresos Internacionales

**Rubio L**, Frías C, Regalado M, Torrero C, and Salas M. Taste-induced C-Fos expression in the rostral portion of the solitary tract nucleus of neonatal rats. 28<sup>th</sup> Annual Meeting of the Association for Chemoreception Sciences. Sarasota, Florida. USA. April 25-30, 2006.

**Rubio L**, Regalado M, Torrero C, and Salas M. The c-Fos induction in GABAergic and Thergic neurons for taste stimuli in the rostral solitary tract nucleus (STNr) of developing. 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Atlanta, Georgia. USA. October 14-18, 2006.

### 2.2.- Congresos Nacionales

**Rubio L**, Regalado M, Torrero C, y Salas M. Inducción de expresión de c-Fos en el núcleo del tracto solitario rostral (NTSr) por estímulos gustativos durante el desarrollo temprano de la rata. VII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Biología del Desarrollo, Taxco, Guerrero. México. Septiembre 11-13, 2005.

**Rubio L**, Regalado M, Torrero C y Salas M. Cambios de activación neuronal en el núcleo del tracto solitario producidos por diferentes estímulos sápidos en la rata en desarrollo. Congreso Nacional de Investigación Biomédica. Monterrey, NL. México. Octubre 27-29, 2005.

**Rubio L**, Regalado M, Torrero C y Salas M. Inducción de c-Fos en neuronas gabaérgicas y thérgicas por estímulos sápidos en la porción rostral del núcleo del tracto solitario (NTSr) de ratas en desarrollo. XLIX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. Querétaro, Qro. México. Septiembre 4-8, 2006.

**Rubio L**, Regalado M, Torrero C, Hernández N, y Salas M. Organización de la inmunoreactividad a c-Fos en la porción rostral del núcleo del tracto solitario

(NTSr) inducida por estímulos sápidos en ratas neonatas. L Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas; Puebla, Pue. México. Septiembre 9-13, 2007.

**Rubio L**, Regalado M, Torrero C y Salas M. Análisis de la activación neuronal asociada a la aplicación de quinina y sacarosa en el núcleo del tracto solitario de ratas en desarrollo. XLII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. Morelia, Mich. México. 26-30 septiembre, 2009.

**Rubio L**, Regalado M, Torrero C y Salas M. Distribución de la expresión de c-Fos en la porción rostral del núcleo del tracto solitario inducida por estímulos sápidos y la colocalización con GAD 67 en ratas en desarrollo” Monterrey, NL. México. 1-3 octubre 2009.

**Rubio-Navarro L**, Torrero C, Regalado M y Salas M. Desarrollo posnatal del núcleo del tracto solitario: Estudio sobre la distribución de c-Fos asociado a estímulos sápidos en ratas. LIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Ciudad de Villahermosa, Tabasco, 26 al 30 de septiembre de 2010.

**Lorena-Rubio Navarro**, Torrero C, Regalado M, Salas M. Organización topológica del sistema gustativo en ratas Wistar en desarrollo. XXVI Congreso Nacional de Investigación en Medicina. Monterrey, Nuevo León, 22-24 de septiembre, 2011.

Carreón M, **Rubio-Navarro L**, Guzmán A, Torrero C, Salas M. Ayuno perinatal y sus efectos sobre el desarrollo de la papila circunvalada en ratas Wistar. XXVI Congreso Nacional de Investigación en Medicina. Monterrey, Nuevo León, 22-24 de septiembre, 2011.

**Rubio- Navarro L**, Torrero C, Tegalado M, Salas M. Quinine induced c-Fos expression in the solitary tract neurons immunoreactive to tyrosine hydroxilase in preweaning rats. LV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Neurociencias y Neurobiología de México, Cancún 4-9 noviembre, 2012.

Salas M, Torrero C, Regalado, **Rubio-Navarro L**. Gustofacial responses in pup rats are modified by perinatal undernutrition. LV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Neurociencias y Neurobiología de México, Cancún 4-9 noviembre, 2012.

# Sweet and bitter tastes evoked different neuronal activation in the rostral portion of the nucleus of the solitary tract of developing rats

Lorena Rubio-Navarro; Carmen Torrero; Mirelta Regalado; Manuel Salas

*Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, México*  
E-mail: [masal@unam.mx](mailto:masal@unam.mx)

Received

## Abstract

The impact of the gustatory stimuli on the rostral portion of the nucleus of the solitary tract (rNST) was investigated in developing rats, by using c-fos immunohistochemical staining. Wistar rats of 5, 15, and 25 days of age were isolated from the mother for 12 h, then stimulated with quinine, sucrose, or NaCl, and sacrificed 90 min later. The water-stimulated group showed minimal c-Fos-like immunoreactivity (FLI) compared with taste-stimulated groups that exhibited different FLI in the rNST at the different ages. At all ages the quinine-stimulated group induced FLI in the medial subfield, while sucrose induced FLI in the lateral subfield of the rNST. The intensity of FLI was highest at P15, and it declined at P25. These findings provide detailed insight into the anatomical basis of rNST activation that is involved in early food intake and the learning capacity of the newborn.

**Keywords:** c-Fos, rostral portion of the nucleus of the solitary tract, gustatory development, rats.

## 1. Introduction

In altricial newborn mammals the gustatory system provides the anatomical substrate for the selective ingestion or rejection of nutrients and for the establishment of strong links with environmental nest cues to gain olfactory and gustatory experience needed for survival [1, 2]. The complete gustatory receptors, their afferent projections, and the neurons in the rNST, which is the first relay in the gustatory pathway, are far from fully developed at birth [3-7]. Neurons in the rNST undergo distinctive qualitative and quantitative changes during the first 30 days after birth [8-10]. Electrophysiological studies of the rat rNST show changes in the intrinsic membrane properties of its neurons between early development and the adult stage [11-13]. At the single-cell level, an analysis of the neurons that respond to gustatory cues shows they are functional by the end of the first postnatal week [14]. The organization of the rNST in adult mammals has been studied previously [15-17], but at present little information is available on the development of this structure in the rat [10]. Analysis of the gustofacial responses of newly born rats to different tastes indicates that from the first day of life, pups respond to quinine solution with

certain aversive characteristics (gaping and forelimb flailing) that suppress oral intake [10]. Other components of the adult-like aversive response (chin scraping and paw treading) do not appear until 12 days. This can be due to the pup's inability to detect aversive solutions, because of the neuronal substrate immaturity subserving these motor behavioral responses [18-19]. In the case of sucrose, a single droplet into the mouth of the newborn elicits licking and rhythmic mouth movements as the most salient feature [20]. The entire set of behavioral and discriminatory components underlying the different responsiveness to sweet and bitter tastes in the rat emerge over the first 2 weeks of life [18, 19-21].

The expression of the immediate-early gene *c-fos*, detected by the immunohistochemical c-Fos protein staining technique, has been used as an anatomical marker of activated neurons in the central nervous system [22]. Previous studies have shown in adult rats that gustatory stimulation induces c-Fos-like immunoreactivity (FLI) in NST neurons, and they are activated differentially by sucrose (S) and quinine monohydrochloride (QHCl), two taste cues that differ importantly in qualitative, hedonic, and behavioral characteristics [15-17]. Thus, the sucrose stimulation elicits FLI in neurons distributed along the

mediolateral axis of the rNST; in contrast, the stimulation by QHCl exhibits a prominent, but more medial FLI in the rNST [15-17]. These differences in the distribution of stimulus properties appear to be a ubiquitous feature of the sensory systems. The most obvious topography in the gustatory system is the systematic representation of information arising from taste buds in different parts of the mouth. This organization is best documented in the NST, where it appears to be a rostral continuation of a topographic representation of the entire gastrointestinal tract [15-17,23-25]. The neural areas that are activated early in life by gustatory stimulation have not been previously analyzed. The current experiment was designed to address if the anatomical substrate underlying the sucrose and quinine gustatory responses is already functional during the first days of life by evaluating c-Fos immunoreactivity in response to different taste stimuli in rNST neurons.

## 2. Materials and Methods

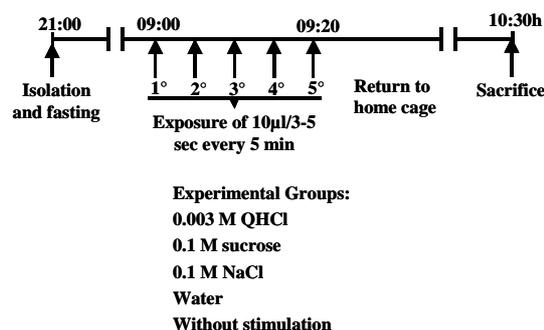
### 2.1. Animals

Male Wistar rats of 5, 15, and 25 days of age were used. They were maintained under a 12:12 h light-dark cycle (lights on at 0800 h) in a room at  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  with humidity of about 60%, and were housed with mothers, who had free access to food (Purina chow) and water. Animals were handled in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All efforts were made to use a minimal number of animals in the experiments.

### 2.2. Gustatory stimulation

Litters were separated from the mother over night before the day of the experiment (2100 to 0900 h) and deprived of food and water. On the day of the experiment they were placed in a plexiglass (33 X 23 X 15 cm) cage in a quiet room, and the gustatory stimulation was performed between 0900 and 1030 h. Thereafter, they were randomly divided into controls and experimental groups, each consisting of four rats ( $N = 4$ ) for each age and experimental condition.

We use two control groups, one that is isolated from the mother until sacrifice (WS), and another group that was stimulated with distilled water (W). The experimental groups were animals receiving one of the following gustatory stimuli: 0.003 M quinine hydrochloride (QHCl), 0.1 M sodium chloride (NaCl), and 0.1 M sucrose (S). The gustatory cues were manually administered with the aid of an automatic pipette; rats were given 5 stimulations, each with 10  $\mu\text{l}$  of a particular taste solution, at 5-min intervals over a 20-min period (Fig. 1).



**Figure 1.** Schedule of gustatory stimulation and its characteristics.

### 2.3. Immunohistochemical staining

After the intraoral stimulation, each rat remained in the chamber and was sacrificed 90 min after the first stimulation. Preliminary experiments showed that the combination of a 12-h isolation from the mother followed by sacrifice and perfusion after 90 min was optimal: it resulted in a low basal level of Fos expression in the controls or detectable induction of Fos in stimulated animals. Just before sacrifice, rats were deeply anesthetized with urethane (115 mg/100 g b.w., i. p.) and perfused via the ascending aorta with saline, followed by 4% paraformaldehyde (pH 9.5,  $10^\circ\text{C}$ ). Brains were removed, post-fixed for 24 h, and cryoprotected in 10% sucrose-phosphate buffer overnight at  $4^\circ\text{C}$ . The brainstem was cut in coronal sections of 50  $\mu\text{m}$  on a freezing microtome; three series across the length of the brainstem were collected and stored in cryoprotectant (30% ethylene glycol and 20% glycerol in 0.05 M sodium phosphate buffer) at  $-20^\circ\text{C}$  until histochemical processing.

Fos-like immunoreactivity (FLI) was detected using a conventional avidin-biotin-immunoperoxidase technique [26]. To localize a polyclonal antiserum raised in rabbits against a synthetic N-terminal fragment of human Fos protein (Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA). To minimize variations in the immunohistochemical processing, tissue from animals in different groups was processed simultaneously. Processing was performed on free-floating sections. As negative control, some tissue was separated prior to the primary antibody incubation and placed into the PBS-0.3% Triton X-100 solution with no primary antibody. Sections were pretreated with hydrogen peroxide for 10 min to quench endogenous peroxidase activity, followed by 2 rinses in PBS and then incubated by 10 min in 1.0% sodium borohydride to reduce free aldehydes. Sections were then incubated with the primary antiserum diluted 1:5000 at  $4^\circ\text{C}$  for 48 h. The primary antibody was detected with the

avidin-DH-biotinylated horseradish peroxidase-H-complex (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), and the diaminobenzidine reaction product was developed using a nickel-enhanced glucose oxidase method. Control experiments, in which the primary antiserum was preabsorbed with antigen overnight, showed no specific nuclear labeling in tissue from control or experimental animals

#### 2.4. Counting of responsive neurons in the rNST and statistical analysis

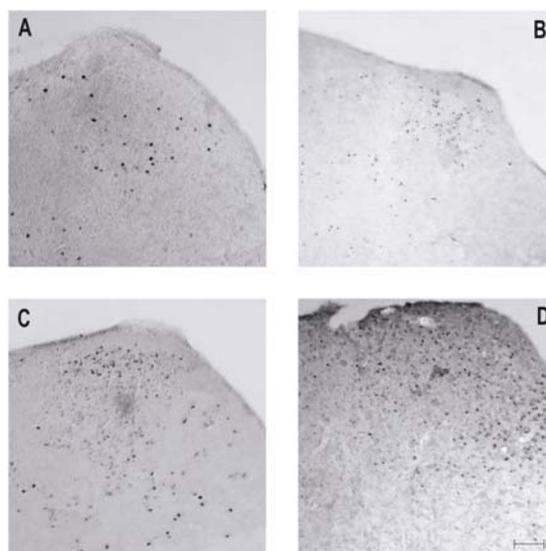
In order to compare differences in the number of cells activated by taste stimuli, we analyzed distribution of Fos positive cells located in the medial, intermediate and lateral area of the NST in coronal planes. For quantification, the number of cells per section at four rostro-caudal levels was used for average results. In a 5-days old rat pup, all brainstem nuclei are identifiable in their final locations, and structurally are very similar to those of the adult rat and can be recognized on the basis of similarity with the adult equivalent [27]. The four rostro-caudal levels were: in the rNST, Bregma -12.30mm level 1 (L1) and Bregma -13.24mm (L2), in the intermediate NST, Bregma -13.80mm (L3) and caudal NST, Bregma -14.30mm (L4) in reference to the Bregma from the adult rat brain atlas [28]. In present study, we counted only Fos-positive nuclei seen as dark, round or oval structures. The FLI-positive cells in each section were counted, and the mean number of cells for each region was analyzed.

#### 2.5. Statistical Analysis

Because there were not significant differences between the WS and W groups, only the water (W) group was used as control for all subsequent statistical comparisons. For the analyses we summed across all four levels, using a three-way ANOVA with stimulus as one factor, age as second factor, and either antero-caudal level or medial-lateral subfield as third factor. Separate, two-way ANOVAs were calculated for each level (summed across subfields) or each subfield (summed across levels) as one repeated measures factor and age as a second factor. *Post hoc* comparisons at each developmental age were made by using the Fisher Least Square Differences (LSD) test. The threshold for significance was set at  $p < 0.05$

### 3. Results

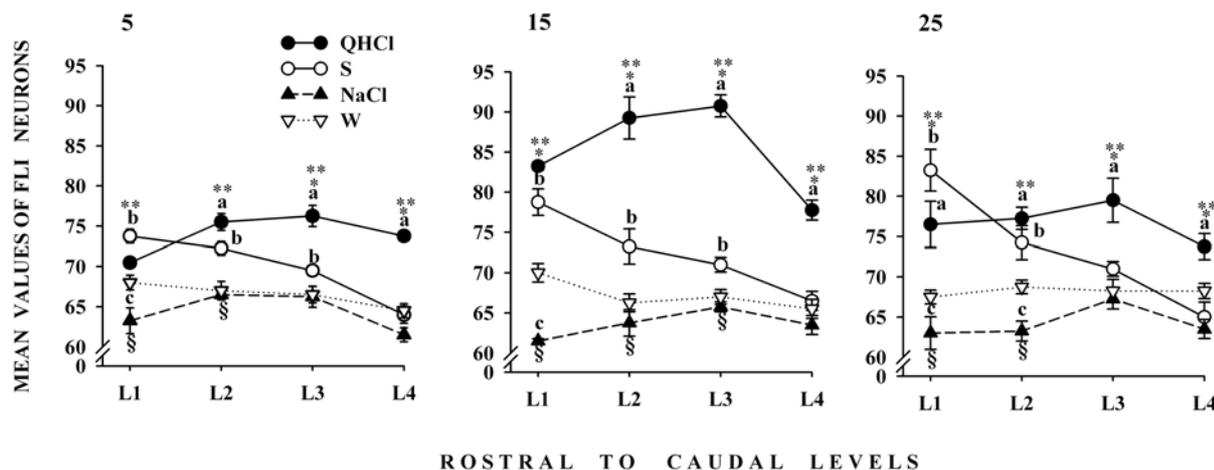
Analysis of the rNST coronal sections from the pre-weaned rats subjected to the experimental conditions proved that isolation from the mother resulted in a basal level of c-Fos expression at all ages studied. After establishing this basal level, the gustatory stimulation induced a significant response in the rNST, as determined by the FLI. The pups that were stimulated with QHCl and S showed a clear and more intense FLI in the rNST, but W and NaCl caused a minor activational response (Fig. 2)



**Figure 2.** Photomicrographs of coronal sections of the rNST at level of Bregma -13.24 mm (L2) in the current study. **A.** Water and **B.** NaCl stimulation was associated with weak FLI. By contrast, after **C.** sucrose, and **D.** quinine stimulation FLI was more intense. Calibration 200  $\mu$ m.

#### 3.1. FLI distribution in the different rostro-caudal levels of the rNST in response to specific gustatory cues

Statistical comparisons in the number of FLI-positive nuclei in quinine-stimulated rats showed significant differences associated with age,  $F(2,9)=86.14$ ,  $p < 0.001$ , and rNST levels,  $F(3,27)=9.98$ ,  $p < 0.001$ , without interaction. Post hoc comparisons at different levels and ages are displayed in Figure 3. Throughout the study, quinine showed consistently higher values in FLI compared to the other taste stimuli with a peak on day 15 (Fig. 3).



**Figure 3.** Mean number of FLI neurons in different levels of the rNST. Neurons are summed across subnuclei of animals in the four stimulation conditions. *Post hoc* analysis indicate that both quinine and sucrose resulted in significantly more FLI than the other groups ( $p < 0.05$  indicated by a and b). But the increased FLI elicited by NaCl compared with water was only significant in some case ( $p < 0.05$ ). QHCl, quinine; S, sucrose; W, water.

The amount of FLI in the S group exhibited significant differences associated with age,  $F(2,9)=31.4$ ,  $p < 0.001$  and the rNST level,  $F(3,27)=31.5$ ,  $p < 0.001$ , with no interaction between factors. *Post hoc* comparisons at each developmental age are shown in Figure 3. FLI in the S group gradually declined along the rNST levels and was lower than in the quinine group but higher than in groups exposed to the other taste cues (Fig. 3).

FLI in the NaCl and W groups were only modified by the rNST levels,  $F(3,27)=5.97$ ,  $p < 0.001$ , and  $F(3,27)=3.03$ ,  $p < 0.046$  respectively with no interaction between factors. *Post hoc* comparisons at different developmental ages are presented in Figure 3. FLI in the NaCl and W groups at different rNST levels and ages was lower than in the quinine and S groups (Fig. 3).

### 3.2. Analysis of FLI in the medio lateral rNST subfields to gustatory cues

Statistical comparisons of the amount of FLI in quinine-stimulated rats showed significant differences associated with age,  $F(2,44)=24.46$ ,  $p < 0.001$  and rNST subfield,  $F(2,88)=125.30$ ,  $p < 0.001$ . Additionally, a significant interaction between age and rNST subfield,  $F(4,88)=14.80$ ,  $p < 0.001$ , was obtained. *Post hoc* comparisons at each day of the study are shown in Figure 4. The amount of FLI was generally higher with quinine compared to the other gustatory cues, and it decreased toward the lateral subfield.

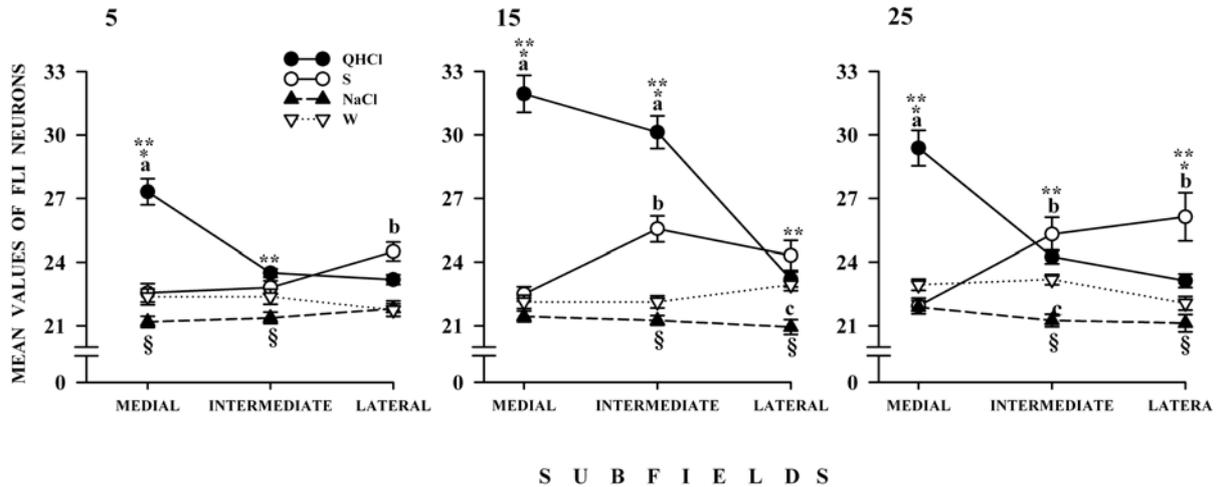
The amount of FLI in the sucrose group was not affected by age but was significantly different between rNST subfields,  $F(2,88)=34.55$ ,  $p < 0.001$ . Furthermore, there

was a significant interaction between age and rNST subfield,  $F(4,88)=7.4$ ,  $p < 0.02$ . *Post hoc* comparisons over the course of the study are displayed in Figure 4. Sucrose increased FLI in the medial and lateral rNST subfields more than the other taste stimuli.

Statistical comparisons showed that the number of FLI-positive cells in the NaCl-treated rats was not affected by age or subfield, nor was a significant interaction between factors observed. Statistical comparisons of the number of FLI-positive cells in the W group show no significant differences with age or subfield. However, the interaction between gustatory cue and rNST subfield,  $F(4,88)=3.67$ ,  $p < 0.01$ , was significant. *Post hoc* comparisons over the course of the study are shown in Figure 4.

## 4. Discussion

Our data indicate a clear FLI in the rat rNST as early as P5, suggesting that the neuronal connections between rNST neurons and taste receptors may not be complete but are operating at P5. In this regard the FLI of this gustatory area appears to be very similar to the FLI detected in the newborn olfactory bulb which possibly underlies basic newborn functions such as food intake, mother recognition, and the establishment of early associative learning with taste stimuli of the nest environment as a mechanism to gain survival experience [2,29]. This possibility is supported by previous electrophysiological, morphological, and behavioral observations of gustatory responses in NST area [18-21,30-36] suggesting that they are part of ancient, complex brainstem mechanisms



**Figure 4.** Mean number of FLI neurons in different subfields of the rNST. Neurons are summed across levels of animals in the four stimulation conditions. *Post hoc* analysis indicate that both quinine induce more FLI in medial zone in contrast sucrose resulted in significantly more FLI in lateral subnuclei at 25 days of age ( $p < 0.05$  indicated by a and b). But the increased FLI elicited by NaCl compared with water was only significant in some case ( $p < 0.05$ ). QHCl, quinine; S, sucrose; W, water.

modulating cardio-respiratory rhythms and food-intake in several species [37].

Quinine elicits intense FLI primarily in the medial subfield. Following oral quinine exposure found that newborn pups exhibited intense mouth opening and reduced lip licking and face-pulling [38]. Thus, quinine stimulation activates not only a small neuronal subpopulation of the rNST associated with the taste sensation, but also a neuronal subset related to oromotor responses [39]. Similar studies performed in the adult rat indicated that quinine evoked FLI segregated within the medial subfields of the rNST [17,24,25,39,40].

The current results also indicate that FLI elicited by taste stimuli are primarily related to the oral gustatory receptors rather than to the digestive tract visceral receptors activated after ingestion. Yamamoto and Sawa, 2000 [41] recently reported that the intragastric infusion of 1 mM quinine induced FLI in the visceral cNST area at a site where the intraoral infusion of quinine fails to induce FLI. Although quinine oral stimulation may directly activate gastrointestinal receptors and their afferents, we recognize that the FLI at the most caudal level of the rNST examined here may represent a combination of visceral and gustatory effects, since these regions receive significant input from the IX and X cranial nerves [40]. Nevertheless, this suggestion requires further investigation in order to understand how different gustatory reception areas combine their ascending information to integrate the sensory and hedonic aspects of the gustatory signals.

Another possible explanation for the quinine effects seen here is the contribution of the tactile stimulation provoked by the liquid volume introduced into the oral cavity during the stimulation that was perhaps superim-

posed on the gustatory stimulus. Giving support to this possibility are the anatomical convergence of the IX and X cranial afferents in the rNST, the increased rNST neuronal electrical discharges following the oral mechanical stimulation, and the observation here of slight FLI in the rNST elicited by water stimulation [15,16,25,42-44]. However, the role of the tactile influence of liquid on the oral receptors is apparently negligible. Our data show that sucrose generally elicits less FLI than quinine but more than NaCl and W at all ages; the FLI gradually declines along the rostro-caudal levels of the rNST except on day P5, but increases with age along the medial-lateral subfields. This profile of sucrose is in line with the higher preference of the newborn for sucrose, compared to NaCl and Water, suggesting that in the rNST, the threshold for neuronal activation by sucrose is reduced during the pre-weaning period [45]. The FLI elicited by NaCl in the rNST at various ages was similar to that elicited in the W subjects. The NaCl concentration used was similar to that in amniotic fluid, an important component of the fetal environment [46]. Thus, the W and NaCl cues used here to elicit FLI in the rNST might cause a low-intensity activation of gustatory receptors.

The Fos immunohistochemistry technique has some limitations, one of which is that stimulus-induced c-fos expression occurs only in those neurons that generate a sufficient amount of neuronal activity. Accordingly, very high stimulus intensities must typically be used to achieve measurable FLI. Moreover, in some brain regions, neurons remain Fos-immunonegative regardless of the strength or duration of the stimulus [45]. The reason for this is still unclear, but may be related to biochemical messengers that regulate neuronal c-fos activation [47] or to the preferential expression of transcription factors

other than c-fos [48-50]. It is possible that cells were activated by quinine infusion escaped of the FLI detection.

In the rNST these FLI distribution are taste specific, and the spatial location apparently changes during postnatal development. The findings presented here suggest that these subfields of the rNST may play an important role throughout the first two weeks of life, but the details of their development are unknown. The synaptogenesis of sensory afferents that originate in the taste buds, the projections to the reticular formation, gustatory cortex, amygdala, and other areas, as well as the metabolic maturation of the brainstem, and the levels of inhibitory and stimulatory neuromodulators and neurotransmitters may contribute to the postnatal maturation and function of the rNST. Age is another important factor that modulates postnatal changes in the number of gustatory-induced FLI-positive neurons from P5 to P15, a time when the gustatory receptors are still maturing. These results are in agreement with previous studies performed in other brain structures that continue to develop during early postnatal life [51,52].

Taken together, the findings reported here suggest that the gustatory-specific patterns of activity in the rNST are established during the perinatal period and do not undergo substantial remodeling during the neonatal period. However, further studies are necessary in order to understand the plastic properties of this brainstem substrate that is fundamental for newborn survival.

## 5. Conclusion

In conclusion, difference in the FLI expression between sucrose and quinine was demonstrated and the middle and lateral regions respectively showed higher FLI expression than water or NaCl in rat as early as 5 day of age and change during early development. The results provide morphological evidence for perceptual and discrimination of taste signaling in the NST.

## 6. Acknowledgement

Partly supported by DGAPA/UNAM, IN207-310, IN207307, CONACyT No. 171332 and DGAPA/UNAM No. 503001915 scholarship to L.R. We thank Dr. D. Pless for editorial assistance and N. Hernandez for help with the images.

## 7. Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interests concerning this research.

## 8. References

[1] J. M. Cernoch, R. H. Porter, "Recognition of ma-

ternal axillary odors by infants," *Child Development*, Vol. 56, No. 6, 1985, 1593-159.

- [2] S. Moriceau, R. M. Sullivan, "Maternal presence serves as a switch between learning fear and attraction in infancy," *Nat Neurosci*, Vol. 9, No. 8, 2006, 1004-1006.
- [3] I. Farbman "Electron microscope study of the developing taste bud in rat fungiform papilla," *Dev Biol*, Vol. 11, No. 1, 1965, 110-135.
- [4] M. Mistretta, "Topographic and histological study of the developing rat tongue, palate and taste buds," In: J. F. Bosma, Ed., Third symposium on Oral Sensations and Perception, I. L. Charles, C. Thomas, Springfield; 1972, pp. 163-187.
- [5] J. P. Mbiene, A. I. Farbman, "Evidence for stimulus access to taste cells and nerves during development: an electron microscopic study," *Microsc Res Tech*, 26, No. 2, 1993, 94-105.
- [6] M. A. Hosley, B. Oskley, "Postnatal development of the vallate papilla and taste buds in rats," *Anat Rec*, Vol. 218, No. 2, 1987, 216-222.
- [7] R. F. Krimm, D. L. Hill, "Innervation of single fungiform taste buds during development in rat," *J Comp Neurol*, Vol. 17, No. 1, 1998, 13-24.
- [8] P. S. Lasiter, D. M. Wong, D. L. Kachele, "Postnatal development of the rostral solitary nucleus in rat: dendritic morphology and mitochondrial enzyme activity," *Brain Res Bull*, Vol. 22, No. 2, 1989, 313-321.
- [9] P. S. Lasiter, D. L. Kachele, "Elevated NADH-dehydrogenase activity characterizes the rostral gustatory zone of the solitary nucleus in rat," *Brain Res Bull*, 1989, Vol. 22, No. 4, 777-781.
- [10] L. Rubio, C. Torrero, M. Regalado, M. Salas, "Alterations in the solitary tract nucleus of the rat following perinatal food restriction and subsequent nutritional rehabilitation," *Nutr Neurosci*, Vol. 7, No. 5-6, 2004, 291-300.
- [11] H. Bao, R. M. Bradley, C. M. Mistretta, "Development of intrinsic electrophysiological properties in neurons from the gustatory region of rat nucleus of solitary tract," *Dev Brain Res*, Vol. 86, No. 1-2, 1995, 143-154.
- [12] M. Mistretta, S. Labyak, "Maturation of neuron types in nucleus of solitary tract associated with functional convergence during development of taste circuits," *J Comp Neurol*, Vol. 345, No. 3, 1994, 359-376.
- [13] W. E. Renehan, J. Massey, Z. Jin, X. Zhang, Z. Liu, L. Schweitzer, "Developmental changes in the dendritic architecture of salt-sensitive neurons in the

- nucleus of the solitary tract," *Dev Brain Res*, Vol. 102, No. 2, 1997, 231-246.
- [14] A. Vincent, F. Tell, "Postnatal development of rat nucleus tractus solitarius neurons: morphological and electrophysiological evidence," *Neuroscience*, Vol. 93, No. 1, 1999, 293-305.
- [15] M. I. Harrer, S. P. Travers, "Topographic organization of Fos-like immunoreactivity in the rostral nucleus of the solitary tract evoked by gustatory stimulation with sucrose and quinine," *Brain Res*, Vol. 11, No. 1-2, 1996, 125-137.
- [16] S. P. Travers, H. Hu, "Extranuclear projections of rNST neurons expressing gustatory-elicited Fos," *J Comp Neurol*, Vol. 427, No. 1, 2000, 124-138.
- [17] S. P. Travers, "Quinine and citric acid elicit distinctive Fos-like immunoreactivity in the nucleus of the solitary tract," *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, Vol. 282, No. 6, 2002, 1798-1810.
- [18] J. R. Ganchrow, J. E. Steiner, S. Canetto, "Behavioral displays to gustatory stimuli in newborn rat pups," *Dev Psychobiol*, Vol. 19, No. 3, 1986, 163-174.
- [19] G. J. Schwartz, H. J. Grill, "Comparing taste-elicited behaviors in adult and neonatal rats," *Appetite*, Vol. 6, No.4, 1985, 373-386.
- [20] B. Johanson, E. G. Shapiro, "Intake and behavioral responsiveness to taste stimuli in infant rats from 1 to 15 days of age," *Dev Psychobiol*, Vol. 19, No. 6, 1986, 593-606.
- [21] W. G. Hall, T. E. Bryan, "The ontogeny of feeding in rats: IV. Taste development as measured by intake and behavioral responses to oral infusions of sucrose and quinine," *J Comp Physiol Psychol*, Vol. 95, No. 2, 1981, 240-251.
- [22] M. Sagar, F. R. Sharp, T. Carrant, "Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level," *Science*, Vol. 240, No. 4857, 1988, 1328-1331.
- [23] L. A. DiNardo, J. B. Travers, "Distribution of fos-like immunoreactivity in the medullary reticular formation of the rat after gustatory elicited ingestion and rejection behaviors," *J Neurosci*, Vol. 17, No. 10, 1997, 3826-3839.
- [24] C. T. King, S. P. Travers, N. E. Rowland, M. Garcea, A. C. Spector, "Glossopharyngeal nerve transection eliminates quinine-stimulated fos-like immunoreactivity in the nucleus of the solitary tract: implications for a functional topography of gustatory nerve input in rats," *J Neurosci*, Vol. 19, No. 8, 1999, 3107-3121.
- [25] S. M. Altshuler, X. Bao, D. Bieger, D. A. Hopkins, R. R. Miselis, "Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the rat: sensory ganglia and nuclei of the solitary and spinal trigeminal tracts," *J Comp Neurol*, Vol. 283, No. 2, 1989, 248-268.
- [26] T. Morales, L. Aguilar, E. Ramos, F. Mena, C. Morgan, "Fos expression induced by milk ingestion in the caudal brainstem of neonatal rats," *Brain Res*, Vol. 1241, No. 19, 2008, 76-83.
- [27] G. Paxinos, K. W. S. Ashwell, I. Tork, "Atlas of the Developing Rat Nervous System," 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press. 1994.
- [28] G. Paxinos, C. Watson, "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates," Academic Press. 1997.
- [29] S. S. Miller, N. E. Spear, "Olfactory learning in the rat neonate soon after birth," *Dev Psychobiol*, Vol. 50, No. 6, 2008, 554-565.
- [30] D. Hill, C. R. Almil, "Ontogeny of chorda tympani nerve responses to gustatory stimuli in the rat," *Brain Res*, Vol. 197, No. 1, 1980, 27-38.
- [31] D. Hill, R. M. Bradley, C. M. Mistretta, "Development of taste responses in the rat nucleus of solitary tract," *J Neurophysiol*, Vol. 50, No. 4, 1983, 879-895.
- [32] D. M. Wong, D. L. Kachele, "Postnatal development of the rostral solitary nucleus in rat: dendritic morphology and mitochondrial enzyme activity," *Brain Res Bull*, Vol. 22, No. 2, 1989, 313-321.
- [33] P. S. Lasiter, "Postnatal development of gustatory recipient zones within the nucleus of the solitary tract," *Brain Res Bull*, Vol. 28, No. 5, 1992, 667-677.
- [34] A. K. Thaw, S. Frakmann, D.L. Hill, "Behavioral taste responses of developmentally NaCl-restricted rats to various concentrations of NaCl," *Behav Neurosci*, Vol. 114, No. 2, 2000, 437-441.
- [35] O. May, D. Hill, "Gustatory terminal field organization and developmental plasticity in the nucleus of the solitary tract revealed through triple-fluorescence labeling," *J Comp Neurol*, Vol. 497, No. 4, 2006, 658-669.
- [36] J. Mangold, D. Hill, "Postnatal reorganization of primary afferent terminal fields in the rat gustatory brainstem is determined by prenatal dietary history," *J Comp Neurol*, Vol. 509, No. 6, 2008, 594-607.
- [37] J. E. Steiner, D. Glaser, "Differential behavioural responses to taste stimuli in non-human primates," *J Hum Evol*, Vol. 13, No. 8, 1984, 709-723.
- [38] J. E. Steiner, "Human facial expressions in response to taste and smell stimulation," In: R. W. Hayne, L. P. Lipsitt, Ed., *Advance in Child Development and Behavior*, Academic Press, Inc., New York, 1979,

- pp. 257-293.
- [39] S. P. Travers, J. B. Travers, "Reflex topography in the nucleus of the solitary tract," *Chem Senses*, Vol. 30, Suppl, 2005, i180-i181.
- [40] M. C. Whitehead, "Neuroanatomy of the gustatory system," *Gerodontology*, Vol. 5, No. 5, 1988, 239-243.
- [41] T. Hanamori, N. Oshiko, "Cardiovascular responses to gustatory and mechanical stimulation of the nasopharynx in rats," *Brain Res*, Vol. 619, No. 1-2, 1993, 214-222.
- [42] T. Yamamoto, K. Sawa, "c-Fos like immunoreactivity in the brainstem following intraoral and intragastric infusion of chemical solutions in rats", *Brain Res*, Vol. 866, No. 1-2, 2000, 144-151.
- [43] H. Ogawa, T. Imoto, T. Hayama, "Responsiveness of solitary-parabrachial relay neurons to taste and mechanical stimulation applied to the oral cavity in rats," *Exp Brain Res*, Vol. 54, No. 2, 1984, 349-358.
- [44] S. P. Travers, R. Norgren, "Organization of orosensory responses in the nucleus of the solitary tract of the rat," *J Neurophysiol*, Vol. 73, No. 6, 1995, 2144-2162.
- [45] E. Erkadius, T. O. Morgan, R. Di Nico, "Amniotic fluid composition and fetal and placental growth rates in genetically hypertensive and normotensive rats," *Reprod Fertil Dev*, Vol. 7, No. 6, 1995, 1563-1567.
- [46] R. Hudson, H. Distel, "The flavour of life: perinatal development of odour and taste preferences," *Schweiz Med Wochenschr*, Vol. 129, No. 5, 1999, 176-181.
- [47] M. Dragunow, R. Fall, "The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing," *J Neurosci Methods*, Vol. 29, No. 3, 1989, 261-265.
- [48] M. Sheng, M. E. Greenberg, "The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system," *Neuron*, Vol. 4, No. 4, 1990, 477-485.
- [49] J. I. Morgan, T. Curran, "Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun," *Annu Rev Neurosci*, Vol. 14, No. 1, 1991, 421-451.
- [50] L. Kaczmarek, A. Chaudhuri, "Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity," *Brain Res Rev*, Vol. 23, No. 3, 1997, 237-256.
- [51] R. Wickstrom, T. Hokfelt, H. Lagererantz, "Development of CO(2)-responses in the early newborn period in rat," *Respir Physiol Neurobiol*, Vol. 132, No. 2, 2002, 145-158.
- [52] K. M. Guthrie, C. Gall, "Anatomic mapping of neuronal odor responses in the developing rat olfactory bulb," *J Comp Neurol*, Vol. 455, No. 1, 2003, 56-71.