



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA E HISTOLOGÍA HUMANAS

**ESTRUCTURA DE LAS YEMAS
GUSTATIVAS Y CAMBIOS
PROVOCADOS EN ESTAS POR LA
SACARINA**

María Ángeles Pérez García. 2016.



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

INFORME DE LOS DIRECTORES DE TESIS DOCTORAL

El Dr. César Ángel Chamorro Álvarez, el Dr. Paulino de Paz Cabello y la Dra. María Belén Peláez Pezzi, como directores de la Tesis Doctoral titulada “Estructura de las yemas gustativas y cambios provocados en estas por la sacarina”, realizada por María Ángeles Pérez García, informan

FAVORABLEMENTE

el depósito de la misma ya que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firman en León y Salamanca, a 18 de diciembre de 2015

Los directores de la Tesis Doctoral

Fdo.: César A. Chamorro Álvarez

Paulino de Paz Cabello

M^a Belén Peláez Pezzi

Dedicada a Cristina, mi hermana, por ser mi inspiración.

AGRADECIMIENTOS

A D. César Ángel Chamorro Álvarez, por sus importantes aportaciones científicas, por solventar mis dudas con gran paciencia, por sus inestimables consejos y por la ilusión y empuje que ha puesto desde el principio hasta el final, sin él esta tesis no hubiera podido llevarse a cabo.

A D. Paulino de Paz Cabello, por hacer posible la realización de este trabajo, sobre todo el análisis de imagen y estadístico. Gracias por su atención y orientación prestadas.

A Dña. Belén Peláez Pezzi, por su ayuda, colaboración y entusiasmo.

A Pedro, mi esposo, por estar a mi lado en todo momento, por su constante apoyo en todo aquello que emprendo, por su gran paciencia y por su amor.

A mis padres, por la gran dedicación que han tenido para sus hijas, su sacrificio y su amor incondicional.

A la familia Chamorro Miguélez, por sus ánimos, ilusión y acompañamiento y, sobre todo, por su amistad.

A mi familia y amigos, por estar siempre a mi lado.

A todos los que de alguna manera han intervenido en el desarrollo de este trabajo.

INDICE

Dedicatoria

Agradecimientos

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	11
1.1.- Papilas linguales.....	13
1.2.- Yemas gustativas.....	14
1.3.- Tipos celulares.....	15
1.3.1.- Células tipo I.....	16
1.3.2.- Células tipo II.....	18
1.3.3.- Células tipo III.....	21
1.3.4.- Células tipo IV. Renovación de las células dentro de la yema gustativa.....	25
1.4.- Región del poro.....	28
1.5.- Terminales nerviosos dentro de la yema gustativa.....	30
1.6.- Fisiología del gusto.....	32
1.7.- Edulcorantes Artificiales: Generalidades.....	39
1.8.- El sabor dulce.....	45
1.9.- Sacarina.....	50
1.9.1.- Dosis Diaria Admisible (D.D.A.).....	52
1.9.2.- Efectos de la sacarina sobre la percepción gustativa y sobre la salud.....	
2.- OBJETIVOS	55
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	59
3.1.- Generalidades.....	61
3.2.- Técnicas de microscopía electrónica.....	62
3.3.- Técnicas morfométricas y estereológicas.....	64
3.3.1.- Base teórica.....	64
3.3.2.- Análisis de imagen.....	66
3.3.3.- Análisis estadístico	67
4.- RESULTADOS	69
4.1.- Nivel 1.....	71
4.1.1.- Papilas foliadas.....	71
4.1.2.- Papilas fungiformes.....	74
4.1.3.- Papilas valladas	75

4.2.- Nivel 2	78
4.2.1.- Gránulos densos	78
4.2.2.- Aparato de Golgi	79
4.2.3.- Mitocondrias	81
4.2.4.- Retículo endoplásmico rugoso.....	82
4.2.5.- Vesículas claras.....	84
4.2.6.- Vesículas nucleodensas.....	85
5.- DISCUSIÓN	87
5.1.- Generalidades.....	89
5.2.- Yemas gustativas de los diferentes tipos papilares.....	93
5.2.1.- Papilas foliadas.....	93
5.2.2.- Papilas fungiformes.....	94
5.2.3.- Papilas valladas.....	95
5.3.- Tipos celulares.	
5.3.1.- Células tipo I.....	96
5.3.2.- Células tipo II.....	101
5.3.3.- Células tipo III.....	107
5.4.- Comparación entre tipos celulares control y sacarina.....	113
5.4.1.- Células tipo I.....	113
5.4.2.- Células tipo II.....	119
5.4.3.- Células tipo III.....	123
6.- CONCLUSIONES	131
7.- RESUMEN.....	135
8.- BIBLIOGRAFÍA.....	141
9.- ANEXO. IMÁGENES	163
9.1. - Fotografías.....	165
9.2. - Tablas y Gráficos.....	199
ABREVIATURAS Y GLOSARIO.....	222

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Papilas linguales

La zona dorsolateral de la mucosa lingual está tapizada por gran número de pequeñas prominencias denominadas papilas linguales, formaciones compuestas por un núcleo de tejido conectivo recubierto por un epitelio plano estratificado. En los mamíferos existe un doble sistema de papilas linguales con dos funciones claramente diferenciadas: mecánicas y gustativas.

Las papilas linguales gustativas son las estructuras anatómicas que alojan a las yemas gustativas, órganos encargados de la percepción del gusto. Existen tres tipos diferentes: valladas, foliadas y fungiformes.

Las **papilas valladas** se componen de una eminencia central rodeada de un anillo papilar y entre ambos el foso o surco papilar. Numerosos poros gustativos se abren en la profundidad del surco papilar (Chamorro *et al.*, 1987).

En la rata y especies afines como el ratón o el hámster, existe una única papila vallada situada en la línea media, en la parte posterior de la lengua, rodeada de un surco papilar circular muy aparente.

Las **papilas foliadas** se localizan en la parte aboral de la lengua, caudalmente al arco palatogloso y son pares. El grado de desarrollo varía de unas especies a otras. En el hombre estas papilas se localizan en los bordes de la lengua, cerca de su base; están constituidas por una serie de pliegues verticales separados entre sí por un pequeño surco, son muy rudimentarias y tienen una escasa o nula función en la percepción gustativa. Hay especies, como los rumiantes, en los que ni siquiera existen (Chamorro *et al.*, 1986).

Las **papilas fungiformes** aparecen en gran número localizadas en los dos tercios anteriores de la lengua. En su superficie se abren los poros de las yemas que se ubican en estas papilas (Chamorro *et al.*, 1987). En la rata existen aproximadamente 180-190 papilas fungiformes irregularmente repartidas por los dos tercios anteriores de la lengua). En el hombre y primates están compuestas por una extremidad libre, de volumen variable y redondeada, sostenida por un pedículo más o menos largo y delgado; en su estructura se alojan unas 14 ó 15 yemas gustativas (Farbman y Mbiene, 1991).

1.2.- Yemas gustativas

Los órganos terminales especializados del sentido del gusto, las yemas gustativas, son una agrupación de 50-150 células neuroepiteliales incluidas en el epitelio estratificado de la lengua, más concretamente en las papilas gustativas (Kinnamon y Cummings, 1992; Roper, 2009). Una pequeña abertura en la superficie epitelial, el poro gustativo, permite el contacto directo de estas células con los estímulos gustativos externos de la cavidad oral. El tamaño de las yemas varía entre los 50-70 μm . en su eje mayor y los 40-60 μm . en su eje menor (Simon y Roper, 1993). La porción apical de la yema comunica con el exterior a través del poro gustativo, de unos 5 μm . de diámetro, por el que se proyectan numerosas prolongaciones celulares.

Las yemas gustativas son un agregado de células en forma de cebolla compuesto por una población celular heterogénea, células gustativas que poseen propiedades neuronales que dan lugar a potenciales de acción y a la liberación selectiva de neurotransmisores en respuesta a determinados estímulos del gusto (Murata *et al.*, 2010; Kimura *et al.*, 2013; Miura *et al.*, 2014).

Así pues, estas estructuras sensoriales tienen la tarea de supervisar el ambiente químico de la cavidad oral y en particular percibir sensorialmente qué alimentos son apetecibles, cuáles son tóxicos, aversivos, nutritivos, etc. En definitiva, las papilas gustativas ayudan a supervisar la primera etapa de la captación energía: la ingesta de alimentos. Las yemas gustativas contribuyen por ello a nuestra calidad de vida gracias al análisis químico de los alimentos en relación a sus cualidades gustativas de dulce, salado, agrio, amargo, umami y, quizás, otros gustos (por ejemplo, grasa, astringente, metálico) (Roper, 2009).

Hasta hace tan sólo hace tres décadas, se consideraba a las yemas gustativas como meras interfaces entre los productos químicos sápidos en la cavidad oral y los centros de interpretación en el sistema nervioso. Estos órganos periféricos sensoriales convertirían pasivamente estímulos gustativos en señales que las fibras aferentes sensoriales podrían transportar hasta el cerebro. La citología de las yemas gustativas indicaba que su población de células no es homogénea, pero no se sabía si los diferentes tipos de células respondían a los diferentes estímulos del gusto, si actuaban como soporte de las células sensoriales o qué transmisor(es) eran liberados en las fibras aferentes.

Los años transcurridos desde entonces han aclarado muchas de estas cuestiones, principalmente a través de los esfuerzos de los investigadores que han registrado la actividad funcional celular y que han utilizado la biología molecular para identificar las proteínas específicas que se encuentran en las células de las yemas gustativas.

Como resultado de estos esfuerzos, ahora entendemos que la yema gustativa es una comunidad de células que interactúan y se comunican célula-célula durante la estimulación gustativa. Ahora se sabe que las yemas gustativas no son meras estructuras sensoriales pasivas (Roper, 2013).

Hay entre 2.000 y 5.000 yemas gustativas en la cavidad bucal humana, fundamentalmente en la lengua, parece que histológicamente bastante similares a las presentes en otros lugares (paladar, epiglotis, faringe, laringe). Las yemas gustativas de la porción anterior de la lengua se localizan en las papilas fungiformes. Estas yemas gustativas están inervadas por la cuerda del tímpano, una rama del nervio facial (N VII). Las yemas gustativas presentes en la parte posterior se localizan en las papilas valladas y están inervadas por el nervio glossofaríngeo (N IX). También hay yemas gustativas en los pliegues presentes en los lados posterolaterales de la lengua, en las yemas foliadas. Estas yemas gustativas reciben inervación de las ramas de la cuerda del tímpano y del glossofaríngeo.

En definitiva, y tal y como señala Ryotaro *et al.*, (2004), si las células de las yemas gustativas pudieran funcionar de manera independiente, no se reunirían para formar las yemas gustativas.

1.3.- Tipos celulares

Las células de las yemas se dividen en tres categorías principales, originalmente definidas por sus características morfológicas y distinguidas más recientemente por su expresión de proteínas específicas y respuestas a la estimulación gustativa (revisado en Chaudhari y Roper, 2010).

Desde hace bastantes años, diversos autores han estudiado la ultraestructura de las yemas gustativas de rata a través de la microscopía electrónica de transmisión (Farbman, 1965a, b; Gray y Watkins, 1965; Beidler, 1969; Uga, 1969; Takeda y Oshino, 1975; Mistretta *et al.*, 1984 y 1986; Yoshie *et al.*, 1996; Pumplin *et al.*, 1997) y de otras especies afines como el criceto (Miller y Chaudhry, 1976) y el ratón (Takeda, 1976 y 1977; Akisaka y Oda, 1978; Takeda y Kitao, 1980; Kinnamon *et al.*, 1985

y 1988). En estos trabajos se describen varios tipos celulares dentro de la yema; los más comúnmente aceptados son: tipo I, tipo II y tipo III. Las proporciones en que aparecen son distintas, siendo los más frecuentes las células tipo I seguidas por las tipo II; mientras que las tipo III son mucho menos numerosas.

1.3.1.- Células tipo I

Las células de tipo I, originalmente definidas ultraestructuralmente por tener un citoplasma electrodenso y núcleos alargados y pleomórficos, se cree que tienen funciones gliales, como señalan (Dvoryanchikov *et al.*, 2009). En este mismo sentido, Roper (2013) señala que las células tipo I parecen ser similares a células gliales.

Estas células sintetizan y depositan una potente ecto-ATPasa en sus superficies que degrada el transmisor liberado por otras células gustativas (Bartel *et al.*, 2006). Las células tipo I también se caracterizan por extensos procesos lamelares que envuelven a otras células gustativas (Pumplin *et al.*, 1997), tal vez para seguir limitando la propagación del transmisor(es) y evitar que los cambios locales en las concentraciones de iones lleguen a otras regiones de la yema gustativa durante la percepción gustativa.

Las células de tipo I, a veces llamadas “células oscuras” (por ejemplo, Delay *et al.*, 1986; Nelson y Finger, 1993; Pumplin *et al.*, 1997) extienden sus procesos laminares en torno a otros tipos de células gustativas y expresan GLAST, un transportador glial de glutamato (Lawton *et al.*, 2000). Estas características sugieren una función glial para las células de tipo I, por ejemplo, un aclaramiento del transmisor y aislamiento funcional de otros tipos de células gustativas (Finger, 2005).

Desde hace años se han descrito como células alargadas, de contorno irregular, con un núcleo ovalado que presenta frecuentemente invaginaciones en su silueta y que está situado, habitualmente, en la mitad basal de la yema. La heterocromatina se reparte por el núcleo de una forma muy poco uniforme dándole una apariencia de manchado que dificulta la identificación de el o los nucléolos.

El citoplasma está profusamente ocupado por un gran número de ribosomas dispersos, agrupados en polirribosomas o asociados al retículo endoplásmico rugoso, lo que confiere a estas células una elevada densidad electrónica, a lo que contribuyen también los acúmulos de material filamentoso que rodean el núcleo.

La característica más distintiva de este tipo celular es la presencia del gran número de gránulos de forma más o menos esférica, electrodensos, localizados en su mayoría en la región apical de la célula y cuyo diámetro varía entre los 0,08-0,15 μm según Uga

(1969) o los 0,1-0,2 μm según Takeda y Oshino (1975). Estos orgánulos, los gránulos densos, están limitados por una membrana que engloba a un núcleo central de material homogéneamente denso y, entre ambos, membrana y núcleo denso, aparece un halo electroclaro fácilmente identificable.

A veces, las membranas de los gránulos densos están fusionadas con la membrana plasmática, vertiendo su material denso al espacio intercelular contribuyendo a formar la sustancia densa del poro (Murray y Murray, 1975; Takeda y Oshino, 1975).

Otros orgánulos presentes en este tipo celular son el aparato de Golgi, que aparece en la zona peri o supranuclear y que suele estar bien conformado; las cisternas del retículo endoplásmico rugoso y mitocondrias en número y tamaño variable e irregularmente repartidas por el citoplasma. Con alguna frecuencia es posible encontrar en la región apical uno o dos centriolos orientados aleatoriamente con respecto al eje mayor de la célula.

A nivel del poro la membrana plasmática termina formando microvellosidades en cantidad variable y de un tamaño que oscila entre los 0,1-0,2 μm de ancho y los 1-2 μm de longitud. En la base de las vellosidades aparecen agregados de túbulos densamente empaquetados que pueden estar en relación con uno de los centriolos. La célula termina en delgadas prolongaciones que penetran en la región del poro y que contienen abundante material filamentoso. Justo por debajo del extremo apical de la célula hay un agregado de gránulos densos limitados por una membrana que envuelve un núcleo central de material homogéneamente denso.

En los contactos entre las células tipo I y otros tipos celulares aparecen formaciones del tipo *zonulae ocludens*, *zonula adherens* y *maculae adherens* o desmosomas especialmente visibles en la región más apical de la yema (Holland *et al.*, 1991). Existen también zonas de contacto entre las células tipo I y las fibras nerviosas de forma tal que recuerdan a las células de Schwann según algunos autores (Takeda, 1976).

La clasificación en tres tipos celulares básicos comúnmente aceptada para los otros tipos papilares no lo es tanto en las yemas fungiformes (Murray, 1973). Según este autor, se distinguen células claras tipo II y oscuras tipo I, aunque no tan claramente como en las yemas valladas o foliadas. Así, por ejemplo, en las células tipo I no se describen los característicos estrechamientos citoplasmáticos apicales, ni la terminación en múltiples microvellosidades, no aparecen los típicos gránulos densos en su citoplasma supranuclear, o lo hacen en muy pequeño número y en forma no

esférica, por lo que a nivel del poro todas las células parecen iguales, dificultando todavía más su clasificación.

No obstante, en las yemas fungiformes las células tipo I constituyen el tipo celular más frecuente, son células alargadas que se extienden desde la base de la yema hasta la región del poro. El citoplasma se caracteriza por la relativa abundancia de ribosomas libres y asociados a cisternas de retículo endoplásmico rugoso; las mitocondrias tienen una forma alargada y se distribuyen irregularmente, el aparato de Golgi está bien conformado. Farbman (1965a) considera tres características particulares de este tipo celular. La primera es la presencia de gránulos densos en el citoplasma apical que, a diferencia de lo que ocurre en las células tipo I de los otros tipos papilares, son muy escasos en número y su forma varía desde la esférica hasta la de varilla. Dadas estas considerables diferencias entre los gránulos densos descritos en yemas valladas y foliadas y los descritos en fungiformes otros autores negaban la existencia de los gránulos densos en las células tipo I de las yemas fungiformes (Murray, 1973; Miller, 1976b).

La segunda característica diferenciadora de las células tipo I es la densidad de su citoplasma a lo que contribuye la gran cantidad de ribosomas libres y agrupados y la presencia de un material filamentosos distribuido por todo el citoplasma. La tercera característica, según Farbman (1965a), es la relación entre estas células y las fibras nerviosas intraepiteliales, ya que es frecuente observar procesos nerviosos envueltos en extensiones citoplasmáticas de células tipo I de forma tal que recuerdan a las de Schwann.

1.3.2.- Células tipo II

Denominadas inicialmente células claras, dada su baja densidad electrónica, pronto se las pasó a denominar células tipo II (Murray *et al.*, 1969), nomenclatura que sigue siendo adoptada en la actualidad por la mayoría de los autores.

Las células gustativas tipo II son grandes, con un núcleo redondo y expresan todos los elementos de la cascada de transducción del sabor dulce, umami y amargo, incluyendo las familias de receptores del gusto T1R o T2R (para el amargo, dulce y umami) (Miyoshi *et al.*, 2001, Clapp *et al.*, 2004; Kinnamon y Vandenbeuch, 2009; Ohtubo y Yoshii, 2010), los componentes de transducción PLC β 2 y IP3R3 (Miyoshi *et al.*, 2001), y gustducina (Yang *et al.*, 2000; Finger 2005).

Son células más grandes y de contorno más regular que las tipo I. Así mismo, el núcleo es también de mayores dimensiones, con una forma que tiende a la esfericidad y que raramente presenta invaginaciones, el nucleoplasma es difusamente granular y en él se distinguen claramente 1 ó 2 nucléolos. El núcleo presenta condensaciones de cromatina muy concretas adheridas a la cara interna de la membrana nuclear.

El citoplasma no presenta los gránulos densos descritos en las células tipo I y es claramente más reticular. Tanto el núcleo como el resto de la célula tienen apariencia electrolúcida, de ahí que algunos autores las hayan denominado células claras (Murray y Murray, 1967; Farbman, 1967).

En cuanto a los orgánulos citoplasmáticos (Toyoshima y Tandler, 1986) son muy abundantes las mitocondrias, de considerable tamaño y con frecuentes dilataciones en sus espacios internos. Los cuerpos densos, identificados como lisosomas, aparecen en número apreciable, especialmente en el citoplasma supranuclear. También pueden observarse algunos cuerpos multivesiculares. El aparato de Golgi, bien desarrollado, aparece comúnmente en posición perinuclear. Por su parte, el retículo endoplásmico liso, característico de este tipo celular, se observa disperso por todo el citoplasma y en ocasiones muy dilatado, igualmente pueden verse cisternas de retículo endoplásmico rugoso más o menos dilatadas (Yoshie *et al.*, 1996).

Numerosas vacuolas de tamaños muy diversos se distribuyen por todo el citoplasma contribuyendo a aumentar la apariencia clara de este tipo celular. Estas vacuolas son especialmente numerosas en las células tipo II de localización más periférica, células que algunos autores identifican como en fase de degeneración. Las células tipo II situadas más centralmente en la yema terminan en microvellosidades bien desarrolladas, aunque más cortas, anchas e irregulares que las de las tipo I (Murray, 1973), que no llegan a proyectarse totalmente en el exterior del poro papilar. Como en las tipo I, en ocasiones se puede identificar algún centriolo en regiones próximas al núcleo.

En las yemas fungiformes el contenido citoplásmico de este tipo celular es bastante diferente a los otros tipos celulares ya comentados. Aparecen mitocondrias grandes y numerosas distribuidas por toda la célula, aunque son más abundantes en la región supranuclear. El aparato de Golgi, bien desarrollado, se localiza en la mayoría de las ocasiones en posición perinuclear. Son, así mismo, abundantes las vacuolas y las vesículas de distintos tamaños y formas, lo que contribuye a dar la apariencia electroclara de estas células. La mayoría de estas vacuolas se presentan vacías, pero algunas tienen un contenido granular suavemente teñido. Otros orgánulos rodeados

de membrana aparecen irregularmente distribuidos, además de cuerpos lipídicos y partículas de glucógeno. Finalmente, puede verse un delicado material filamentososo similar al descrito para las células tipo I, pero en mucha menor cantidad.

Es habitual observar relaciones de contacto extensas entre las células tipo II y fibras nerviosas, aunque en estas zonas no se aprecian los grupos de vesículas propios de las uniones neuronales en las que se producen contactos de carácter sináptico (Takeda y Oshino, 1975).

En las zonas de contacto de estas células con otras se pueden observar complejos de unión muy definidos en la zona apical de la yema, especialmente complejos de unión del tipo *macula adherens* o desmosomas. También pueden observarse zonas de contacto con fibras nerviosas, aunque no presentan las características de un tipo de contacto sináptico.

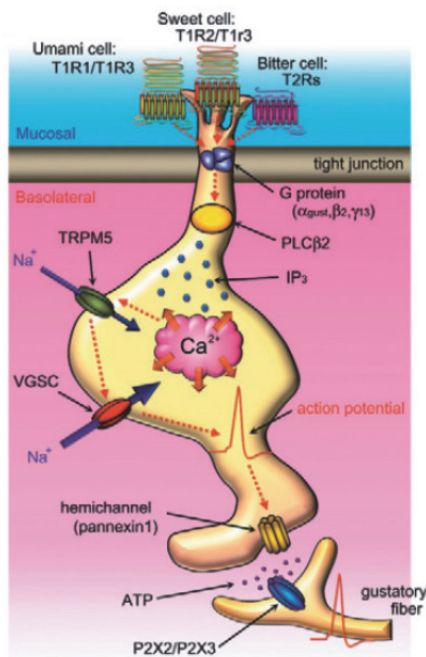
Estas células, a nivel molecular han sido identificadas como células que expresan los receptores acoplados a la proteína G (GPCRs) para compuestos de sabor dulce, amargo y umami. Las células receptoras gustativas (tipo II) expresan receptores acoplados a proteínas G para, compuestos amargos, umamis o dulces (Roper, 2013). En consecuencia, estas células han sido red denominadas como células receptoras. Cada célula receptora responde principalmente a una sola calidad del sabor, como el dulce, el amargo o el umami (Yoshida *et al.*, 2006; Tomchik *et al.*, 2007). Por tanto, cada célula receptora está bien “sintonizada” con un estímulo de sabor específico. Pero, curiosamente, estas células no poseen sinapsis estructuralmente identificables (Clapp *et al.*, 2004) y, así, desde hace muchos años no estaba claro cómo se comunican las células receptoras con fibras aferentes sensoriales. Ahora, sin embargo, sabemos que las células receptoras secretan ATP como un neurotransmisor sobre las fibras aferentes sensoriales, probablemente a través de hemicanales pannexina1 en su membrana de superficie (Romanov *et al.*, 2012). Por lo tanto, la liberación sináptica de ATP a partir de células receptoras del gusto no implica exocitosis vesicular o sinapsis bien definidas (Roper, 2013).

Cada célula tipo II responde principalmente a un solo tipo de sabor (dulce o amargo, o umami), presumiblemente debido a que cada receptor celular expresa GPCRs para cada tipo de sensación gustativa. Sin embargo, no hay una estricta expresión de receptor gustativo célula-célula como el que aparece en el caso de la olfacción (Mombaerts, 2004; Serizawa *et al.*, 2004). Es decir, algunas células receptoras

gustativas tipo II responden a dos o más gustos diferentes y expresan múltiples GPCRs del gusto (Tomchik *et al.*, 2007; Dando *et al.*, 2012).

Ohtubo (2007) observó células de tipo II en todas las yemas gustativas examinadas, mientras que las células tipo III existían en el 92% de las yemas gustativas, lo que indica que casi todas las yemas tienen tanto las células tipo II como tipo III, si bien en un porcentaje de 5 a 1 tipo II/tipo III. Según este autor las células tipo II se pueden clasificar en dos subtipos según expresen ciertos receptores específicos del gusto asociados a proteínas G: los T1Rs y los T2Rs. Los primeros se presentan como heterodímeros. El T1R1/T1R3 es un receptor de aminoácidos ampliamente comprobado (Nelson *et al.*, 2002), mientras que T1R2/T1R3 reconoce edulcorantes naturales y artificiales (Nelson *et al.*, 2001).

Qin *et al.* (2010) señalan que en la actualidad es ampliamente reconocido que las células de tipo II y tipo III están relacionadas con la percepción gustativa y transducción de señales (Clapp *et al.*, 2006).



Vías de señalización en las células tipo II.

Los receptores del dulce (T1R2/T1R3), del amargo (T2Rs) y del umami (T1R1/T1R3), son todos ellos receptores acoplados a la proteína G. Estos receptores comparten una vía de señalización similar: la activación de la proteína G, la liberación de Ca²⁺ almacenado, la activación de TRPM5 y los canales de sodio dependientes de voltaje, y generación de potenciales de acción. Los potenciales de acción y un aumento del Ca²⁺ abren los hemicanales para liberar ATP sobre las fibras nerviosas gustativas (Yoshida *et al.*, 2010).

1.3.3.- Células tipo III

Fueron descritas por primera vez por Murray *et al.* en 1969 en yemas gustativas de conejo. Desde entonces este tipo celular ha sido ampliamente admitido en trabajos posteriores sobre la ultraestructura de las yemas gustativas en mamíferos, entre ellos

la rata (Fujimoto, 1973; Nada y Hirata, 1975; Takeda y Oshino, 1975; Akisaka, 1980; Farbman *et al.*, 1985; Bloom y Fawcett, 1983).

Su apariencia fue definida por muchos autores como intermedia entre las células tipo I y las células tipo II, de ahí que estas células tardaran en ser reconocidas como un tipo celular aparte (Murray *et al.*, 1969) o que algunos las consideraran como estadios de evolución celular de dos tipos celulares básicos: células oscuras (tipo I) y células claras (tipo II) (Delay *et al.*, 1986 y Royer y Kinnamon, 1991). Rueda (1991) a partir del análisis realizado entre diferentes tipo papilares para cada tipo celular afirma que existe una diferenciación de los tipos III según la papila a la que pertenecen, esto lo relaciona con la diferente localización e inervación de cada una de las papilas y consiguiente capacidad de percepción gustativa.

En un análisis estructural no muy profundo, en las células consideradas como de tipo III se pueden observar características propias tanto de las células tipo I (abundancia de ribosomas y cisternas de retículo endoplásmico rugoso, apariencia moderadamente electrodensa tanto del núcleo como del citoplasma, presencia de invaginaciones en la membrana nuclear, etc.), como de las células tipo II (silueta celular no excesivamente alargada, aparato de Golgi bien desarrollado, presencia de numerosas mitocondrias y presencia también de cuerpos densos, distribuidos especialmente por el citoplasma supranuclear). No obstante, no están presentes ni los gránulos densos, típicos de las células tipo I, ni el retículo endoplásmico liso característico de las células tipo II (Seta *et al.*, 1997).

Representan el tipo celular menos frecuente de la yema (menos del 15% del total de las células gemales según Murray *et al.*, 1969). Suelen tener una localización central en la yema con el núcleo situado en el tercio inferior, su citoplasma no se alarga hasta el poro y están aisladas por el citoplasma de las células tipo I en la parte superior de la yema.

El núcleo, de apariencia intermedia entre el denso y alargado de las tipo I y el pálido y redondeado de las tipo II, puede aparecer invaginado en su contorno y con uno o dos nucléolos visibles.

Por todo el citoplasma aparecen dispersas mitocondrias que suelen ser grandes y con crestas bien desarrolladas. El aparato de Golgi, bien conformado, está en posición supranuclear casi siempre. El retículo endoplásmico rugoso es escaso y nunca aparece organizado en agregados como es característico en las células tipo I. Sólo Murray *et al.* (1969), Murray (1973) y Murray (1986) hace referencia al retículo endoplásmico liso,

describiéndolo como vesículas irregulares y pequeñas cisternas esparcidas por el citoplasma, en ningún caso como en las tipo II.

El citoplasma de este tipo celular es rico en fibrillas de 5-7 μm de longitud distribuidas por toda la célula, bien individualmente o en pequeños haces, siendo más visibles en las regiones donde las vesículas se acumulan (Murray *et al.*, 1969). También están presentes microtúbulos, aunque en número mucho menor que en otros tipos celulares.

En la región más apical de estas células aparecen pequeñas vesículas de forma irregular que parecen relacionadas con la entrada o salida de material por pinocitosis o exocitosis. Pueden observarse uno o dos centriolos en localización variable, desde el vértice celular a las proximidades del núcleo. Las células tipo III carecen de microvellosidades ampliamente desarrolladas en la región del poro.

En un análisis estructural más profundo de estas células se identifican dos tipos de orgánulos característicos y exclusivos de las células tipo III: las vesículas nucleodensas y las vesículas claras. Estas vesículas se encuentran en mayor número en el área infranuclear del citoplasma, y son más frecuentes aún en las zonas de contacto con las fibras nerviosas

La característica más definitoria de este tipo celular es la presencia de las denominadas vesículas nucleodensas y vesículas claras, que no aparecen en otros tipos celulares. Se contemplan agrupadas en mayor cantidad en la región infranuclear del citoplasma, y en especial en las áreas próximas a las zonas de contacto de la célula con fibras nerviosas.

Las vesículas nucleodensas tienen una apariencia similar a la descrita para los gránulos densos de las células tipo I, pero se diferencian claramente de éstos por su menor tamaño, 800-1500 Å de diámetro (Takeda y Oshino, 1975), su localización, ya mencionada, y por su contenido, que en las vesículas nucleodensas es más granular y menos homogéneo que en los gránulos densos, más o menos granular y separado de la membrana limitante por un halo electrolúcido.

Las vesículas claras tienen un tamaño de 300-600 Å de diámetro medio con un contenido, como su nombre indica, transparente. Están muy relacionadas con las zonas de contacto con fibras nerviosas por lo que muchos autores las consideran como vesículas sinápticas. Rueda (1991) concluye que en las células tipo III de las papilas fungiformes del conejo son las que presentan una mayor densidad de volumen y

numérica de vesículas claras, lo que interpreta como un signo de mayor actividad gustativa en las células de esta papila frente a foliadas y valladas.

Las áreas de contacto entre las células de este tipo y las fibras nerviosas son muy frecuentes y en algunas de ellas se aprecia un engrosamiento característico de la membrana citoplásmica, fenómeno que suele coincidir con acúmulos de vesículas claras y nucleodensas y microtúbulos (Gray, 1975).

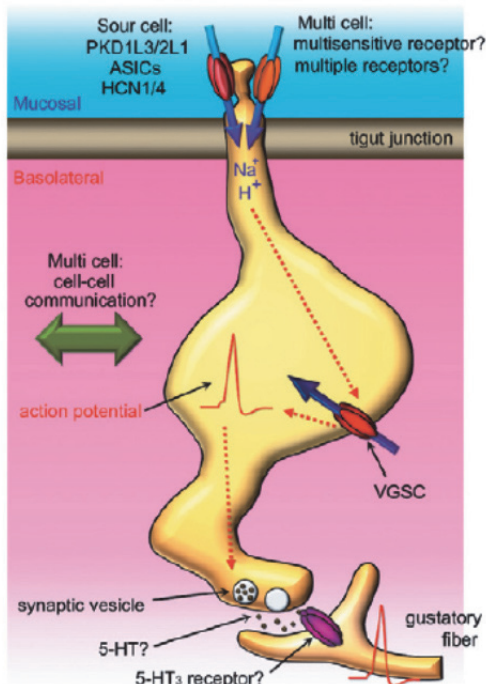
Las células tipo III tienen características ultraestructurales intermedias entre las células de tipo I y las células receptoras tipo II. Lo más importante, sin embargo, es que las células tipo III poseen sinapsis (Yee *et al.*, 2001). Las células de tipo III no secretan ATP, liberan serotonina, norepinefrina y GABA (Huang *et al.*, 2008; Dvoryanchikov *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011). En consonancia con la identificación de las sinapsis, las células de tipo III expresan proteínas asociadas con la transmisión sináptica, incluyendo SNAP 25, canales dependientes de voltaje de Ca^{2+} , enzimas biosintéticas para la serotonina y GABA, y transportadores de captación para aminas biogénicas (Dvoryanchikov *et al.*, 2011). Por ello, las células tipo III han sido red denominadas como células presinápticas (DeFazio *et al.*, 2006).

Abundando en lo anterior, Kimura *et al.* (2007) señalan que las células tipo III se caracterizan por presentar contactos sinápticos morfológicamente identificables con las fibras nerviosas gustativas y la expresión de la proteína sináptica de membrana SNAP25 (Yang *et al.*, 2000), así como la molécula de adhesión celular neural (NCAM) (Nelson y Finger, 1,993). La presencia de un claro contacto sináptico implica a estas células en la transmisión de la información al sistema nervioso. Una cuestión a investigar en el futuro es cómo los diferentes tipos de células gustativas alargadas de este tipo son reemplazados desde la población celular basal proliferativa (Finger, 2005).

Ohtubo (2007) señala que el tipo II, que expresa receptores del gusto, y las células de tipo III, que forman las sinapsis con los nervios del gusto, tienen una relación de tipo II a tipo III de 5 a 1, respectivamente. Esta proporción puede ser importante para la transducción de señales dentro de las yemas gustativas. Las células presinápticas (tipo III) transducen estímulos ácidos. Las células perceptoras del salado aún no han sido identificadas (Roper, 2013).

Ohtubo y Yoshii (2010) señalan que las células de tipo III son sensibles a los ácidos (Huang *et al.*, 2008; Kataoka *et al.*, 2008) y, además, parece que hay interacciones

celulares entre las células tipo II y tipo III (Hayato *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2007; Romanov *et al.*, 2007).



Vías de señalización en las células tipo III.

Las células tipo III expresan receptores candidatos para el sabor amargo (PKD1L3/2L1) y pueden expresar otros candidatos (ASICs, HCNs) y múltiples receptores. Las células del gusto se despolarizan por la activación de estos receptores y generan potenciales de acción. En las células tipo III, los transmisores (5-HT?) pueden ser liberados a través de la transmisión sináptica. La múltiple sensibilidad gustativa de las células tipo III puede derivar de la comunicación célula-célula en las yemas gustativas y/o receptores múltiples

1.3. 4.- Células tipo IV. Renovación de las células dentro de la yema gustativa.

Además de los tres tipos celulares descritos se menciona la existencia de un tipo celular más: las células basales o células tipo IV. Murray y Murray (1970) describe en las yemas gustativas 2 ó 3 células basales similares a las células oscuras pero que no sobrepasan el tercio medio de la yema ni tienen especializaciones apicales. Este autor considera, hipotéticamente, que estas células proceden de las células perigemales adyacentes y que constituyen elementos poco diferenciados que sirven para reemplazar a los otros tres tipos celulares a medida que desaparecen éstos.

Tal y como señalaba Finger (2005), se propusieron dos hipótesis principales en relación a la regeneración celular en las yemas gustativas:

- que los diferentes tipos de células surgen de un progenitor común que genera un solo tipo de célula que luego se transforma de un tipo de célula a otro a medida que madura; y

- que una célula basal da lugar a una célula gustativa inmadura que a continuación se diferencia en sólo uno de los diferentes tipos morfológicos de células gustativas.

Es decir, considerando en conjunto los estudios morfológicos, moleculares y de linaje, se plantean dos posibles hipótesis en cuanto al linaje dentro las yemas gustativas. Una posibilidad es que los tres tipos de células diferentes: tipo I, tipo II y tipo III surgen cada una de una población proliferativa única, ya sea una población de células progenitoras o meramente un tránsito intermedio de poblaciones amplificadas. Por otra parte, pueden existir dos poblaciones proliferativas, una que genera sólo células tipo I y el otro que genera una célula inmadura que puede diferenciarse ya sea en una célula de tipo II o una célula de tipo III. Se considera que es altamente poco probable que una célula madura de tipo III se transforme en una célula tipo II fenotípicamente madura; varios estudios postulan esta cuestión (Yee *et al*, 2003).

La población celular de las yemas gustativas varía a lo largo del tiempo. La yema gustativa es una estructura en permanente evolución cuyos elementos principales, las células, se renuevan constantemente. La forma en que esta renovación celular se produce no se conoce en todos sus detalles, existiendo en la bibliografía esas dos líneas teóricas distintas para explicar este proceso: en una de ellas se considera que todos los tipos celulares provienen de un único tronco celular original, representando cada tipo celular un estadio de desarrollo distinto de una misma célula. La otra línea teórica considera que cada tipo celular tiene su origen en un tronco celular o célula *stem* distinto.

En consonancia con la primera línea están los trabajos del Scalzi (1967), quien describe el siguiente ciclo evolutivo: las células epiteliales circundantes a la yema se definen como células pregustativas que entran en la yema como células gustativas tipo Ia no especializadas y que no alcanzan el poro. Estas células se transforman en células gustativas tipo Ib con gránulos oscuros y vellosidades apicales que, finalmente, se transforman en células gustativas del tipo Ic que progresivamente pierden sus especializaciones apicales, se vacuolizan y terminan por degenerar. Murray *et al*. (1969) también describen una transformación semejante y progresiva de las células oscuras a células claras y de éstas a células degeneradas. Delay *et al*. (1986) postulan la hipótesis de un solo linaje sugiriendo que las células tipo I cambian a células tipo III que luego maduran a células tipo II.

La segunda línea teórica es, no obstante, la más comúnmente aceptada y la que parece tener más visos de corresponderse con lo que ocurre en la realidad. Beidler y Smallman (1965) y Farbman (1950) en estudios autorradiográficos después de utilizar

timidina tritiada como marcador demuestran la existencia de orígenes distintos para tipos celulares distintos. Farbman (1980) en un exhaustivo estudio en yemas valladas de rata, en el que realiza un conteo de células marcadas con timidina tritiada, demuestra la existencia de ciclos vitales distintos, aunque paralelos, para los diferentes tipos celulares. Este autor calcula que la duración del ciclo vital de las células tipo I, u oscuras, es de 9 días y el de las células claras, o tipo II, algo mayor, pero sin precisarlo con exactitud. En el estudio no consideró el ciclo vital de las células tipo III, aun afirmando su existencia, dado que su escasez complicaba en exceso el seguimiento de los marcajes. Los tiempos de renovación celular ofrecidos por Farbman (1980) se asemejan bastante a los calculados por Beidler y Smallmann en trabajos anteriores (1965) en los que se cifraban en torno a las 250 horas.

También Murray (1973), en trabajos posteriores al mencionado antes, aceptan como válida la hipótesis de que cada tipo celular tenga un origen distinto con respecto al de los demás tipos celulares. Rueda (1991) tras un análisis discriminante llevado a cabo entre los tres tipos presentes en cada una de las papilas, demuestra la inexistencia de tipos celulares intermedios, ya que la inmensa mayoría de las células se identificaban según sus parámetros estereológicos comunes, con el tipo de procedencia, sin presentarse células de tipificación intermedia. De esta manera concluye que el origen y evolución de cada tipo celular se realiza de forma independiente.

Normalmente se considera que las divisiones que dan lugar a las células que renuevan la población celular de la yema ocurren en zonas aledañas a ella, en las células periféricas, o en el estadio de células basales. No obstante, existe alguna publicación en la que se pone de manifiesto la existencia de divisiones celulares en estadios de evolución más avanzados: así, Toyoshima y Tandler (1986) han demostrado la presencia de una célula en división dentro de la yema que, por sus características morfológicas, se corresponde con una célula tipo II, ya que presentaba mitocondrias dispersas, algún cuerpo denso, escasas y anchas microvellosidades, contactos no especializados con fibras nerviosas y unión a células tipo I mediante desmosomas. Según estos autores, las células tipo II más centrales se dividen y desplazan gradualmente hacia la periferia de la yema envejeciendo en el proceso.

Sin embargo, los estudios más recientes de Finger (2005), que implican el análisis de ratones quiméricos (Stone *et al.*, 2002) demuestran que deben existir múltiples linajes dentro de una papila gustativa, es decir, que los tres tipos de células no son meramente diferentes etapas de desarrollo de un solo tipo de células gustativas. Datos

de otros investigadores (Kusakabe *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 2003) sugieren que las células tipo II y tipo III pueden proceder de una célula común, que expresa NCAM y Mash1. Finger (2005) reevaluó sus análisis de datos quiméricos para poner a prueba la posibilidad de que las células tipo I pudieran originarse de una población de células basales mientras que el tipo II y el III derivaran de células de una población proliferativa separada. Para llevar a cabo este nuevo análisis, planteó la suposición de que las células de tipo I representan aproximadamente el 40% de la población de células en cualquier yema gustativa. De acuerdo con ello, redujo en un 40% el número total de células para cada yema gustativa en un estudio previo. Reconociendo que se trata de al menos una burda aproximación, se puede poner a prueba la cuestión de si las células gustativas que expresan serotonina (un subconjunto de las células tipo III) tienden a mostrar el marcador quimérico en una tasa más alta que el azar, es decir, si las células tipo III todavía representan un linaje distinto después la eliminación matemática de las células de tipo I. Ninguna de las yemas gustativas examinadas previamente mostraron una correlación significativa del marcador quimérico y fenotipo serotoninérgico tras la eliminación del presunto tipo I celular (40% de la población total). Por tanto, no tenemos ninguna evidencia de un linaje distinto de serotonina una vez que asumimos que el tipo I se origina de una población proliferativa diferente.

Es importante señalar que el análisis llevado a cabo por Finger (2005) no prueba que las células tipo II y tipo III surgen de un progenitor común, más bien dice que tenemos suficientes datos que refutan la hipótesis de linaje común. Por tanto, la cuestión de si las células de tipo II y tipo III son distintos linajes o simplemente diferentes puntos finales de un tipo de célula intermedio común permanece abierto a posteriores investigaciones.

Más recientemente, Ohtubo (2007) indica que las células tipo IV son las células progenitoras que reabastecen la yema gustativa durante el curso normal de recambio celular.

1.4.- Región del poro

La singularidad de este área que forma parte de la yema ha hecho que muchos autores (Farbman, 1965a, 1969; Scalzi, 1967; Uga, 1969; Takeda y Hoshino, 1975; Takeda *et al.*, 1989; Jahnke y Baur, 1979; Miller y Reedy, 1990) se fijen en ella

realizando estudios pormenorizados de las complicadas estructuras que la forman y de su mantenimiento.

Visto al microscopio electrónico, Scalzi (1967) lo considera como un complejo compuesto por el poro gustativo propiamente dicho, el canal y la cámara gustativa. Uga (1969), en su descripción del poro de las yemas gustativas de yemas valladas de rata, considera dos partes:

1) Región externa del poro, donde los procesos citoplásmicos terminales, microvillis, de las células gemales están directamente expuestos al ambiente externo de la cavidad oral.

2) Región interna del poro, donde gran número de citoplasmas celulares se agolpan dejando unos espacios intercelulares muy pequeños.

Son característicos de esta región los complejos de unión celular (Murray, 1993), muy patentes en algunos casos, los acúmulos de gránulos densos en los citoplasmas correspondientes a las células tipo I, las vesículas moderadamente densas y de unas dimensiones que oscilan entre los 400-800 Å de diámetro y el acúmulo de una sustancia denominada sustancia densa del poro. Al parecer, esta sustancia es de naturaleza mucopolisacárida y su función es desconocida, aunque se especula con que se pueda comportar como una resina de intercambio iónico que facilita el paso de algunas moléculas e impide el paso de otras, o bien que pueda actuar como un elemento protector frente a la invasión de la yema gustativa por bacterias de la cavidad oral (Graziadei, 1969). Del mantenimiento y renovación de esta sustancia densa parece claro que se encargan las secreciones de las células tipo I. La utilización de métodos de tinción con PS-SM y PA-TCH demuestran que la sustancia densa del poro y el contenido de los gránulos de las células tipo I tienen muchas similitudes entre sí y confirman la naturaleza polisacárida antes mencionada (Takeda y Hoshino, 1975).

Lo que no está claro es cómo se mantiene el poro abierto a lo largo del tiempo. A este respecto Farbman (1965a) otorga cierta responsabilidad a las células tipo II que secretarían alguna sustancia que impide la unión de las células del epitelio escamoso estratificado de la superficie de la lengua en el punto del poro gustativo.

En las yemas de los tres tipos papilares: valladas, foliadas y fungiformes, la estructura y componentes de la región del poro se corresponden con un mismo patrón organizativo. No obstante, cabe señalar algunas diferencias. Puede considerarse que las regiones del poro de las yemas de yemas valladas y foliadas son prácticamente iguales entre sí, pero en las yemas fungiformes se pueden apreciar diferencias. En

estas yemas el poro tiene unas dimensiones más estrechas y alargadas. Frente a los 4-5 μm de diámetro de los poros de las yemas valladas y foliadas, el poro de las fungiformes tiene una luz de 2-4 μm y una profundidad o longitud del canal de 4-5 μm ; además, la sustancia densa del poro es menos abundante y más amorfa en las fungiformes y las microvellosidades están menos desarrolladas, no llegando a alcanzar la superficie epitelial de la lengua en la mayoría de los casos.

Una vez más, se aprecian notables diferencias estructurales entre las yemas de las yemas fungiformes, por un lado, y las yemas de las yemas valladas y foliadas, por otro. Este hecho puede justificarse, al menos en parte, por la diferente naturaleza de la inervación: mientras que el origen de las fibras nerviosas que inervan a las yemas fungiformes es la rama lingual del nervio trigémino y la cuerda del tímpano, rama del nervio facial (Hanamory y Smith, 1989), en las yemas foliadas y valladas son ramas del nervio glossofaríngeo las que intervienen mayoritariamente en la inervación. Varios autores han probado que tanto en el desarrollo de las yemas como en su mantenimiento juegan un importante papel las terminaciones nerviosas (Olnsted, 1920; Oakley, 1972; Farbman y Mbiene, 1991; Iwasaki *et al.*, 1996, 1997), es fácil suponer, entonces, que diferentes inervaciones conlleven ciertas diferencias estructurales en las yemas gustativas.

Segovia *et al.* (2002) investigaron la hipótesis de que la sensibilidad más alta según la edad se debe a una mayor densidad de yemas fungiformes y poros gustativos (yemas), ya que en los adultos el aumento de las densidades de estas dos estructuras se correlaciona con el aumento del umbral de la sensibilidad gusto. En el caso de los niños se presenta un menor número de yemas que los adultos, pero las densidades de papilas son significativamente más altas de manera que los niños tienen densidades de poro mucho más altas en cada área.

1.5.- Terminales nerviosos dentro de la yema gustativa

Numerosas fibras nerviosas se sitúan en el tejido conjuntivo subyacente a la yema gustativa, como describe Murray y Murray (1970) y Murray (1973). Estas tienen un tamaño que oscila de 25 a 30 μm de diámetro y contienen vesículas, numerosas mitocondrias, túbulos y, ocasionalmente, cuerpos densos. Algunas de estas fibras penetran en la yema gustativa rompiendo la membrana basal en lo que fue denominado por Nemetschek-Gansler y Ferner (1964) como poro basal. Estos autores definieron dos tipos diferentes de perfiles nerviosos. Por un lado, existen perfiles

pequeños con un diámetro que va de los 200 a 400 μm y que contienen neurotúbulos y, por otro lado, hay perfiles amplios que contienen fibras, vesículas, escasos túbulos y un número variable de mitocondrias. Los primeros son designados como fibras nerviosas y los segundos como terminales nerviosos. Dentro de la yema gustativa la relación de los terminales nerviosos con las células varía dependiendo del tipo celular. Las terminaciones más anchas establecen un contacto amplio con la superficie de las células tipo II; al mismo tiempo, estos contactos están envueltos por una célula tipo I adyacente proporcionando una imagen similar a la de las células de Schwann.

Las células tipo III son las únicas que establecen sinapsis químicas con las terminaciones nerviosas. En el citoplasma de la célula próximo a la terminación nerviosa aparecen gran cantidad de vesículas claras sinápticas, vesículas nucleodensas, abundantes mitocondrias, fibras dispersas, túbulos y vesículas. A lo largo de la zona de contacto la membrana plasmática de la célula tipo III aparece una zona densamente teñida y engrosada que también se puede apreciar, aunque en menor medida, en la membrana postsináptica. Estas densidades de membrana en las zonas pre y postsinápticas son menos aparentes en la rata y en los individuos jóvenes de la especie humana, lo que llevó a Takeda (1976) a considerar las sinapsis de las células tipo III de estas especies como atípicas.

A parte de las sinapsis entre células tipo III y terminales nerviosos descritas antes, Kinnamon *et al.* (1985) describen en las células tipo I y en las células tipo II de las yemas valladas de ratón dos tipos de contactos sinápticos: la sinapsis "macular" y la sinapsis "digitiforme". Una sinapsis macular típica está formada por membranas dispuestas de forma paralela con una hendidura de 16-30 nanómetros. En el polo presináptico hay un acúmulo de vesículas sinápticas de 40-70 nanómetros de diámetro próximas a la densidad presináptica y aparecen microtúbulos y mitocondrias. En el polo postsináptico aparecen numerosas mitocondrias, vesículas nucleodensas y claras. La membrana aparece también densamente teñida.

La sinapsis digitiforme se caracteriza porque la fibra nerviosa penetra en una invaginación de la célula gustativa. Los perfiles de una sinapsis de este tipo varían entre una forma semicircular y circular. Las vesículas sinápticas tienen el mismo tamaño que las de las sinapsis maculares pero son mucho más numerosas, las membranas pre y postsinápticas están más engrosadas en este último caso y el material de la hendidura es más denso.

En un trabajo posterior, Royer y Kinnamon (1989) describen en las yemas de las yemas foliadas de ratón sinapsis aferentes del tipo macular y digitiforme como las

descritas en las yemas de las yemas valladas. Además, describen dos nuevas especializaciones en los lugares de unión de las células gustativas y los procesos nerviosos: las cisternas subsuperficiales y las mitocondrias atípicas. Las cisternas subsuperficiales son cisternas de retículo endoplásmico liso que en ocasiones aparecen en los lugares de aposición con los procesos nerviosos terminales. Estas cisternas normalmente son estrechas y su membrana externa está separada de la hoja interna de la membrana plasmática de la célula gustativa por un espacio de 15 nanómetros. Yoshie *et al.* (1996) relaciona la presencia de estas estructuras con la existencia de sinapsis nerviosas terminales de tipo eferente.

Las mitocondrias atípicas se suelen encontrar próximas a las zonas de contacto célula-terminal nervioso y se diferencian del resto de las mitocondrias por ser mucho mayores, tienen forma lobulada y un diámetro de 0,6-0,9 μm (las mitocondrias "típicas" son ovaladas y su diámetro máximo no suele superar las 0,3 μm). Además, estas mitocondrias no tienen crestas laminares sino tubulares o saculares, configuración que indica un alto potencial para fosforilar ADP a ATP o para realizar otros trabajos metabólicos, según indica Green y Baum (1970). Estas mitocondrias están muy próximas a la membrana celular (entre ambas no existe más que un pequeño espacio de 15 nanómetros).

Además de las funciones de recogida de información gustativa los terminales nerviosos desempeñan un importante papel tanto en el desarrollo o nueva formación de las yemas gustativas como en el mantenimiento de las ya existentes, como se demuestra en varios estudios (Farbman, 1965; Hosley *et al.*, 1987; Farbman y Mbiene, 1991; Fujimoto *et al.*, 1993; Mbiene y Farbman, 1993; Oakley, 1993; Witehead y Kachele, 1994).

1.6.- Fisiología del gusto

El gusto es un sentido primario de todos los vertebrados que transmite de forma fiable importante información química desde la boca hasta el cerebro regulando la ingesta, es un sentido fisiológico importante que puede ayudar a reconocer y distinguir específicamente diversas sustancias gustativas (Qiao *et al.*, 2015). Para la mayoría de los animales, el dulce, moderadamente salado o ciertos estímulos provocados por aminoácidos desencadenan un comportamiento apetitivo, mientras el amargo o sustancias ácidas normalmente son rechazados. La capacidad de los animales para distinguir entre algo nutricional frente a potencialmente letal puede significar la

diferencia entre la vida y la muerte. Los seres humanos también se basan en el sabor a fin de seleccionar comidas y bebidas, en parte según las preferencias de gusto para los 5 estímulos básicos del gusto: dulce, agrio, salado, amargo y umami (el sabor del glutamato) (Kapsimalia y Barlow (2013). Debido a que el gusto está involucrado en el comportamiento ingestivo, este sistema sensorial está intrínsecamente ligado en el ser humano con enfermedades que resultan de la obesidad, tales como accidentes cerebrovasculares, enfermedades del corazón y diabetes.

El proceso de transducción del gusto es un proceso neurofisiológico, en el que cierta información química se convierte en una segunda molécula mensajera, causando así la despolarización y liberación de Ca^{2+} de las células gustativas. En otros casos, la sustancia gustativa actúa en sí misma también como señales celulares (por ejemplo, Na^+ , K^+ e H^+) para desencadenar un potencial de acción en células receptoras gusto. Cuando la señal eléctrica intercelular alcanza el valor umbral, tiene lugar la excitación nerviosa y se transmite al centro de sabor en el cerebro para producir el sabor después de múltiples transducciones (Yarmolinsky *et al.*, 2009; Chandrashekar *et al.*, 2006).

El gusto es una de las experiencias más duraderas y satisfactorias del cuerpo. Excepto el dolor, ningún otro sistema sensorial está tan completamente desarrollado al nacer. A lo largo de la vida el gusto está acompañado siempre por el olfato, dos de los sentidos más resistentes. Las células del gusto de los humanos se regeneran aproximadamente cada 10 días, las células olfativas se reemplazan cada mes o dos (Booolootian, 1976; McGee, 1984).

Una persona comienza la vida con aproximadamente 10.000 papilas gustativas. El número de papilas gustativas y el discernimiento del sabor varía entre las personas. A pesar de que el gusto y el olfato disminuyen más lentamente que otros sentidos, se sostiene que hay una disminución considerable durante el proceso de envejecimiento. Siendo el olfato más vulnerable al envejecimiento que el del gusto. Alrededor de la mitad de las personas entre las edades de 65 y 80 años, y las tres cuartas partes de los mayores de 80 tienen pérdidas importantes de papilas gustativas. Por lo tanto, se requieren concentraciones más altas de sustancias sápidas, a menudo, para que las personas mayores puedan percibir la presencia de un sabor particular. Los ancianos también perciben mezclas de sabores diferentes como lo hacen los catadores más jóvenes.

Por el contrario, Zallen *et al.* (1990) demostraron en un estudio realizado en adultos de 65 años de edad y mayores, que la capacidad de discernir los niveles de sal

en los alimentos no se veía afectada cuando se comparaba con jóvenes. La intensidad de la respuesta al gusto es mayor al comienzo de la cata, esto explica por qué el primer bocado de comida o el primer sorbo es tan satisfactorio. A medida que el estímulo continúa, tanto el sabor como el olor sufren una “fatiga”. La apreciación de la comida tiende a ser mayor cuando se desafía el sentido del gusto con cambios de diferentes sabores y “sorpresas”.

El sentido del gusto implica la activación sensorial multimodal para detectar e identificar muchos sabores. Se han identificado cinco sabores primarios: dulce, salado, ácido, amargo y umami, los cuales a menudo se combinan para formar gustos complejos. Ahora se piensa que cada papila gustativa tiene sensibilidad para todas las sensaciones gustativas primarias. El cerebro detecta el tipo de sabor por la relación de estimulación de diferentes papilas gustativas.

Potenciadores del sabor como el glutamato monosódico y los extractos de levadura no afectan a receptores específicos como los de sabores dulces. Por otra parte, los potenciadores del sabor no son dependientes del olfato (Hegenbart, 1992). Las personas con deterioro del olfato pueden degustar la diferencia entre los alimentos que tienen un potenciador del sabor de los que no lo tienen. Muchas sustancias diferentes tienen capacidad para mejorar el sabor, incluyendo los ingredientes que representen los sabores primarios. La sal puede potenciar el sabor de una carne e intensificar el sabor de fruta. El azúcar es capaz de equilibrar la acidez del tomate y también aumentar el sabor dulce de una fruta.

Cada yema gustativa típica contiene 50-100 células gustativas con microvellosidades extendidas hacia la región del poro, procesos apicales de las células gustativas mediante los que mantienen un contacto directo con las sustancias de la cavidad oral (Roper, 1989). Las células receptoras del gusto son células eléctricamente excitables y capaces de generar potenciales de acción. En estas células han sido encontrados canales voltaje-dependientes de sodio, potasio y calcio (Margolskee, 1993).

Los canales de sodio y potasio han sido involucrados en la respuesta de las células gustativas al sabor salado y al sabor ácido. Las sustancias sápidas saladas como el cloruro sódico o el cloruro de litio causan una despolarización de las células gustativas mediante la entrada de iones de sodio por los canales de sodio, los cuales pueden considerarse como los receptores del salado de las células gustativas.

En la transducción del sabor ácido también intervienen canales iónicos como receptores celulares. En anfibios estos receptores han sido identificados como canales de potasio, sin embargo, en los mamíferos las células del gusto no poseen esos canales. En estos animales los iones H^+ de las sustancias ácidas ejercen su efecto sávido bloqueando el paso de Na^+ por los canales sodio involucrados en la percepción del sabor salado, aparte de esto es probable que los H^+ puedan actuar sobre las células gustativas de otras formas aún desconocidas.

Estudios bioquímicos y de biología molecular proponen la actuación de un segundo mensajero en la transducción del sabor dulce y del amargo (Avenet *et al.*, 1988; Tonosaki y Funakoshi, 1988; Margolskee, 1993). En el caso de sabor dulce este segundo mensajero ha sido identificado como AMPc, el cual activa una proteinkinasa A que fosforila los canales de potasio inactivándolos, lo que provoca una despolarización celular.

La transducción del sabor amargo es menos conocida. Se ha comprobado que algunas sustancias amargas provocan un incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular vía receptores asociados a proteínas G que activan la fosfolipasa C induciendo la formación de inosín trifosfato (ITP), segundo mensajero causante de la elevación del Ca^{2+} intracelular, que es lo que en última instancia determina la despolarización celular.

Algunos aminoácidos intervienen también en la sensación sávida de los alimentos, por ejemplo el glutamato ha sido involucrado en la sensación sávida conocida como umami. Chaudhari *et al.* (1996) utilizando técnicas de clonación molecular ha identificado receptores metabotrópicos para el glutamato (mGluR4) que se expresan exclusivamente en células de las yemas gustativas y ha demostrado su influencia en la transducción de la sensación sávida de este aminoácido.

Otro aminoácido que ha sido involucrado en las sensaciones gustativas es la L-arginina, al parecer éste causa un influjo de Ca^{2+} en ciertas células de la yema gustativa debido a la activación de canales catiónicos no selectivos. (Kinnamon y Margolskee, 1996).

La fisiología de las vías gustativas es compleja. Una o más sinapsis químicas se establecen entre las membranas de las células receptoras y una fibra nerviosa sensitiva gustativa primaria. La fibra sensitiva gustativa primaria viaja a través de los nervios glossofaríngeo, lingual, facial (cuerda del tímpano) y vago, según cual sea la localización de la yema origen de la sensación sávida, hasta el haz solitario. Todas las fibras del

gusto hacen sinapsis en los núcleos del haz solitario y mandan neuronas de segundo orden a una pequeña zona del tálamo. De aquí parten neuronas de tercer orden hasta el extremo inferior de la circunvolución postcentral de la corteza parietal donde el estímulo gustativo se integra e interpreta. Las otras modalidades sensoriales, somatosensorial, olfativo, visual y las modalidades de la audición, también interactúan con el gusto en diferentes etapas de la integración gustativa.

El sentido del gusto tiene tres funciones principales: detectar e identificar los alimentos que se pueden comer, aportar información en la decisión de ingerir o rechazar la comida, y para activar la digestión, la absorción y el almacenamiento de alimentos. La detección de sabores ha ayudado a los animales a determinar si los alimentos desconocidos son venenosos o no. Las papilas gustativas que detectan el sabor amargo han proporcionado una protección mediante la detección de venenos de las plantas silvestres (Guyton, 1979). De hecho, el amargo requiere la concentración más débil de las sustancias a detectar. Para sulfato de quinina, por ejemplo, 0,00003 g disueltos en 100 ml de agua corriente puede ser detectado. Para el azúcar se requieren 0,7 g (Lyman, 1989).

Por tanto, el sabor no es una simple sensación hedónica relacionada con la gastronomía; es fundamental para el comportamiento de la ingesta de nutrientes y, así, para el mantenimiento de las funciones vitales. El mejor conocimiento de los mecanismos fisiológicos complejos permitirá comprender mejor las alteraciones del "gusto" y su patología. El objetivo final es tratar de corregir estas y evitar la desnutrición (Brondel *et al.*, 2013).

Dos familias de proteínas G acopladas han sido identificados como receptores del gusto, las familias Tas1r (p. ej., Saiz *et al.*, 2001) y Tas2r (p. ej., Adler *et al.*, 2000), que se combinan de diferentes maneras para generar el sabor dulce, umami, y el amargo. En base a la caracterización bioquímica combinada con análisis genéticos moleculares, ahora sabemos que el heterooligómero Tas1r1/Tas1r3 forma el receptor umami, el heterooligómero Tas1r2/Tas1r3 forma el receptor dulce, y los respectivos Tas2rs forman diversos receptores amargos (Chandrashekar *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003; Matsumoto *et al.*, 2013; Mueller *et al.*, 2005).

Recientes y convincentes evidencias sugieren que existe una sexta modalidad de sabor, destinado a la detección de grasas oro-gustativas. Se ha demostrado que la glicoproteína CD36 ligada a los lípidos, expresada por yemas valladas de la lengua de ratón, está implicada en la percepción oro-gustativa de los lípidos de la dieta (Dramane *et al.*, 2014).

En el caso de la grasa puede ocurrir algo semejante a lo que sucede con el dulce y es que los mamíferos prefieren espontáneamente alimentos ricos en lípidos. Como se sabe, el consumo excesivo de dieta alta en grasas conduce a la obesidad y enfermedades relacionadas. Recientes hallazgos indican que el sabor participa en la percepción de los lípidos de la dieta, y el sabor graso puede contribuir a una preferencia por el consumo excesivo de una dieta grasa (Zhang *et al.*, 2011).

Los datos de inmunofluorescencia obtenidos por Zhang *et al.* (2011) mostraron que los niveles de expresión de CD36 en papilas valladas fueron significativamente inferiores en ratas obesas inducidas por dietas altas en grasas en comparación con las de control de las ratas alimentadas con una dieta normal. Estos resultados sugieren que la disminución de la expresión de CD36 en las yemas gustativas valladas de ratas obesas inducidas por una dieta alta puede estar asociada con la disminución de la sensibilidad del gusto graso y con el fin de compensar la preferencia por la grasa de la dieta las ratas consumen más alimentos grasos. Por eso las estrategias terapéuticas diseñadas a alterar o manipular la expresión CD36 o función en las yemas gustativas pueden tener implicaciones importantes en tratamiento de la obesidad y enfermedades relacionadas, lo que podría ocurrir de forma semejante en el caso del dulce.

Hoogeveen *et al.* (2015) explican que el envejecimiento afecta a la percepción del gusto. En general, los cambios relacionados con la edad parecen estar relacionados con la calidad específica. Así, a edades avanzadas, los umbrales de detección de estímulos de sabor amargo parecen estar afectados negativamente, seguido por estímulos ácidos, salados y dulces.

Otros datos que indican que existen diversos factores que modulan el comportamiento basado en el gusto son los aportados por Sinclair *et al.* (2015), quienes comprobaron cómo la oxitocina reduce la ingesta de alimentos y parece que conduce a un exceso de consumo de sacarosa.

Recientemente, se ha señalado que los nutrientes y compuestos tóxicos presentes en los alimentos y bebidas son evaluados por el sistema del gusto (Yoshida *et al.*, 2010. Tateno *et al.* (2007) muestran un modelo computacional de un sistema de detección de sabor inspirado en las propiedades fisiológicas de los órganos del gusto de mamíferos. Los resultados experimentales indicaron que las células de las yemas gustativas forman redes celulares dentro de las yemas gustativas individuales.

Las células receptoras del gusto juegan un papel crucial en la detección de compuestos químicos en la cavidad oral. La información derivada de las células receptoras del gusto, como el dulce, amargo, salado, agrio y umami es muy importante para evaluar la calidad de los componentes de los alimentos. Entre las cinco cualidades básicas del gusto, el sabor dulce es muy atractivo e influencia la ingesta de alimento. Estudios recientes han demostrado que la sensibilidad del gusto dulce en células receptoras se vería afectado por la leptina y los endocannabinoides. La leptina es un mediador anorexígeno que reduce la ingesta de alimentos al actuar sobre el receptor de leptina Ob- Rb en el hipotálamo (Yoshida *et al.*; 2013).

Por su parte, la morfometría reveló diferencias significativas en el tamaño de la papila entre los grupos control y diabéticos (Pai *et al.*, 2007). Estos hallazgos sugieren que el deterioro del gusto en sujetos diabéticos puede ser causado por defectos derivados de una neuropatía y/o cambios morfológicos en las papilas gustativas. Los mamíferos pueden detectar y discriminar entre estímulos dulce, amargo, ácido, salado y umami (Lindeman, 2001). Amargo es una modalidad de sabor elemental que provoca respuestas de aversión, mientras que los humanos se sienten atraídos por los estimulantes del gusto dulce (Sugita *et al.*, 2013). Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual la información dulce y amarga del sabor evoca respuestas emocionales y conductuales opuestas siendo difícil de encontrar.

La sensibilidad del gusto dulce tiene una gran contribución a la ingesta de alimentos. Por tanto, el control de la sensibilidad del gusto dulce puede ser uno de los medios para la regulación de la admisión de los alimentos (energía).

El sabor salado sigue siendo un enigma. Aún no está claro qué células en la yema gustativas son los objetivos de estimulación por el Na^+ , aunque parece que pudieran ser las células tipo I las responsables (Chandrashekar *et al.*, 2010).

El paso inicial en la percepción del gusto se lleva a cabo en el extremo apical de las células receptoras del gusto, que están dispuestas en las yemas gustativas en el epitelio oral. Estas células expresan receptores de sabor responsables de la detección de señales químicas en los alimentos con cinco cualidades básicas gustativas. En respuesta a los estímulos de los alimentos, las células receptoras del gusto producen cambios en la concentración de calcio intracelular y el potencial de membrana que provocan la liberación de neurotransmisores en las fibras nerviosas aferentes gustativas (Lindeman, 2001; Chandrashekar *et al.*, 2006; Sugita, 2006). Las células receptoras del gusto y las fibras nerviosas aferentes que las inervan transmiten información gustativa por la calidad y la intensidad de los estímulos del gusto a la

corteza gustativa a través de las sinapsis en el tronco cerebral y el tálamo (Allen *et al.*, 1991). Información de sabor amargo y dulce es detectado por distintas poblaciones de células receptoras del gusto (Zhang *et al.*, 2003; Zao *et al.*, 2003; Mueller *et al.*, 2005).

Así, los estudios de microscopía electrónica y la identificación de marcadores moleculares sugieren que las células de tipo II y tipo III se diferencian para funcionar como células especializadas que transducen el dulce y el sabor amargo. Estudios recientes sugieren que las células de tipo III son las células del sabor ácido (Chaudhari y Roper, 2010) Las células de tipo II incluyen receptores sensibles a estímulos amargo, dulce, umami. En estas células las sensaciones gustativas se inician por la interacción de moléculas sápidas con receptores acoplados a proteína G.

La función fundamental del sistema del gusto es impulsar decisiones binarias sobre si consumir o rechazar las fuentes de alimentos potenciales (Yarmolinsky *et al.*, 2009)]. Los animales prefieren sustancias dulces y muchas veces consumen más allá de la necesidad de la repleción homeostática, si bien incluso animales privados de alimentos evitan sustancias altamente amargas (Yamamoto, 2006; Tokita *et al.*, 2009).

En la siguiente tabla se resumen algunos aspectos de las funciones de cada célula gustativa:

Propiedades clave de las células receptoras (tipo II) y presinápticas (tipo III) en las yemas gustativas			
Células receptoras		Células presinápticas	
Expresan	Receptores gustativos T1R o T2R PLC β 2 IP3R3 TRPM5	Expresan	Canales de Ca Proteínas sinápticas (SNAP-25) NCAM
Responden a dulce, amargo o umami con la liberación intracelular de Ca ²⁺		Responden a la despolarización K ⁺ con un influjo de Ca ²⁺	
		Liberan noradrenalina 5-HT o 5-HT plus en respuesta a la estimulación	
Secretan ATP panexina vía hemicanales de uniones gap en respuesta a la estimulación gustativa		Poseen sinapsis	
		Responden a la estimulación con ATP	

1.7.- Edulcorantes Artificiales: Generalidades

Los edulcorantes artificiales son un grupo de sustancias químicas que poseen intensa dulzura y pueden ser usados en alimentos y fármacos, en lugar de agentes dulces naturales. Los edulcorantes juegan un importante papel en las formulaciones de

fármacos porque enmascaran el sabor de estos, proporcionan un sabor neutro o al menos un sabor percibido de forma idéntica a la formulación placebo (Pein, 2013). Entre los principales edulcorantes se encuentran: acesulfama K⁺, alitama, aspartama, ciclamato, sucralosa y, por supuesto, sacarina.

La dulzura de estas sustancias va desde 30 a 200 veces la de la sucrosa o sacarosa, y sólo se requieren pequeñas cantidades para producir las propiedades adecuadas de edulcoración. De las sustancias anteriores el ciclamato, la aspartama y la sacarina son las utilizadas habitualmente en las comidas.

La sacarina fue usada desde comienzos de siglo XX como edulcorante alimenticio, el ciclamato desde principios de los años 50, aunque en Norteamérica se prohibió desde 1970. A principio de los años 80 se introdujo la aspartama. El uso de los edulcorantes artificiales se ha ido incrementado de manera extraordinaria dado el interés por las comidas bajas en calorías.

Las estructuras químicas de las moléculas que confieren un gusto dulce son amplias y variadas, abarcando tanto los azúcares y los edulcorantes. Estos compuestos incluyen sacáridos, diterpenos glucósidos, polioles, proteínas, dipéptidos, y otras estructuras químicas. Una hipótesis frecuentemente citada es que una condición esencial para el sabor dulce es la existencia de un par de puentes de hidrógeno (-OH).

Según la teoría molecular del sabor dulce, propuesta por Shallenberger y Acree (1971), es una condición esencial para el sabor dulce la existencia de un sistema donador/receptor de protones. En el alimento hay un sistema AH/B que puede entrar en contacto con el sistema complementario AH/B del receptor, en las papilas gustativas. A y B son átomos electronegativos (O₂, nitrógeno o cloro) y H un átomo de hidrógeno unido mediante un enlace covalente. Shallenberger demuestra que la potencia del dulzor está correlacionada, a la inversa, con la fuerza del enlace de hidrógeno intramolecular.

Por otra parte, la aplicación universal de la teoría de Shallenberger y Acree (1971) ha sido puesta en duda por Jakinovich (1981) en estudios que indican que un sistema de AH-B puede no ser requerido para producir un sabor dulce. Aunque la mayoría de los trabajos sugieren que el enlace de hidrógeno contribuye a la unión de la mayoría de los edulcorantes a sus receptores.

Debido al hecho de que la relación entre producto químico-estructura de las moléculas y la capacidad para iniciar una sensación dulce no se entiende bien, no es de extrañar que la mayoría de los compuestos con sabor dulce hayan sido descubiertos

por ensayo y error, como muchos de los edulcorantes: sacarina, ciclamato, acesulfamo-K (denominado en la industria alimentaria como E950) o aspartama.

Remsen y Fahlberg descubrieron la dulzura de la sacarina en 1879 durante las investigaciones de la oxidación de o-tolueno-sulfamidas. Igualmente, Sveda descubrió accidentalmente el sabor dulce del ciclamato en 1937. Clauss y de Jensen (1973) reconocieron el sabor dulce de un producto obtenido por reacción butino con fluorosulfonil isocianato, dio como resultado el desarrollo de acesulfamo-K (antes llamado acetosulfam). En 1965, fueron descubiertas las propiedades edulcorantes del dipéptido L-aspartil-L-fenilalanina éster (aspartamo), por J. Schlatter, mientras que sintetiza gastrina y sus análogos tetrapeptídicos. Schiffman y Gatlin (1993) muestran que tres de estos cuatro edulcorantes, acesulfamo-K, sacarina y ciclamato, contienen un grupo sulfonamida y una parte lipofílica. La aspartama, sin embargo, no tiene relación química con los otros tres.

Otros edulcorantes se han aislado o sintetizado a partir de productos naturales. Por ejemplo, el esteviósido y el rebaudiósido derivan de *Stevia rebaudiana Bert.*, un arbusto diminuto que crece en Paraguay. Neohesperidina dihidrochalcona es un producto de hidrogenación alcalina de neohesperidina, un flavonoide cítrico de sabor amargo. En la década de 1980 un sesquiterpeno denominado hernandulcina se aisló de la planta mexicana *Lippia dulcis Trev*. La monelina es una proteína, compuesto de dos cadenas polipeptídicas diferentes, y se encuentran las bayas rojas de la enredadera tropical *Dioscoreophyllum cumminsii Diels*, nativa de África occidental. La taumatina I y II, se han aislado de la fruta de una planta africana, *Thaumatococcus damellii Benth.*

A pesar del número de compuestos dulces de los que conocemos su estructura no se sintetizan muchos de ellos debido a los considerables gastos de síntesis. Excepción es la amplia síntesis de miles de análogos del éster metílico de L-aspartil-L-fenilalanina (aspartama) después de su descubrimiento.

También ha habido una amplia investigación sobre análogos estructurales de la sacarina como el acesulfamo-K (Clauss y Jensen, 1973). Estructuras como la sacarina tienen un sabor amargo subyacente que está enmascarado por un componente dulce (Hamor, 1961).

El sabor dulce es multidimensional y transducido por múltiples receptores. Muchos experimentos apuntan a la variabilidad no homogénea entre los edulcorantes en personas. En 1980, Faurion *et al.* encontraron que los umbrales para los edulcorantes

variaban independientemente del sujeto. Este estudio reveló que no era posible predecir el umbral de un compuesto para un sujeto mediante el conocimiento de su umbral para otro compuesto.

Una segunda línea de evidencia que indica una multiplicidad de receptores para el dulce, ha sido derivada a partir de datos experimentales que utilizan el método de adaptación cruzada. Se basan en la suposición de que dos estimulantes del gusto pueden compartir receptores comunes. Si la exposición es prolongada (adaptación) a uno, da como resultado una disminución de la respuesta a otro. A la inversa, si no hay una disminución de la sensibilidad a un saborizante después de la adaptación a otro, una posible implicación es que un segundo subtipo de células con diferente receptor está involucrado. El grado de adaptación variaba en función de los edulcorantes que se probaron. Por ejemplo, la sacarina sódica se reduce significativamente en intensidad por la adaptación a acesulfamo-K y viceversa. La adaptación al xilitol y glucosa reduce la intensidad de todos los edulcorantes lo que sugiere que estos activan todos los subconjuntos de células receptoras sensibles al dulce.

Una tercera línea de evidencia para múltiples receptores dulces parte de un experimento en el que se pidió a los sujetos discernir la similitud en calidad de 17 edulcorantes (Schiffman *et al.*, 1979). El resultado reveló que la dulzura es un concepto multidimensional con diferentes cualidades dulces características, así como diferentes gustos secundarios y propiedades temporales. La naturaleza de la sensación dulce entre estos edulcorantes variaba, y el "dulce" en sí no es una unidad o propiedad indiferenciada. Además, los sujetos indicaron que la ubicación de dulzor en la lengua varió en función de los edulcorantes. Este hallazgo también fue corroborado por van der Wel y Arvidson (1978) que encontraron como la taumatina (edulcorante natural, en la legislación alimenticia se identifica con el código E957) producía un intenso dulzor en los bordes de la lengua, mientras que la sacarosa es más intensa en la punta de la lengua.

Además, se desarrolla una cuarta línea de evidencia que proviene de la variabilidad en curvas dosis-respuesta para diferentes edulcorantes (DuBois G. *et al.*, 1991). Una quinta línea de evidencia que habla a favor de múltiples receptores dulces viene dada a partir de la comparación de la pérdida de sabor dulce relacionada con la edad (Schiffman *et al.*, 1981). La pérdida percibida de la dulzura con la edad no era uniforme comparando los diferentes edulcorantes, la mayor pérdida fue para las moléculas grandes que tienen el mayor número de posibles sistemas AH-B, tales como taumatina, rebaudiósido y neohesperidina dihidrochalcona.

Cada vez en nuestra sociedad se da más importancia a las comidas bajas en calorías, de aquí la importancia de los edulcorantes no calóricos y su relación con el apetito y el peso. Se han utilizado dos tipos de investigaciones para evaluar el efecto de edulcorantes de alta potencia sobre el apetito y la ingesta de alimentos.

La primera, aditiva, pone a prueba el efecto que la percepción de un sabor dulce tiene en las respuestas posteriores. Se compara las respuestas de alimentos sin azúcar con alimentos dulces idénticos nutricionalmente. La aspartama, que da un sabor dulce en cantidades calóricas insignificantes, ha sido utilizado con más frecuencia en los estudios de aditivos, para proporcionar dulzor sin cambiar el valor nutricional de la sustancia. Por ejemplo, refrescos no calóricos se han comparado con agua mineral (Black *et al.*, 1991; 1993) y un batido endulzado con aspartama se comparó con uno no endulzado (Brala *et al.*, 1983). El segundo enfoque, sustitutivo, sustituye un edulcorante calórico por uno no calórico en un alimento, produciendo un alimento con igualdad de dulzura pero significativamente menos calórico. Como las propiedades sensoriales de la comida son las mismas, el estudio revela el efecto de variables no sensoriales como la densidad calórica sobre la saciedad. En estas investigaciones no se han encontrado diferencias en las calificaciones del apetito después del dulce calórico y no calórico (Brala *et al.*, 1983; Rolls *et al.*, 1990; Canty y Chan, 1991; Black *et al.*, 1993).

Un grupo de individuos ingirió agua edulcorada con aspartama y después solo agua, los resultados fueron comparados. Las calificaciones del hambre y deseo de comer eran más altas después de la ingestión de agua edulcorada con aspartama. En un informe posterior (Rogers *et al.*, 1990) concluyeron que con una solución más dulce de aspartato, 117,5 mg/100 ml, no se produjo ningún efecto significativo. Black *et al.* (1993) encontraron un aumento de apetito después de la toma de agua mineral edulcorada con aspartama, pero sólo cuando se consumía 280 ml; no se encontró este aumento de apetito cuando se consumieron 560 ml. En otros estudios se ha demostrado una ingesta marginalmente reducida después del consumo de soluciones de aspartato, en consonancia con las observaciones de Mattes (1990).

Los resultados de una investigación que utiliza la sacarina para endulzar el yogur (Rogers y Blundell, 1989) están en desacuerdo con el estudio anterior referente al aspartamo. Después de la ingestión de yogur endulzado con sacarina, los sujetos sentían menor saciedad 30-60 minutos más tarde, además su posterior ingesta de alimentos aumentó. Rogers y Blundell (1989) comparan el yogur glucosa-dulce y

equicalórico con yogur con edulcorante tuvo efectos comparables sobre el apetito y la ingesta de alimentos posterior.

Así, la mayoría de los estudios no apoyan la afirmación de que lo dulce *per se* estimula el apetito y/o la ingesta de alimentos. Los resultados mostraron que la ingestión por lo general de precargas con igual dulzura pero diferente contenido calórico dan lugar a efectos similares sobre las sensaciones del apetito. Se puede inferir entonces, al menos inicialmente, que la cantidad y volumen de una sustancia tienen un mayor efecto sobre el apetito que su contenido calórico. También las expectativas sobre el contenido calórico de un alimento influyen en el apetito y la saciedad (Booth *et al.*, 1976; Tepper *et al.*, 1991).

Se han realizado estudios para comprobar la respuesta hedónica a los edulcorantes comparada con otras sustancias (acesulfamo-K, aspartama, fructosa, galactosa, glucosa, glicina, lactosa, maltosa, sacarina sódica, sacarosa, xilitol). Se comprobó en cinco grupos de terneros de 4-16 semanas de edad. Los compuestos fueron presentados a los terneros durante 12 a 24 horas de pruebas de preferencia. Las concentraciones de glicina (10 mM y superior), sacarosa (20 mM y superior) y fructosa fueron las preferidas. La sacarina sódica fue altamente preferida por encima de concentraciones de 4 mM, la fructosa y lactosa estaban por encima de la galactosa 40 Mm y, moderadamente, de acesulfamo-K y maltosa. El aspartamo y el xilitol no eran preferidos, a cualquier concentración (Kellekant *et al.*, 1994).

Hasta hace poco, la creencia general era que los edulcorantes no nutritivos eran sustitutos saludables del azúcar, ya que proporcionan el sabor dulce sin calorías o efectos glucémicos. Sin embargo, los datos de varios estudios epidemiológicos han encontrado que el consumo de estos edulcorantes, principalmente en los refrescos de dieta, se asocia con mayor riesgo de desarrollar obesidad, síndrome metabólico y diabetes tipo 2. Recientes estudios parecen indicar que estos compuestos considerados "metabólicamente inactivos", podrían promover la desregulación metabólica. Se presentan tres posibles mecanismos, que no son mutuamente excluyentes:

- 1) Los edulcorantes no calóricos interfieren con respuestas aprendidas que contribuyen a controlar la glucosa y la homeostasis energética,
- 2) Estos edulcorantes pueden interferir con la microbiótica intestinal e inducir la intolerancia a la glucosa, y

3) Los edulcorantes no calóricos pueden interactuar con los receptores del sabor dulce expresados en todo el sistema digestivo que desempeñan un papel en la absorción de glucosa y la secreción de insulina.

Los datos apoyan que estos edulcorantes no calóricos tienen efectos metabólicos. Se necesitan más investigaciones para dilucidar los mecanismos por los cuales estos pueden impulsar la desregulación metabólica y comprender mejor los efectos potenciales de estos aditivos alimentarios de uso común (Pepino, 2015)

Los edulcorantes intensos, ingredientes alimentarios de potencia edulcorante muy alta, no traen nutrientes o calorías en cantidad suficiente, pero son capaces de inducir, por sí mismos, efectos metabólicos importantes. En contraste, y por definición, no están desprovistos de efectos sensoriales. También, como azúcares calóricos de estimulación, pueden presentar sensaciones de sabor dulce que, en algunas circunstancias, provocan secreción muy temprana de insulina en la llamada fase cefálica. Sin embargo, esta respuesta, que es de muy baja amplitud y no siempre se observa, es insuficiente para provocar consecuencias metabólicas importantes. En particular, el supuesto de que el desacoplamiento entre la estimulación sensorial oral y la falta de ingesta nutricional puede aumentar la sensación de hambre y aumentar posteriormente la ingesta de comida y, por lo tanto, ser una posible causa de sobrepeso, fue refutada por un número importante de trabajos científicos. Es posible, por el contrario, que el uso de edulcorantes intensos, en particular en bebidas, permita una cierta reducción en la ingesta de energía, favorable para un buen control de peso. El reciente descubrimiento de la presencia de receptores del gusto para azúcares en las células intestinales que producen las hormonas entéricas GIP y GLP-1 ha vuelto a encender el debate sobre una posible capacidad de estos edulcorantes para estimular directamente la liberación de estas incretinas, si bien no confirmado por estudios clínicos llevados a cabo en el hombre (Fantino, 2011).

1.8.- El sabor dulce

Por lo general, el sabor dulce significa la presencia de alimentos con calorías y se acepta que existe una estrecha relación entre la percepción de sabor dulce, la preferencia y el estado nutricional. El sabor dulce permite la identificación de nutrientes ricos en energía Kinnamon (2012). Sin embargo, los mecanismos implicados siguen siendo desconocidos. Como factores internos que afectan la sensibilidad del gusto dulce se han apuntado endocannabinoides que modulan periféricamente la

sensibilidad del gusto a través de sus receptores cognitivos. La leptina, un mediador anorexígeno que reduce la ingesta de alimentos actuando sobre receptores hipotálamicos, suprime selectivamente las respuestas del sabor dulce. En contraste, los endocannabinoides, mediadores orexigénicos, que inducen el apetito y estimulan la ingesta de alimentos a través de los receptores del hipotálamo, mejoran selectivamente las respuestas al sabor dulce. Por tanto, la leptina y los endocannabinoides no sólo regulan la ingesta de alimentos a través del sistema nervioso central, sino también modulan la palatabilidad de los alimentos mediante la alteración de la sensibilidad periférica del sabor dulce (Chen *et al.*, 2010). Estos mismos autores comprueban que los ratios de consumo y preferencias de diferentes concentraciones de sacarina en la dieta fueron significativamente más bajos en las ratas obesas con alto contenido graso inducido por la dieta que en ratas normales, mientras que los niveles de leptina en suero se incrementaron notablemente en las ratas obesas.

En consonancia con los cambios en la ingesta de sacarina, el nivel de expresión génica del receptor T1R3 del sabor dulce se redujo significativamente en las ratas obesas inducidas por la dieta en comparación con las ratas control. Por el contrario, las ratas sometidas crónicamente a dieta restringida mostraron un notable mayor consumo y preferencia por la ingesta de dieta con 0,04 M sacarina (Chen *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren que el estado nutricional afecta a la preferencia por la sacarina y la expresión de T1R3 en las yemas gustativas.

El gusto es responsable de evaluar el contenido nutritivo de los alimentos, orientar conductas apetitivas esenciales, prevenir la ingestión de sustancias nocivas a ingerir y ayuda a asegurar el mantenimiento de una dieta saludable. En el medio natural, el sabor dulce es una señal para la comestibilidad (Ramírez, 1990). Por esta razón, existe una tendencia innata en muchas especies animales, incluyendo los seres humanos, a la preferencia por el sabor dulce.

En el proceso de la evolución, el cerebro primitivo fue programado para buscar sustancias de sabor dulce, como la leche materna y las frutas maduras, ambas fuentes dulces y ricas en nutrientes y calorías. Incluso los protozoos en un aplaca de Petri evitan los alcaloides venenosos y se dirigen directamente a la fuente de sucrosa. Se teoriza que los receptores del sabor dulce transmiten un mensaje al cerebro que desencadena un lanzamiento de endorfinas (Roach, 1989).

Los seres humanos nacen con la capacidad de distinguir el sabor de los azúcares y otras cualidades de sabor (Lipsitt y Behi, 1990). Se ha observado en los neonatos que

ingieren con más fuerza agua con azúcar (Nowlis y Kessen, 1976) y más tiempo (Crook C.K., 1978) que simplemente agua.

Los estudios con ratas han revelado, también, una preferencia innata por el sabor dulce. Ratas recién nacidas muestran respuestas positivas de ingestión a las infusiones orales de soluciones de sacarosa (Hall y Bryan, 1981) e hidratos de carbono (Vigorito y Sclafaniet *al.*, 1988). Ratas con 12 días de edad también responden positivamente a sacarina sódica (Jacobs H.L., 1964) (Swithers-Mulvey y Hall, 1992).

En cuanto a la adaptación evolutiva, la memoria-sabor es necesaria para la identificación adecuada de alimentos nutritivos disponibles y, por supuesto, es esencial para evitar las toxinas mortales. Nuñez-Jaramillo *et al.* (2010) estudiaron la capacidad de respuesta de las ratas recién nacidas a un sustituto fluido del pezón con la provisión de sabores básicos (dulce, ácido, amargo y salado) y evaluaron los efectos de esta primera experiencia gustativa que posteriormente se comparó con la respuesta al pezón (pezón vacío) o a proporcionar agua de buena calidad. En comparación con el agua, la sal y la quinina redujeron significativamente el apego, mientras que la sacarina y la leche aumentaron significativamente la conducta de apego. Los datos sugieren que, en ratas recién nacidas, ya en un par de horas después del nacimiento, los mecanismos de detección gustativa tienen el control sobre el comportamiento de la succión. Esto avala los estudios como el de Nizhnikov *et al.* (2001) con ratas recién nacidas en las que se examinó la capacidad de respuesta ante el pezón materno y otros sabores básicos. Se comprobó que la capacidad de respuesta y apego al pezón y la sacarina aumentó significativamente en comparación con el agua, la sal y la quinina.

Estudios realizados con ratas wistar exponiéndolas tempranamente a la ingesta de sacarosa han dado como resultado que esta exposición temprana a sabores específicos influye en el patrón de consumo en la edad adulta. Además, es posible señalar la importancia del aprendizaje a una edad temprana como una herramienta para prevenir el desarrollo de patologías por alimentos. (López-Espinoza *et al.*, 2013).

También se ha establecido la relación entre el gusto por lo dulce y el estado nutricional. Durante el ayuno, soluciones de sacarosa se han valorado como más agradables que después de la saciedad nutricional (Cabanac y Duclaus, 1970; Fantino *et al.*, 1986). Los cambios en lo agradable de sabor dulce varían en función del estado nutricional, pudiendo ser un componente de la regulación de la ingesta de alimentos. Cuando las reservas de energía interna se han agotado y es necesario el aporte calórico, la percepción de dulzor es altamente agradable y aumenta la probabilidad de

que un alimento sea comido. Durante la fase lútea del ciclo menstrual, el dulzor se experimenta como más agradable y la ingesta de alimentos dulces aumenta (Bowen y Grunberg, 1990). Durante esta fase la tasa metabólica se eleva y hay un aumento de la palatabilidad, y la ingesta de alimentos de dulces sería compensatoria para un mayor gasto de energía. También se ha demostrado que los niños entre 9 y 15 años de edad prefieren con más intensidad el sabor dulce que los adultos (Desor *et al.*, 1975), debido a que el adolescente, generalmente, tiene altos niveles de actividad y las necesidades de calorías son más altas. Por todo lo anterior podemos inferir que la preferencia elevada para el dulzor puede ser debido a una respuesta adaptativa a las necesidades fisiológicas. Chen *et al.* (2010) en un estudio que relaciona el estado nutricional con la preferencia por la sacarina concluyen que el estado nutricional altera la preferencia de la sacarina y la expresión de T1R3 (gen para receptor del sabor dulce) en las papilas gustativas.

Hay importantes diferencias individuales para la preferencia por la intensidad de lo dulce. En los adultos, existe una considerable variabilidad individual en las reacciones hedónicas a estímulos dulces (Warwick y Schiffman, 1990). Los "sweet likers" son personas que evalúan altamente positivas soluciones dulces de sacarosa. Los "sweet dislikers" son los que responden negativamente a las concentraciones de sacarosa. Estado *liker/disliker* dulce es constante durante los estados de ayuno y alimentados, aunque para *dislikers*, lo desagradable de las soluciones muy dulces disminuye después de estar en ayunas (Looy y Weingarten, 1991). Entre *liker/disliker* no hay cambios cuando se utiliza como edulcorantes la fructosa o glucosa (Looy H.*et al.*, 1992).

La capacidad de las personas sanas para distinguir una amplia gama de gustos es esencial para el disfrute de los alimentos y bebidas. Esta capacidad también promueve la digestión y protege contra compuestos dañinos (Kohlmeier, 2009). La punta de la lengua reacciona más ante los sabores dulce y salado, las zonas marginales ante los ácidos y la V lingual es sobre todo más sensible a los sabores amargos. Pero no se trata de localizaciones absolutas, pues una misma papila puede reaccionar ante estímulos diversos. Dulce y amargo son las dos modalidades gustativas más destacadas y contradictorias en los humanos y otros animales, provocando la atracción y aversión, respectivamente. La información de sabor dulce y amargo se traduce en respuestas conductuales binarias en el cerebro (Sugita *et al.*, 2013). En general, el sabor dulce permite identificar los nutrientes ricos en energía y el amargo advierte contra el consumo de productos potencialmente tóxicos. Recientes estudios han demostrado que estos dos sabores han representado en el córtex gustativo primario del cerebro un mapa espacial. Yueqing *et al.* (2015) han corroborado la segregación de cualidades

gustativas de la corteza, que exponen la naturaleza innata de las respuestas apetito-aversión, e ilustran la capacidad de la corteza gustativa a recapitular comportamientos complejos en ausencia de estímulos sensoriales.

Lo que diferencia el sabor dulce de los demás es el receptor que asegura la especificidad (Kinnamon *et al.*, 1988). En otros casos como los sabores salado y ácido, lo que provoca la variación de potencial eléctrico en las células nerviosas es un efecto directo sobre los canales de Na^+ en el primer caso y de K^+ en el segundo (Tonosaki y Funakoshi, 1988).

Esta aclaración resume y analiza el conocimiento actual sobre el papel fisiológico del receptor del gusto dulce (T1R2/T1R3), así como potenciales posibilidades terapéuticas que resultan de su inhibición. Fuera de la boca, la expresión funcional de la dulzura del receptor también se ha descrito en muchos otros tejidos, donde se sugirió que podría participar en la regulación de los procesos metabólicos. Entre estos órganos, podemos citar el intestino, páncreas, vejiga, cerebro, también el hueso y el tejido adiposo. En el intestino, se ha demostrado que el receptor T1R2/T1R3 está implicado en la detección luminal de la glucosa, la liberación de citocinas y ciertas hormonas de la saciedad, la expresión de los transportadores de glucosa y, finalmente, el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. Muy recientemente, se ha propuesto que el receptor del gusto dulce está implicado en la regulación de la adipogénesis y la regulación de las funciones biológicas de los huesos. Sigoillot *et al.* (2015) abren el conocimiento acerca de los diferentes inhibidores de sabor dulce, como el ácido gimnémico, proteína inhibidora llamada gurmarine o lactisole, y discuten su mecanismo de acción en el receptor. La identificación de nuevos roles del estímulo-receptor del gusto dulce para modular su actividad a través de inhibidores, abren interesantes perspectivas sobre todo en el tratamiento de la obesidad y algunas enfermedades metabólicas como la diabetes y las hiperlipidemias.

La aclaración de las bases moleculares del sabor dulce es de gran interés no sólo por su importancia biológica intrínseca, sino también para el diseño de nuevos edulcorantes artificiales. Hasta hace pocos años el diseño se complicó por la creencia común de que las diferentes clases de compuestos dulces, especialmente las proteínas dulces, podrían interactuar con diferentes receptores. La reciente identificación y expresión funcional del receptor de sabor dulce han demostrado que no hay más que un receptor, un cambio drástico en el enfoque para el desarrollo de nuevos edulcorantes. La explicación de cómo el receptor dulce puede unir diferentes clases de moléculas, es que en lugar de haber múltiples receptores, al parecer, hay varios sitios

en el receptor del gusto dulce. Se estudiaron los mecanismos de interacción de las pequeñas y macromoleculares dulces, el resultado más importante de estos estudios es el "modelo de cuña", la primera explicación del sabor de las proteínas dulces. Además, se demostró que la unión simultánea a los sitios A y B no es posible con dos grandes edulcorantes pero es posible con una pequeña molécula en el sitio A y una grande en el sitio B. Esta observación representó la explicación, por primera vez, para el peculiar fenómeno de sinergia entre algunos edulcorantes (Temussi, 2007).

1.9.- Sacarina

La fórmula de la sacarina es $C_7H_5NO_3S$; su peso molecular es 183,188; químicamente se describe como cristales blancos o polvo blanco cristalino, sin olor o con olor aromático leve, con gusto dulce, incluso en solución muy diluida.

Física y Química de la sacarina sódica. Categoría química: N-sulfonilamida 1,2-bencisotiazol-3 (2H) -uno- 1,1-dióxido, la sal Na (Budavari S.,1989); 2,3-dihidro-3-oxobenzisulfonazole, sal Na ; dihidrato de sal sódica de 1,2 bencisotiazolin-3-uno-1,1- dióxido (Reynols, 1989). Fórmula molecular: $C_7H_4NNaO_3S$. Peso molecular: 241,2.

Solubilidad: 1gr/1,2 ml agua. 1 gr/50 ml de alcohol.

Estabilidad (pH, calor): Soluciones de sacarina sódica son estables a la pasteurización, la hidrólisis lenta a bajo pH. Los productos de hidrólisis son el ácido 2 sulfobenzoico y el ácido 2-sulfamoilbenzoico.

Ruta de degradación *in vivo*: La sacarina se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal, siendo casi todo lo que se excreta, sin cambios en la orina dentro de las 24-48 horas siguientes. Debido a que no se metaboliza, no proporciona calorías.

Propiedades temporales: El 25% de la población detecta un regusto amargo, metálico y astringente, en los productos con sacarina a una concentración por encima de 0,01%. Este regusto aumenta a mayor concentración. Este sabor característico es inherente a la molécula de sacarina y no atribuible a las impurezas. Schiffman *et al.*, (1979) realizaron un estudio para detectar las cualidades del sabor de la sacarina en humanos, la conclusión es que esta sustancia no es meramente dulce para las personas, sino que describen otros estímulos como amargo y "metálico". En 1992, Nancy K. Dess, concluyó que el gusto de la sacarina en ratas es paralelo al de los humanos. En ratas, cuando la cantidad de sacarina utilizada es baja estas la reconocen con un gusto similar a los azúcares, sin embargo a altas dosis su percepción de gusto es

más similar a la quinina. Igualmente, se observa que no todas las ratas consumen las soluciones de sacarina por igual, mientras que unas lo hacen con avidez otras las rechazan. Esto es muy similar a lo descrito en humanos.

Se han utilizado varios aditivos en un intento para enmascarar este sabor, incluyendo sacarosa, lactosa y tartratos. La sacarina ha sido combinada, con éxito, con otros edulcorantes de alta potencia y con sustitutos del azúcar. Ejemplos son la sacarina con ciclamato 1:10, sacarina con fructosa 0.75:100 y sacarina con aspartama 1:1 (Askar, 1988; Wells, 1989). El perfil temporal de la sacarina es similar a la sacarosa. El tiempo de aparición es de 4 s y el tiempo de extinción es de 14 s (Kim y Dubois, 1991).

Límites de uso: En EE.UU. la FDA ha recomendado que la ingesta diaria no debe exceder de 1 gr. El informe del Comité Conjunto de Expertos de la FAO/OMS en Aditivos Alimentarios dio una ADI o dosis diaria admisible (DDA), aceptable temporal estimado para la sacarina, incluyendo sus sales de calcio, potasio y sodio, de hasta 2,5 mg/kg de peso corporal. En 1969, la ADI había sido de 15 mg/kg. Está aprobada para uso como aditivo alimentario en más de 100 naciones y es considerado como edulcorante no nutritivo por su capacidad de agregar edulcorante sin calorías o carbohidratos (Fitch, 2016). La UE ha propuesto una directiva que especifica el nivel máximo aceptable de los edulcorantes que pueden utilizarse como aditivos alimentarios, específicos para el sabor dulce. Para la sacarina y sus sales, los designaron como etiqueta E 958.

Efectos fisiológicos y toxicológicos: La sacarina sódica tiene baja toxicidad aguda: LD50 (rata oral) = 14.200 mg/kg. Estudios de alta dosis en ratas tienen efectos adversos, incluyendo el cáncer de vejiga. Sin embargo, una revisión, donde se estudiaron los problemas de seguridad relacionados con la sacarina en 1983 concluyó que la bioquímica y fisiología son diferentes y los efectos que se producen en ratas, incluyendo los tumores de vejiga, no se producen en los seres humanos bajo los patrones normales de uso.

De acuerdo con las directrices de la CE de 1991, se permite la sacarina para su uso en bebidas no alcohólicas, postres, desayunos, cereales, helados, frutas, confiterías, productos de panadería y bebidas alcohólicas. Límites máximos aprobados son 50 ppm en bebidas no alcohólicas comparable a una dulzura proporcionada por 2% de sacarosa y 100 ppm en postres para comparar el dulzor proporcionado por 3% sacarosa (Nordmann, 1991).

1.9.1.- Dosis Diaria Admisible (D.D.A.)

La primera reunión del comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios tuvo lugar en 1965 y se ocupó de los principios generales que regulan el empleo de aditivos alimentarios, incluyendo aquí los edulcorantes artificiales. Se recomendó que los aditivos alimentarios se usen únicamente previa autorización de las autoridades pertinentes y que la fiscalización legal de los aditivos se base en el sistema de listas permitidas.

En la evaluación de una sustancia propuesta para su uso como aditivo alimentario hay que tener en cuenta dos factores: la eficacia tecnológica y la inocuidad en el empleo. Los posibles peligros que el empleo de un aditivo alimentario pueda presentar para el consumidor deberán compararse con los beneficios que aquél proporcione.

En la evaluación toxicológica de una sustancia propuesta para uso como aditivo alimentario hay dos fases. La primera es la recopilación de información pertinente, que generalmente procede de ensayos experimentales con animales de laboratorio y, cuando ello es posible, de observaciones en seres humanos. La segunda es la interpretación y valoración de la información para poder llegar a una decisión acerca de la aceptabilidad o no de la sustancia como aditivo alimentario.

El procedimiento general adoptado consiste en establecer una dosis diaria admisible (DDA) en el hombre, para cada aditivo alimentario o para cada grupo de aditivos. Cuando los datos toxicológicos proceden de experimentos con animales, su extrapolación al hombre entraña la aplicación de un factor de seguridad a la "dosis carente de efecto" máxima obtenida en los estudios con animales para obtener la DDA. La "dosis carente de efecto" significa la dosis de una sustancia que puede incluirse en la ración alimenticia de un grupo de animales sin ocasionar en ellos efectos tóxicos. Esta dosis se multiplica por un factor de seguridad de 100 (por 10 porque se considera que el hombre es 10 veces más sensible y de nuevo por 10, porque hay que tener en cuenta los distintos grados de sensibilidad individual). Este umbral de seguridad tiene en cuenta la multiplicidad de riesgos, el consumo a largo plazo, el hecho de que no todos los elementos de riesgo se conocen hoy y la prudencia necesaria cuando se trata de nuestra salud.

La dosis diaria admisible (DDA) para el hombre, expresada con relación a su peso corporal (mg/kg), es la cantidad de aditivo alimentario que puede ingerirse diariamente con la ración alimenticia, incluso a lo largo de toda la vida, sin riesgo

alguno. La OMS ha fijado la DDA de la sacarina sódica de 0-2,5 mg/kg de peso y de 180 mg para un adulto.

Asimismo, la reglamentación señala que, aunque el aditivo se incluya en las listas positivas, se mantiene en observación de forma permanente, y si se sospecha el menor riesgo se prohíbe de inmediato, excepto cuando no existe un sustituto para él, como ocurre en el caso de los nitritos.

1.9.2.- Efectos de la sacarina sobre la percepción gustativa y sobre la salud

Wakisaka (2006) realizó un análisis del comportamiento sobre seres humanos y reveló que un recién nacido pocos días después del nacimiento puede distinguir entre lo dulce y lo amargo, y expresa el placer de un sabor dulce pero desagradable por un sabor amargo.

El estrés aumenta la secreción de glucocorticoides, los cuales afectan significativamente al comportamiento de ingestión y preferencias gustativas en humanos y modelos de roedores. Altera una subunidad del receptor del gusto dulce (Tas1r3) en el tejido gustativo y reduce la excitación gustativa nerviosa por compuestos dulces (Parker *et al.*, 2014).

Los efectos del estrés sobre la alimentación pueden ser específicos de un sexo, como ocurre en las mujeres y el consumo de alimentos dulces tras el estrés (Epel *et al.*, 2001; Zellner *et al.*, 2006). Este incremento puede ser debido a la reducción de la sensibilidad a los estímulos dulces (Al'Absi *et al.*, 2012), aunque los umbrales de sabor dulce en los seres humanos pueden disminuir inmediatamente después de la exposición de estrés agudo (Illery-Gurel *et al.*, 2013).

A partir del incremento del uso de sacarina, como consecuencia de la prohibición del ciclamato, se realizaron numerosos estudios con el objeto de establecer los posibles efectos tóxicos de esta sustancia. Entre estos efectos se encuentra el cáncer de vejiga estando perfectamente establecida la relación entre la sacarina y el desarrollo de este cáncer.

En la mayoría de estos estudios se han administrado dosis mayores o iguales al 5% de la dieta, administradas durante la gestación y a la descendencia, dando como resultado un incremento estadísticamente significativo en la incidencia de tumores malignos de vejiga. En ellos se sugiere que la administración de sacarina a edad muy temprana es un prerrequisito necesario para el desarrollo de tumores. También observaron que con aproximadamente un 1% de sacarina en la dieta no había efecto

para la inducción de tumores, es decir el riesgo de cáncer de vejiga con bajas dosis de sacarina es remoto.

Los últimos estudios parecen demostrar que es la sacarina sódica y no la sacarina *per se* la que promueve el desarrollo del cáncer de vejiga. Varios investigadores han estudiado la acción promotora de las sales de sodio de otros ácidos orgánicos de bajo peso molecular, así Fukushima *et al.* (1983) encontraron que el ascorbato sódico pero no el ácido ascórbico producía los mismos cambios urinarios que la sacarina sódica. Estos resultados añaden mayores evidencias a que los cambios en la composición de la orina inducidos por sales de sodio pueden estar relacionados con el desarrollo de tumores.

Otro de los efectos nocivos que produce la sacarina, como el resto de edulcorantes artificiales, es el efecto paradójico sobre la toma de alimentos y sobre el peso (Blundell y Hill, 1986). La sensación gustativa dulce produce modificaciones neurosensoriales y hormonales, entre ellas un aumento de la secreción de insulina por el páncreas. Estos fenómenos preabsortivos preparan al organismo frente a una carga calórica que en realidad no llega, dando una sensación de hambre por disminución de la glucosa en sangre.

El sabor dulce que se provoca por azúcares, edulcorantes artificiales (como sacarina, aspartama, ciclamato, etc.), aminoácidos dulces y proteínas dulces, es muy atractivo para los seres humanos y algunos animales debido a que este sabor indica la existencia de fuentes de carbohidratos y calorías en los alimentos (Yoshida *et al.*, 2013). Estudios recientes han puesto de manifiesto los mecanismos moleculares para la recepción y transducción de sabor dulce: Receptores acoplados a la proteína G, receptor de sabor de tipo T1R2 y T1R3, heterodímeros que actúan como receptores del sabor dulce (Li *et al.*, 2002).

La administración de cloruro de litio que induce la enfermedad después de que el animal haya probado un saborizante dulce (sacarina) da como resultado el aprendizaje de aversión condicionada al sabor de ese saborizante dulce en particular. Después de la adquisición de esa aversión condicionada para el edulcorante sacarina, esta sustancia tiene un sabor dulce pero cambia a un sabor aversivo (Sugita *et al.*, 2013).

2.- OBJETIVOS

Las yemas gustativas son las estructuras anatómicas responsables de la percepción sávida y están localizadas en su gran mayoría en las papilas linguales gustativas. A través del poro gustativo de las yemas las sustancias presentes en los alimentos estimulan las células receptoras del gusto existentes en ellas. En estas células tiene lugar la transducción de los estímulos hacia los terminales nerviosos y de aquí al área gustativa de la corteza cerebral.

La ultraestructura de las células de las yemas gustativas ha sido ampliamente descrita por numerosos autores en diversas especies. La mayoría de ellos ha coincidido en clasificar las células de la yema gustativa en tres tipos básicos distintos denominados tipo I, II y III, con la presencia de un tipo más, tipo IV, de situación basal, indiferenciado y del que derivarían los otros tres tipos.

El sentido del gusto influye de manera determinante, más que ningún otro sentido, en la alimentación. Por otra parte, además de existir diversos grados de aceptación o rechazo de los distintos sabores y, por tanto, de alimentos, también se ha comprobado que existe un fenómeno de modificación y adaptación del gusto. Incluso es posible que los propios hábitos alimenticios conduzcan a modificaciones en las yemas gustativas.

En la tecnología de los alimentos cada vez se están utilizando con mayor frecuencia aditivos con sabores que produzcan una sensación agradable y al mismo tiempo se va tomando mayor interés por los alimentos bajos en calorías. Esta práctica también ha sido adoptada por los laboratorios farmacéuticos, incorporando a los medicamentos de administración oral aditivos, principalmente edulcorantes, para hacer más agradable la ingestión de los mismos o paliar el desagradable sabor de un principio activo.

En relación con todo ello, el objetivo del presente trabajo es realizar un estudio mediante técnicas morfométricas y estereológicas de los diferentes tipos celulares de las yemas gustativas de las papilas valladas, foliadas y fungiformes de la rata, como animal de experimentación ampliamente utilizado en este tipo de estudios. Estas técnicas permitirán definir cada tipo celular bajo una base matemática analizando parámetros tanto de la célula en conjunto y del núcleo, así como de cada uno de los orgánulos citoplasmáticos presentes.

Para comprobar si esos hábitos alimenticios o la ingestión de determinadas sustancias de uso frecuente, en este caso un edulcorante ampliamente utilizado como es la sacarina, provocan dichas modificaciones, es necesario, en primer lugar, definir

las características estándar de los órganos encargados de la percepción sávida en individuos alimentados con dieta habitual (control) y comparar estos con ratas sometidas a una dieta rica en sacarina.

Todo ello porque el sabor no es una simple sensación hedónica, es fundamental para el comportamiento en la ingesta de nutrientes y, así, para la salud y el mantenimiento de las funciones vitales. De esta manera, el mejor conocimiento de las estructuras y mecanismos fisiológicos complejos del gusto permitirá comprender mejor sus alteraciones y las consecuencias de las mismas.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Generalidades

En nuestro estudio hemos utilizado 28 ratas Wistar macho divididas en dos grupos (control y sacarina) de 14 ratas cada uno. Estos animales disponían de agua corriente y pienso en polvo para ratas (Panlab) *ad libitum*. Después de, al menos, 8 días de adaptación al animalario, comederos, pienso en polvo, etc., al grupo de sacarina se le añadió el aditivo a una dosis correspondiente a la DDA (Dosis Diaria Admisible) multiplicada por un factor de 100, repartida entre el pienso y el agua. La DDA para la sacarina sódica es de 2.5 mg/Kg peso/día (LeRoy, 1990). Diariamente se registraba el consumo (pienso y agua) de los dos grupos y semanalmente se pesaban los animales, con el fin de ir ajustando el porcentaje de aditivo que añadíamos a la dieta para que los animales consumieran la dosis propuesta.

A las 8 semanas de tratamiento, previamente al sacrificio los animales fueron anestesiados con tiopental sódico inoculado intraperitonealmente a una dosis de 6 mg/100 g peso. Conseguido un grado de anestesia suficiente se accedió a la cavidad torácica y mediante una bomba de perfusión se limpió el aparato circulatorio con una solución PBS 0.1 M. y 5 U.I./ml de heparina sódica inyectados por el ventrículo izquierdo. Se consideró que el aparato circulatorio estaba limpio cuando el fluido de retorno que llegaba al atrio auricular derecho (previamente seccionado) era totalmente claro. A continuación, se perfundió PBS 0.1 M en una cantidad suficiente para eliminar del sistema circulatorio el PBS anterior que contenía heparina. Posteriormente, se perfundió fijador compuesto por glutaraldehído 2,5% y paraformaldehído 2% en PBS 0.1 M. Todos los líquidos perfundidos se mantuvieron a una temperatura aproximada de 37°C.

Las lenguas de cada rata fueron extraídas intentando preservar de daños por manipulación las áreas linguales con papilas gustativas y, posteriormente, se disecaron éstas bajo una lupa estereoscópica obteniendo muestras con forma de pirámide truncada, de manera que las papilas quedaran ajustadas a la base menor de dicha pirámide, a fin de facilitar más adelante la orientación adecuada de las muestras tanto en la inclusión como en el corte al ultramicrotomo.

Se tomaron muestras de todos los tipos de papilas gustativas descritos: valladas (1 por lengua), foliadas (2 por lengua) y fungiformes anteriores y posteriores (un mínimo de 7 por lengua). Se intentó conseguir en todos los casos un tamaño de muestra lo más

adecuado posible para un fácil manejo en todos los pasos del procesamiento para microscopía electrónica.

En conjunto, por cada rata Se procesaron un mínimo de 10 muestras. 1 con la papila vallada, 2 con las foliadas y, al menos, 7 con las fungiformes.

3.2.- Técnicas de microscopía electrónica

Todas las muestras obtenidas fueron procesadas para microscopía electrónica según el siguiente protocolo.

- **Fijación.** El método de fijación empleado influye en gran medida en el grado de preservación de la estructura de las células y de la distribución de los diferentes orgánulos, de lo cual depende la fiabilidad que pueden ofrecer los resultados de un estudio cuantitativo. Las muestras obtenidas con las papilas gustativas se mantuvieron 12 h a 4°C, en la misma solución fijadora que se utilizó en la perfusión (glutaraldehído 2,5% y paraformaldehído 2% en PBS 0.1 M). A continuación se hicieron tres lavados de 30 minutos cada uno con una solución tampón de PBS 0.1 M a 4°C. La postfijación se llevó a cabo en tetróxido de osmio al 1% durante 2h. en oscuridad, efectuando después tres lavados de 30 minutos en la misma solución tampón anterior.

- **Deshidratación.** Este paso se realizó con alcohol etílico según la siguiente secuencia: alcohol de 50º, 20 minutos; alcohol de 70º, 20 minutos; alcohol de 90º, tres pases de 30 minutos y alcohol absoluto otros tres pases de 30 minutos.

- **Inclusión.** Para la inclusión de las piezas se utilizó la resina EPON 812 que polimeriza uniformemente con pequeños cambios de volumen y es estable frente al haz de electrones (Glauert, 1975; Reid, 1975), lo cual es muy adecuado para un estudio estereológico como el que nos ocupa.

El plástico o resina se prepara mezclando dos soluciones (A y B) hechas previamente.

Solución A= 62ml de Epon 812-Epikote 812, Merck, y 100 ml de DD SA-anhídrido dodecenilsuccínico, Merck.

Solución B= 100 ml. de Epon 812 y 89 ml de MNA-anhídrico metilnadínico, Merck.

Ambas soluciones (A y B) se mezclan a partes iguales y se añade, posteriormente, 5,2 ml. de acelerador (2,4,6 tris dimetil aminometil fenol, Merck) agitando hasta

obtener un plástico de consistencia media. La resina así preparada se mantiene en frigorífico a -20°C hasta su utilización.

Para llevar a cabo el proceso de inclusión propiamente dicho se sumergieron las piezas deshidratadas en una solución de óxido de propileno (tres pases de 20 minutos cada uno), a continuación se introdujeron en una mezcla de óxido de propileno y resina Epon a partes iguales durante un tiempo de 5 horas (mínimo). Alcanzado este punto la mezcla propileno-Epon es sustituida por plástico Epon puro, en el cual las muestras se mantuvieron durante 12 horas. Transcurrido este tiempo se extrajeron las piezas y se introdujeron en moldes planos de inclusión con una orientación adecuada, que permitiera la consecución de cortes idóneos en fases posteriores. A continuación se rellenaron los moldes completamente con Epon y en la parte superior de cada uno se colocó una tira de papel con una leyenda identificativa de la muestra.

Para polimerizar la resina los moldes se incubaron en estufa de acuerdo con el siguiente protocolo: a 37° C durante 24 horas, a 45° C durante 24 horas y a 60° C durante otras 24 horas. En las primeras 24 horas la polimerización es mínima, lo que permite reorientar las piezas en la posición adecuada si se considera oportuno.

- **Ultramicrotomía.** Se realizaron cortes semifinos de 1µm sucesivos, según las técnicas descritas por Maxwell (1978), hasta alcanzar el corte con la imagen que más se ajustase a nuestras pretensiones. De todos los bloques procesados se seleccionaron al menos 6 para cada grupo de papilas (valladas, foliadas y fungiformes) utilizando como criterios de selección la proximidad del poro gustativo y la presencia en la yema de células orientadas según el eje ápico-basal.

Los cortes semifinos se obtuvieron utilizando un ultramicrotomo LKB V del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de León, empleando cuchillas de vidrio con un ángulo de corte aproximado de 45° obtenidas a partir de barras de vidrio de 25 mm de anchura en una cortadora de cuchillas LKB 7800 B. Los cortes semifinos resultantes fueron recogidos en una gota de agua destilada sobre un portaobjetos que se colocó en una placa caliente a 90-100° C hasta su desecación y fijación, realizándose después una tinción con azul de toluidina al 0,5% en una solución de borato sódico en agua bidestilada al 1% (Coveñas *et al.*, 1982).

Los cortes ultrafinos se obtuvieron utilizando el mismo ultramicrotomo mencionado anteriormente y una cuchilla de diamante. Se eligieron para el estudio aquellos de un grosor de 80- 100 nanómetros, correspondientes a la interferencia

dorada-plateada y se recogieron en rejillas de cobre de 150 mallas (3-4 rejillas con 3-4 ultrafinos cada una, por bloque procesado).

- Estos cortes fueron **contrastados** siguiendo el método de doble tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo (Glauert, 1975). El acetato de uranilo se prepara mezclando, a partes iguales, alcohol de 95º y una solución saturada de acetato de uranilo en agua bidestilada. El citrato de plomo se obtiene de la mezcla de 1,3 gr de nitrato de plomo cristalizado con 1,78 gr de citrato sódico tribásico en 30 cm³. De agua bidestilada, se agita durante un largo período de tiempo (30 minutos, al menos) para que se forme el citrato de plomo y, posteriormente, se añaden 8 ml de hidróxido sódico 1 N y 9 ml de agua bidestilada.

La técnica de tinción propiamente dicha se lleva a cabo en dos cámaras. A tal efecto se preparan dos placas Petri con el fondo recubierto de papel parafinado (Parafilm American Can CO). En una de las cámaras preparadas se depositan varias gotas de acetato de uranilo sobre el papel parafinado (tantas como rejillas se pretenden teñir de una vez: 6-8), sobre las gotas se colocan las rejillas con los cortes ultrafinos de forma que éstos contacten directamente con el acetato, manteniéndoles así durante 20-30 minutos en oscuridad. Transcurrido este tiempo las rejillas se lavan una por una en agua bidestilada por inmersión tres veces consecutivas y se dejan secar al aire (5 minutos).

En la otra cámara de tinción se depositan de igual forma las gotas de citrato de plomo. En este caso, en la cámara debe haber unas lentejas de hidróxido sódico que saturan el ambiente de la cámara desplazando al dióxido de carbono y evitando así precipitaciones de plomo. Después de haber pasado por el acetato de uranilo, las rejillas secas, se colocan sobre las gotas de citrato de plomo manteniendo el contacto rejilla-gota durante 3-5 minutos, a continuación se lavan, como antes, por inmersión en agua bidestilada 3 veces consecutivas y se dejan secar al aire sobre papel de filtro.

Una vez secas las rejillas se recogen en un portarrejillas quedando listas para su observación al microscopio electrónico. Su examen se realizó en un microscopio electrónico de transmisión (Jeol 1010 Japan) del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de León empleando voltajes de 60 KV y 80 KV.

3.3.- Técnicas morfométricas y estereológicas

3.3.1.- Base teórica

Las técnicas cuantitativas en microscopía electrónica han tenido, desde sus comienzos, dos objetivos claros:

a) Definir un determinado tejido o tipo celular de una forma objetiva, utilizando para ello parámetros que permiten entender matemáticamente la estructura celular.

b) Establecer una base de datos que permita comparar estadísticamente un tipo celular particular con otros o con contrapartidas experimentales o patológicas.

Todo lo anterior implica que para realizar un estudio cuantitativo en microscopía electrónica es necesario dotar al protocolo a seguir de todas las características de rigor que exige un estudio estadístico y que, en este caso, incluye la forma de muestreo desde el material de partida hasta las microfotografías, el tamaño de la muestra en cada paso del proceso así como precaución en el procedimiento de preparación de las muestras de forma que se evite la introducción de artefactos tales como contracciones o dilataciones de los componentes a estudiar, distorsiones, etc.

En microscopía electrónica de transmisión se trabaja con secciones ultrafinas (60-100 nm.) de células o tejidos. La proyección de estas secciones da como resultado una imagen bidimensional en la que se encuentra contenida una determinada información sobre el objeto tridimensional origen. El problema básico en estereología consiste en deducir las propiedades de las células y de sus componentes consideradas en el espacio tridimensional a partir de la información contenida en el plano, sin olvidar que esta información puede ser mínima o engañosa (p.e., la ausencia de perfil de un orgánulo en la sección no significa la ausencia de dicho orgánulo en la célula).

Se puede considerar la estereología como una ciencia aplicada dirigida a la deducción de la estructura tridimensional a partir de las observaciones en dos de sus tres dimensiones. Mediante medidas estadísticas apropiadas sobre el plano test o su proyección y mediante la utilización de ecuaciones estadísticamente exactas se pueden calcular los parámetros o valores reales que definen los componentes de la muestra concebida como un espacio tridimensional (Weibel y Bolender, 1973 y Willians, 1977). La morfometría, en cambio, se reduce estrictamente a la cuantificación en el plano sin posterior extrapolación al espacio tridimensional.

Teniendo en cuenta las consideraciones generales sobre los métodos estereológicos y morfométricos se ha diseñado el presente estudio.

A partir del análisis de los cortes semifinos se seleccionaron los bloques de muestra en los que se apreciaron yemas gustativas bien orientadas y con el poro

abierto o próximo a su apertura. De estos bloques, al menos 5 por cada tipo papilar (valladas, foliadas y fungiformes), se hicieron cortes ultrafinos, recogiendo 3-4 rejillas (3-5 cortes por rejilla) de cada uno de los bloques. Se obtuvo así un conjunto de rejillas del que se seleccionaron por cada bloque aquéllas que reunían una mayor calidad técnica y sobre las que se realizó el estudio microscópico, obteniendo fotografías de, al menos, 5 células de cada uno de los tres tipos celulares básicos (I, II y III) en cada bloque y a dos niveles de aumentos. Se acumuló, así, un material fotográfico que superó las 650 fotografías para las muestras control y otras tantas para las muestras de animales alimentados con sacarina.

Como se indicó anteriormente, el estudio se realizó a dos niveles de aumentos: el nivel 1 (2000X) en el que se valoró la célula en su conjunto y el núcleo, y el nivel 2 (8000X) en el que se analizó cada uno de los orgánulos citoplásmicos.

3.3.2.- Análisis de imagen

Los detalles citológicos observados en las micrografías obtenidas con microscopía electrónica son perfilados manualmente con rotulador aplicando un código de colores identificativos para cada estructura y digitalizadas mediante un escáner. Estas imágenes digitales son evaluadas mediante un sistema de análisis de imagen (Nikon NIS Elements v.3) aplicando una macro semiautomática que permite al operador revisar la detección automática aplicada por el sistema y eliminar los objetos que no reúnen las condiciones técnicas requeridas para el estudio (artefactos de la tinción...). Para cada objeto se calculan los siguientes parámetros básicos número (N), área (A, μm^2), perímetro (P, μm), longitud (L, μm) y anchura (W, μm). A partir de estos datos se calculan los parámetros estereológicos definitivos: Densidad Numérica (DN, $\text{N}/\mu\text{m}^2$), Densidad de volumen (DV, $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$), Densidad de Superficie (DS, $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$) y Coeficiente de Forma (CF).

En el nivel 1 los parámetros que se valoran son: la densidad de volumen celular, el coeficiente de forma celular, la densidad de volumen del núcleo y la densidad de superficie del núcleo. Obtenido por cada fotografía el valor de cada uno de estos parámetros correspondiente a una única célula

En el nivel 2 se estudian orgánulos celulares que tienen membrana. Para ello se dividió la célula en tres segmentos: región intranuclear o basal, región perinuclear o media y región supranuclear o apical. A partir de fotografías de cada una de las tres regiones se estudiaron mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso (RER), aparato de Golgi, gránulos densos, vesículas claras y vesículas nucleodensas. Los parámetros

medidos son densidad de volumen (DV), densidad de superficie (DS), densidad numérica (DN= número de unidades de un orgánulo determinado por μm^3 de zona tomada como referencia).

3.3.3. - Análisis estadístico

Los datos son analizados empleando el programa estadístico SAS/STAT v.9 (SAS Institute, Cary,NC). Los resultados son presentados como las medidas \pm E.E.M. (error estándar de la media) obtenidos por el procedimiento MEANS y un valor de $P < 0.05$ es considerado como estadísticamente significativo. Las medias son evaluadas previamente para verificar su distribución normal empleando el test Shapiro-Wilk.

La distribución de los datos estereológicos es analizada estadísticamente mediante un modelo lineal generalizado (GLM procedure) y las diferencias entre las medias LSM eran calculadas empleando el test de Tukey HSD.

La representación gráfica de los resultados se realiza mediante gráficas Boxplot en las que los puntos extremos se corresponden con el valor máximo y mínimo respectivamente, la caja representa el rango intercuartílico, la media se representa como una cruz y la mediana como una línea horizontal que divide la caja; además, más allá de los límites superior e inferior, aparecen reflejados los datos "outliers" (fuera de rango).

4.- RESULTADOS

En el **APARTADO 9. IMÁGENES. 9.1.- Fotografías** se incluyen las microfotografías realizadas mediante microscopía electrónica de transmisión más representativas de las yemas gustativas de cada papila, observándose en el Nivel 1 los distintos tipos celulares e identificándose en él los correspondientes valores de densidad de volumen celular, el coeficiente de forma celular, la densidad de volumen del núcleo y la densidad de superficie del núcleo.

En las microfotografías del nivel 2 se pueden apreciar los orgánulos celulares que tienen membrana y que han sido analizados en este estudio: mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso (RER), aparato de Golgi, gránulos densos, vesículas claras y vesículas nucleodensas, pudiéndose apreciar en ellas una idea gráfica de los datos medidos: Densidad Numérica (DN, $N/\mu\text{m}^3$), Densidad de volumen (DV, $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$), Densidad de Superficie (DS, $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$) y Coeficiente de Forma (CF) de los diferentes orgánulos, ya sean comunes o específicos de cada tipo celular.

En el **apartado de 9.2.- Tablas y Gráficos**, en la parte correspondiente a las **Tablas** se referencian los datos numéricos con el error estándar de la media así como los análisis comparativos entre los diferentes parámetros de célula, núcleo y los diferentes orgánulos, estableciéndose como diferencia estadísticamente significativa aquella superior al 95%, es decir, con un número inferior a 0,05 en las tablas de comparación.

En la parte correspondiente a los **Gráficos**, incluidos de forma correspondiente con cada tabla, se aportan todas las gráficas Boxplot para los diferentes parámetros analizados tanto del nivel 1 correspondiente a la célula y núcleo de cada tipo celular de cada papila, como del nivel 2, correspondiente a los parámetros antedichos. En dichas gráficas los puntos extremos se corresponden con el valor máximo y mínimo, la caja representa el rango intercuartílico, la media se representa como una cruz y la mediana como una línea horizontal que divide la caja; además, más allá de los límites superior e inferior, aparecen reflejados los datos "outliers" (fuera de rango).

4.1.- Nivel 1 (Tablas y Gráficos 1 a 4).

4.1.1.- Papilas foliadas

Son formaciones de la mucosa lingual situadas lateralmente y caudales al arco palatogloso, constituidas por varias hojas papilares (8-15) separadas por surcos

oblicuos poco profundos recubiertos por un epitelio queratinizado en cuyo interior se hayan las yemas gustativas.

Las yemas gustativas se encuentran en un número abundante en este tipo papilar, tienen forma de pera u ovoide, se extienden desde la membrana basal hasta la superficie epitelial en la que se abren comunicándose con la cavidad oral a través del poro gustativo. Están formadas por un número variable de células cuyos núcleos se ubican, en su mayoría, en la mitad basal de la yema y cuyos citoplasmas se extienden apicalmente hasta alcanzar el poro por el que llegan a hacer profusión para contactar con los constituyentes del ambiente oral del surco papilar correspondiente. En las cercanías del poro los citoplasmas se apiñan y diferencian en terminales especializados, microvillis, entre los cuales se acumula un material fuertemente electrodenso que es la sustancia densa del poro (Fig. 13 y 14).

Al microscopio electrónico de transmisión es posible diferenciar tres tipos celulares: células tipo I, células tipo II y células tipo III.

4.1.1.1.- Células tipo I.

En las yemas de las papilas foliadas control se han localizado células tipo I, tanto en localización periférica como central (Fig. 11). Son oscuras, electrodensas, pequeñas, de forma estrecha y alargadas. Estas células se extienden desde la base de la yema hasta el poro por el que hacen protrusión sus especializaciones citoplasmáticas terminales (microvellosidades) embebidas en una matriz electrodensa. Su silueta es irregular con numerosas invaginaciones y evaginaciones. Estas apreciaciones subjetivas se objetivan por los valores de los parámetros: densidad de volumen ($DV=0,084 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$) y su bajo coeficiente de forma ($CF=0,251$), que describe un elemento estrecho y alargado.

El núcleo se encuentra en el tercio inferior del citoplasma celular y comparte con él las características descritas anteriormente: electrodensidad marcada, $DV= 0,268$ y una densidad de superficie también pequeña ($DS= 0,249 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$).

Las células tipo I de las papilas foliadas tratadas con **sacarina** (Fig. 17) presentan una localización y electrodensidad igual a la descrita en este tipo celular en las papilas foliadas control pero su tamaño relativo es ligeramente inferior y de forma menos alargada, como se puede constatar por los valores de $DV=0,078$ y un $CF=0,308$. El núcleo es de características similares a las descritas anteriormente, con una $DV=0,289$ y una $DS=0,251$.

4.1.1.2.- Células tipo II.

Distribuidas irregularmente por la yema, tanto en zonas centrales como periféricas, se extienden a todo lo largo de ésta rematando en unas escasas y cortas microvellosidades. Son células de contornos lisos y regulares y de forma más redondeada que los otros dos tipos celulares, como describe su mayor coeficiente de forma ($CF=0,581$).

Los núcleos tienen valores más elevados que los de las células tipo I ($DV=0,351$; $DS=0,276$). En su interior se distinguen uno o dos nucléolos y condensaciones de material cromatínico. Tanto los núcleos como las células en conjunto presentan una apariencia general muy electrolúcida que destaca entre el resto de los elementos de la yema.

En las células tipo II de las papilas foliadas **sacarina** se observa igual distribución que la descrita anteriormente (Fig. 12), más electrolúcidas que los otros tipos celulares, de contornos lisos y regulares, pero de menor volumen relativo y más redondeadas que las tipo II de las papilas foliadas control, con una $DV=0,056$ y un $CF=0,627$. Los núcleos presentan mayores valores que los descritos en las células control con $DV=0,438$ y una $DS=0,360$, es decir, representan un mayor volumen y con más densidad de superficie (Fig. 39).

4.1.1.3.- Células tipo III.

Son las células menos numerosas, se extienden a lo largo de la yema, pero concluyen antes de adentrarse en el poro gustativo, careciendo de las prolongaciones citoplasmáticas descritas en las células tipo I y tipo II (Fig. 38). Los valores de la densidad de volumen ($DV=0,045$) y coeficiente de forma ($CF=0,476$) se corresponden con células pequeñas en tamaño e intermedias en cuanto a forma, entre los otros dos tipos celulares. Destaca la presencia de fibras nerviosas terminales en áreas próximas. El núcleo presenta datos que manifiestan un mayor tamaño y superficie que en los otros dos tipos celulares, $DV=0,435$ y una $DS=0,418$.

Las células tipo III **sacarina** presentan características similares a las descritas anteriormente. Se objetiva lo mismo que en los otros dos tipos celulares de las papilas foliadas tratadas con sacarina, una densidad de volumen menor que las control y un coeficiente de forma mayor, $DV=0,035$ y $CF=0,566$, lo cual nos informa que estas son ligeramente más pequeñas en tamaño y más redondeadas. El núcleo muestra mayor tamaño que los otros dos tipos celulares y muy similar al de las células tipo III control, $DV=0,493$ y $DS=0,544$.

4.1.2.- Papilas fungiformes

Aparecen irregularmente repartidas por los dos tercios anteriores de la lengua en número de 150 a 200. Estas formaciones redondeadas están delimitadas por un surco de muy poca profundidad y presentan una única yema gustativa. La forma de esta yema es piriforme. En el interior de esta existen tres tipos celulares cuyos núcleos se asientan principalmente en los dos tercios basales y con un citoplasma alargándose apicalmente hasta alcanzar el poro gustativo. Los microvillis apicales en este caso no van más allá de la estrecha entrada del canal del poro, al contrario que en los otros dos tipos papilares, rodeados por un material amorfo, electrodenso, vesiculado, distinto de la sustancia densa del poro descrita anteriormente.

Otros aspectos a destacar en comparación con las yemas gustativas de los otros dos tipos papilares son la presencia de amplios espacios intercelulares en la mitad basal de la yema, la escasez de gránulos densos en la zona apical y la existencia de una gruesa capa de queratina en el epitelio lingual circundante a las yemas. Toda la estructura gemal se asienta sobre una especie de colchón o plexo vásculo-nervioso del que parten o al que llegan las formaciones vasculares y nerviosas necesarias para el mantenimiento y la función de las células de la yema.

4.1.2.1.- Células tipo I.

A este tipo celular corresponden la mayor parte de las células de la yema (Fig. 1). Sus características generales más destacables son su elevada electrodensidad, son células muy oscuras, la forma estrecha y alargada y la irregularidad de los contornos. La $DV=0,062$ es moderada y su $CF=0,252$ es bajo, lo que coincide con el aspecto generalmente observado. El núcleo tiene una $DV=0,339$ y una $DS=0,352$. Los nucléolos son difícilmente identificables debido a la alta electrodensidad de todo el contenido nuclear, especialmente en los alrededores de la membrana nuclear interna.

Este tipo celular en las papilas fungiformes **sacarina** presenta características similares a las descritas anteriormente, pero las células son ligeramente más pequeñas y menos estrechas y alargadas, como se puede corroborar en los valores de su $DV=0,049$ y $CF=0,430$. Los valores de la densidad de volumen ($DV=0,429$) y densidad de superficie ($DS=0,428$) del núcleo son ligeramente superiores al de las papilas fungiformes control y mayores que las que encontramos en los otros dos tipos papilares, foliadas y valladas.

4.1.2.2.- Células tipo II.

En este tipo celular se encuadran las células más voluminosas de la yema ($DV=0,064$) y de forma ovalada ($CF=0,559$) (Fig. 25 y 26). Por otra parte, son células que ofrecen poca resistencia al paso de electrones, lo que les da una apariencia clara que contrasta con la oscuridad de las células tipo I. El núcleo, en analogía con la célula en que se incluye, es también grande ($DV=0,384$), de contorno liso ($DS=0,317$), redondeado y claro y en él se aprecian con nitidez al menos un nucléolo y condensaciones de material nuclear.

Las células tipo II de las papilas fungiformes tratadas con **sacarina** (Fig. 41) son también las más voluminosas y redondeadas de la yema con una $DV=0,050$ y un $CF=0,667$, pero con una densidad de volumen menor que en las células control tipo II y un coeficiente de forma mayor. La densidad de volumen ($DV=0,346$) y la densidad de superficie ($DS=368$) del núcleo en este tipo celular es muy similar entre las control y las tratadas con sacarina.

4.1.2.3.- Células tipo III.

Son las células más escasas de la yema y están habitualmente rodeadas por las células tipo I de tal forma que estas les impiden el acceso al poro gustativo, terminando de forma truncada sin prolongaciones citoplásmicas en la zona basal del poro (Fig. 29). Son células de pequeño volumen relativo con una $DV=0,058$ y un $CF=0,393$ intermedio entre las células tipo I y II, como también su electrodensidad. El núcleo ($DV=0,347$ y $DS=0,367$) presenta condensaciones de cromatina adheridas a la membrana interna y nucléolos más o menos visibles entre el material nuclear.

Las células tipo III en las papilas fungiformes tratadas con **sacarina** (Fig. 31), son también muy escasas y las células de menor volumen relativo de la yema ($DV=0,036$) y con un $CF=0,590$, intermedio (Fig. 19). Al comparar este mismo tipo celular entre las papilas fungiformes tratadas y las control, se observa que las células de las papilas sacarina son más pequeñas y su forma se aproxima más a la esfericidad que la presentada por las control. El núcleo con una $DV=0,467$ y una $DS=0,525$ nos muestra el mayor tamaño de este respecto al control, pero de medidas y formas similares de las células tipo III en todos los tipos papilares tratados con sacarina.

4.1.3.-Papilas valladas

En la parte posterior y media de la lengua, aparece en la rata una formación única con forma de champiñón, rodeada por un surco o valle, es la papila vallada. Las yemas

gustativas se encuentran incluidas en el epitelio estratificado queratinizado que la tapiza.

Estas yemas tienen forma ovoide y de tamaño variable (Fig. 22). Están formadas por varias células claramente diferenciadas del epitelio lingual circundante, cuyos núcleos se asientan mayoritariamente en la mitad basal de la yema (Fig. 36), sus citoplasmas se extienden apicalmente hasta alcanzar el poro gustativo por el cual las especializaciones citoplásmicas apicales terminales se proyectan contactando con el ambiente oral, en este caso del valle papilar.

El poro gustativo tiene un canal que atraviesa el epitelio. A medida que nos acercamos más al poro los citoplasmas celulares se apiñan de forma que apenas quedan espacios intersticiales, las membranas celulares se relacionan entre sí muy estrechamente formando en algunas zonas complejos de unión del tipo desmosoma. Resalta, en las inmediaciones del poro, la presencia de gran número de gránulos densos en algunas células y el acúmulo de una gran masa oscura constituida por la sustancia densa del poro colocada a modo de tapón justo a la entrada del poro.

4.1.3.1.- Células tipo I.

Son las células más numerosas de las yemas valladas y se extienden desde la base hasta el poro. Su forma es estrecha y alargada de apariencia electrodensa y de contornos irregulares, al igual que el núcleo. Así lo demuestran los resultados, una densidad de volumen grande y un coeficiente de forma bajo, inferior al de las células tipo II y III de este mismo tipo papilar, que denota una forma que se aleja mucho de la esfericidad ($DV=0,077$; $CF=0,374$). Los datos que aparecen para el núcleo describen unas características morfométricas y estereológicas similares a las descritas para la célula en su conjunto ($DV=0,285$; $DS=0,246$). En el núcleo se pueden apreciar uno o varios nucléolos y en las inmediaciones de la membrana interna nuclear se aglutina gran cantidad de cromatina que unido al acúmulo de material filamentoso entorno a la membrana externa ofrece un aspecto de la silueta nuclear muy denso y grueso.

En este tipo celular de las papilas valladas tratadas con **sacarina** el aspecto observado al microscopio electrónico es muy similar al descrito anteriormente, excepto que estas presentan una densidad de volumen ligeramente inferior ($DV=0,071$) a las células tipo I control, igual que ocurre con el resto de tipo papilares, y un coeficiente de forma ($CF=0,283$) ligeramente inferior que en este tipo celular de las valladas control (única excepción respecto al resto de tipos celulares y diferentes papilas). En las células tipo I de las papilas foliadas y fungiformes tratadas con sacarina

el coeficiente de forma es mayor que en estos tipos papilares control. En el núcleo no hay variaciones respecto a lo descrito, con una $DV=0,274$ y una $DS=0,269$.

4.1.3.2.- Células tipo II.

Su localización dentro de la yema es variable y dependiendo de ésta se encuentran algunas diferencias evidentes. Así, las de localización más periférica son más electrolúcidas. Se extienden desde la base de la yema hasta el poro donde, como las tipo I, terminan formando microvellosidades, aunque en menor número y más cortas.

Son células que ocupan un importante volumen, con una $DV=0,072$, y el coeficiente de forma mayor de los tres tipos celulares ($CF=0,542$) lo que indica una mayor esfericidad. El núcleo suele estar situado en la zona basal de la célula y en él se distinguen con claridad uno o dos nucléolos y acúmulos de material nuclear adheridos a la parte interna de la membrana. Presenta una $DV=0,354$, mayor que las células tipo I, y una $DS=0,283$.

En las células tipo II de las papilas valladas tratadas con **sacarina** se observa tanto el núcleo como la célula en su conjunto una considerable electrolucidez con respecto a los otros tipos celulares (Fig. 23 y 28), igual que ocurre con este tipo celular en las papilas valladas control. Se obtiene una $DV=0,061$ y un $CF=0,611$, son células grandes y redondeadas, pero su densidad de volumen es menor a las tipo II control y el coeficiente de forma es mayor, por lo tanto estas células son ligeramente más pequeñas y de contorno más esférico que las tipo II control en las papilas valladas. El núcleo mantiene unas características similares a lo descrito anteriormente, con una $DV=0,446$ y una $DS=0,339$.

4.1.3.3.- Células tipo III.

Son el tipo celular menos frecuente, representan menos del 15% del total de las células de la yema. Su apariencia general comparte características tanto de las células tipo I como de las células tipo II, es decir presentan una apariencia intermedia en cuanto a electrodensidad y en cuanto a forma ($CF=0,429$). No obstante, son las células más pequeñas de la yema y que ocupan un menor volumen, con una densidad de volumen de $0,053$. Se extienden a lo largo de la yema aunque difícilmente se las observa llegar al poro gustativo y a diferencia de los otros tipos celulares no poseen microvellosidades en la región más apical.

En el núcleo se observan nucléolos y condensaciones de material cromatínico junto a la membrana nuclear interna. Se constata una $DV=0,406$, ligeramente mayor que los otros dos tipos celulares y una $DS=0,399$, también ligeramente superior

Las células tipo III de las valladas tratadas con el edulcorante artificial objeto del estudio (**sacarina**) presentan características similares a las descritas (Fig. 35), están en menor número en la yema, son intermedias a los otros tipos celulares y la disposición es similar, pero se diferencian de las control por presentar una densidad de volumen ($DV=0,042$) inferior y un coeficiente forma ($CF=0,484$) superior, es decir estas células con ligeramente más pequeñas y más redondeadas que las células tipo III control. El núcleo aparece con características similares a las descritas anteriormente ($DV=0,463$; $DS=464$).

4.2.- NIVEL 2.

4.2.1.- Gránulos densos (Tablas y Gráficos 5, 6 y 17).

- Papilas foliadas

Los gránulos densos son los orgánulos que representan el rasgo más característico de las células tipo I de todos los tipos papilares (Fig. 5). Son formaciones, como su propio nombre indica, electrodensas, especialmente en su núcleo. A grandes aumentos, periféricamente, se observa nítidamente un halo electroclaro rodeando al núcleo electrodenso. Son de poca densidad de volumen ($DV=0,004$), abundantes (densidad numérica= $0,050$) y su situación en la célula es, en su gran mayoría supranuclear o, más aun, apical (Tabla y Gráfico 17).

En las células tipo I de las papilas foliadas tratadas con **sacarina** (Fig. 6) se observan características similares a las descritas ($DV=0,006$ y $DN= 0,059$). Su distribución, en su mayoría supra o perinuclear, difiere de las control en el hallazgo de una mínima cantidad en posición infranuclear. (Fig. 16)

- Papilas fungiformes

Los gránulos densos son también en este caso los orgánulos más característicos del tipo I celular de estas papilas. No obstante, se pueden señalar algunas diferencias como su volumen relativo, ligeramente inferior al encontrado en los gránulos de las papilas foliadas ($DV=0,003$). Coincide, sin embargo, el aspecto de su núcleo electrodenso, su situación apical en la célula y su densidad numérica ($DN=0,053$). Las

imágenes de gránulos densos fusionados con la membrana celular vertiendo su contenido en los espacios intercelulares son escasas (Fig. 20).

Los gránulos densos en este tipo celular de las papilas fungiformes tratadas con **sacarina**, presentan una densidad de volumen similar al de las células control (DV=0,003), son más escasos en número (DN=0,039) y su localización, aunque mayoritariamente apical, se objetivan en mayor número en disposición perinuclear que las control e incluso se presentan algunos gránulos en la zona infranuclear.

- Papilas valladas.

Pueden observarse por todo el citoplasma, su densidad de volumen y número es ligeramente inferior al observado en los otros tipos papilares (DV=0,002; DN=0,030). A veces, las membranas de los gránulos densos se encuentran fusionadas con la membrana citoplasmática, vertiendo su núcleo electrodensos a los espacios intercelulares (Fig. 7 y 15).

En las papilas valladas tratadas con **sacarina** (Fig. 8, 9, 40), el edulcorante objeto del estudio, se observa que estos gránulos son de mayor densidad de volumen (DV=0,005) y aparecen en mayor cantidad (DN=0,062) que en células control. No se aprecian en la zona infranuclear de la célula.

4.2.2.- Aparato de Golgi (Tablas y Gráficos 7 y 8).

- Papilas foliadas

El aparato de Golgi en las células tipo I se presenta en posición supranuclear y está muy desarrollado (DV=0,038; DS=0,059), más que en otros tipos celulares de las papilas foliadas, pero también de mayor volumen relativo que en otros tipos papilares. Comparado con el aparato de Golgi de las células tipo I tratadas con **sacarina**, podemos decir que en estas no está tan desarrollado (DV=0,023; DS=0,030).

En las células tipo II aparece en posición perinuclear y es relativamente frecuente observar formaciones de sáculos apilados de los que se desprenden pequeñas vesículas (DV=0,019; DS=0,024). El aparato de Golgi en las células tipo II tratadas con el **edulcorante** artificial que estudiamos es de mayor densidad de volumen que el observado en las control como demuestra una DV=0,028 y una DS=0,031. (Fig. 2)

En las células tipo III (Fig. 3) aparece normalmente en posición supranuclear y tiene un tamaño muy similar al observado en las células tipo II (DV=0,018; DS=0,025). El

aparato de Golgi de las células tipo III tratadas con **sacarina** tiene características semejantes y un volumen total ligeramente superior (DV=0,024; DS=0,029).

- Papilas fungiformes

En las inmediaciones del núcleo de las células tipo I aparece el aparato de Golgi, que se caracteriza por presentar la menor densidad de volumen de todos los tipos celulares analizados (DV=0,014; DS=0,027). El aparato de Gogi de las células tipo I tratadas con **sacarina** ofrece iguales características que en las control y también es más pequeño que el resto de tipos celulares (DV=0,016; DS=0,023).

En las células tipo II el aparato de Golgi aparece siempre en posición perinuclear y ocupa un volumen celular considerable (DV=0,024; DS=0,030). En las células tipo II tratadas con **sacarina** las características son similares a las células tipo II control (DV=0,021; DS=0,026).

Elaparato de Golgi que encontramos en las células tipo III tiene un desarrollo similar al de las células tipo II, con una DV=0,026 y una DS=0,035. El aparato de Golgi que encontramos en este tipo celular en las papilas fungiformes tratadas con el **edulcorante** estudiado tiene un tamaño similar o ligeramente inferior a las control (DV=0,022; DS=0,028).

- Papilas valladas

El aparato de Golgi en las células tipo I aparece en la región peri o supranuclear y está bien conformado, al igual que en todas las células de las papilas valladas (DV=0,020; DS=0,025). Así mismo, es habitual observar la existencia de gránulos densos estrechamente relacionados con las cisternas del aparato de Golgi. Este aparato en las células tipo I de las papilas tratadas con sacarina presenta características muy similares (DV=0,024; DS=0,035), ligeramente mayor.

En las células tipo II se encuentra en la región perinuclear (Fig. 10), algo menos desarrollado (DV=0,017; DS=0,019) que los otros dos tipos celulares. En las papilas tratadas con sacarina el aparato de Golgi, en este tipo celular esa también algo menos desarrollado, pero comparado con las células control es ligeramente mayor (DV=0,023; DS=0,022).

En las células tipo III está más desarrollado que en los otros dos tipos celulares (DV=0,029; DS=0,038), aparece normalmente en posición supranuclear. En este tipo celular de las papilas valladas tratadas con el edulcorante artificial objeto de este estudio, el aparato de Golgi presenta características similares a las descritas en las

células control, y también presenta la mayor densidad de volumen respecto a los otros tipos celulares (DV=0,026; DS=0,033).

4.2.3.- Mitocondrias (Tablas y Gráficos 9, 10 y 18).

- Papilas foliadas

Las mitocondrias de las células tipo I aparecen en cantidad intermedia comparando los otros dos tipos celulares de esta papila y con una densidad de volumen alto (DV=0,054; DN=0,097). Las mitocondrias encontradas en este mismo tipo celular de las papilas foliadas tratadas con **sacarina** presentan un volumen similar a las control pero, se encuentran en mayor número (DV=0,062; DN=0,126).

Las mitocondrias en el tipo celular II son bastante redondeadas, su volumen celular relativo y cantidad es muy semejante a las tipo I (DV=0,051; DN=0,100). Estas células tipo II de las papilas foliadas tratadas con el **edulcorante** objeto de nuestro estudio presentan una DV=0,066 y DN=0,128 de mitocondrias muy similar a las control (Fig. 24).

En las células tipo III las mitocondrias, aunque grandes, son menos numerosas que en otros tipos celulares y ocupan un volumen celular menor (DV=0,031; DN=0,075). En este tipo celular tratado con sacarina presentan una DV=0,066 y una DN=0,151, son más numerosas y ocupan mayor volumen dentro de la célula, comparadas con las control.

- Papilas fungiformes

En las células tipo I de este tipo papilar, las mitocondrias se distribuyen irregularmente entre el abundante contenido citoplásmico. Son relativamente numerosas y el tamaño total relativo es más bien pequeño (DV=0,047; DN=0,107). En las papilas fungiformes tratadas con **sacarina** este tipo celular presenta características similares a las control, con una DV=0,051 y una DN=0,093.

Las mitocondrias en las células tipo II (Fig. 4) son numerosas, relativamente alargadas y ocupando un volumen elevado como lo demuestra una DV=0,095 y una DN=0,161; ocupan una gran parte del volumen citoplásmico que supone el porcentaje más elevado de todos los tipos celulares en estas papilas. En este tipo papilar tratado con **sacarina**, las células tipo II presentan una DV mitocondrial de 0,0646 y una DN=0,108. No son tan numerosas ni ocupan tanto volumen en la célula como en las control.

En las células tipo III las mitocondrias son de tamaño medio y ocupan también un volumen celular medio ($DV=0,065$), su forma es elipsoide y aparecen en número moderado ($DN=0,131$). En las células tipo III tratadas con **sacarina**, su número es menor y también el volumen que ocupan en la célula ($DV=0,035$; $DN=0,077$).

- Papilas valladas

En las células tipo I de este tipo papilar las mitocondrias aparecen dispersas por todo el citoplasma, aparecen en número y con una densidad de volumen moderadamente altos ($DV=0,073$; $DN=0,125$). En las células tratadas con sacarina presentan características semejantes ($DV=0,063$; $DN=0,126$).

A pesar de la marcada apariencia electrolúcida del tipo celular II, que pudiera hacer pensar en una relativa vacuidad del citoplasma, existe una gran variedad de orgánulos (Fig. 42). Aleatoriamente distribuidas por todo el citoplasma se observa un gran número de mitocondrias ($DN=0,144$) que ocupan un volumen citoplasmático considerable ($DV=0,079$). Su forma es ovalada y su tamaño moderado. En este tipo celular de las papilas valladas sometidas a sacarina, se observa una $DV=0,055$ y una $DN=0,113$, discretamente inferior a las control.

Las mitocondrias en el tipo celular III ocupan un volumen celular menor que los otros dos tipos celulares analizados ($DV=0,053$), su frecuencia también es menor ($DN=0,109$), siendo su distribución por el citoplasma aleatoria. Las características de este orgánulo en cuanto a densidad de volumen y numérica, en este tipo celular tratado con el edulcorante objeto del estudio, es muy similar a las descritas en las control ($DV=0,057$; $DN=0,112$).

4.2.4.- Retículo endoplásmico rugoso (Tablas y Gráficos 11, 12 y 19).

- Papilas foliadas

En las células tipo I el retículo endoplásmico rugoso extiende su red de túbulos por todo el citoplasma. Se objetivó una $DS=0,128$ y una $DN=0,131$. En este tipo celular de las papilas foliadas tratadas con **sacarina** el aspecto es similar con cifras de densidad de superficie y densidad numérica semejantes a las control ($DS=0,152$; $DN=0,156$).

En las células tipo II se puede observar por todo el citoplasma el retículo endoplásmico rugoso. Se obtienen valores de $DS=0,050$ y una $DN=0,049$, es decir en menor cantidad que los otros dos tipos celulares de este tipo papilar. En estas células tratadas con el **edulcorante** artificial que nos ocupa la $DS=0,217$ es mayor que en las

tipo I y II, con una $DN=0,164$, similar a los otros dos tipos celulares. Comparado con las células control podemos decir que en estas es bastante más abundante.

Los túbulos correspondientes al retículo endoplásmico rugoso aparecen dispersos por todo el citoplasma en las células tipo III, con una $DS=0,105$ y una $DN=0,086$. En cuanto a las células tratadas con **sacarina** su densidad de superficie y su densidad numérica son mayores ($DS=0,153$; $DN=0,142$).

- Papilas fungiformes

En las células tipo I los túbulos y sáculos del retículo endoplásmico rugoso más o menos dilatado aparecen por todo el citoplasma ocupando una superficie moderadamente elevada ($DS=0,156$; $DN=0,135$). En este tipo celular tratado con **sacarina**, este orgánulo presenta una $DS=0,117$ y una $DN=0,108$, encontrándose en menor cantidad que en estas células control.

En las células tipo II el retículo endoplásmico rugoso está bien desarrollado, pero podemos decir en general que en este tipo celular es menor en todos los tipos papilares ($DS=0,130$; $DN=0,099$). En cuanto a estas células tratadas con **sacarina** la DS es de $0,094$ y la DN de $0,075$, estando presente en menor cantidad que en las células control.

El retículo endoplásmico rugoso en las células tipo III es semejante al observado en las células tipo II con una $DS=0,115$ y $DN=0,098$. En este tipo celular de las papilas con el edulcorante artificial la $DS=0,140$ y $DN=0,118$, son ligeramente superiores a las cifras observadas en este tipo celular control.

- Papilas valladas

En las células tipo I se aprecia claramente el retículo endoplásmico rugoso, apareciendo estructuras tubulares por todo el citoplasma. Su DS es de $0,116$ y la DN de $0,107$. En las células tipo I de las papilas valladas tratadas con **sacarina** la $DS=0,116$ $DN=0,107$ son muy similares a las control.

En las células tipo II la $DS=0,101$ y $DN=0,732$ confirman lo descrito anteriormente, es decir, que este orgánulo es más escaso en este tipo celular en todos los tipos papilares. En las células tipo II tratadas con **sacarina** la $DS=0,197$ y $DN=0,148$, significando más abundante y con mucha más superficie que en las control (Fig. 43).

En las células tipo III las formaciones correspondientes al retículo endoplásmico rugoso aparecen diseminadas por todo el citoplasma ocupando un volumen medio

DS=0,156 y una DN=0,144. En las células tratadas con **sacarina** (DS=0,183 DN=0,156) no se aprecian diferencias estadísticamente significativas.

4.2.5.- Vesículas claras (Tablas y Gráficos 13, 14 y 20).

- Papilas foliadas

Las vesículas claras se encuentran exclusivamente en las células tipo III. Son, en general y teniendo en cuenta todos los tipos papilares, de menor tamaño que las nucleodensas (las vesículas claras de las papilas foliadas control tienen una DV mayor que vesículas nucleodensas control, en el resto de papilas más pequeñas), y aparecen todavía más estrechamente ligadas con los terminales nerviosos. Se les considera como vesículas sinápticas. La DV, en este tipo papilar es de 0,003 y la DN de 0,049. Las vesículas claras observadas en las papilas foliadas tratadas con **sacarina** presentan una DV=0,003 y una DN=0,064, ligeramente menos volumen relativo y más numerosas que las objetivadas en las foliadas control.

La presencia de vesículas nucleodensas y claras en torno a las áreas de contacto célula-fibra nerviosa unido a la presencia de engrosamientos muy característicos de la membrana citoplásmica ofrece una imagen muy distinta a la observada para las relaciones entre fibras nerviosas y células tipo I y tipo II; en este caso se corresponde con la imagen típica de unión sináptica. En cuanto a las relaciones con células vecinas, mayoritariamente células tipo I, son como las descritas en otros casos, con la presencia de complejos de unión del tipo desmosoma.

- Papilas fungiformes

Las vesículas claras muestran unas características muy similares a las descritas en otros tipos papilares. Se les puede considerar casi idénticas en cuanto a forma, densidad de volumen y localización. Su DV=0,002 indica que representan ligeramente un menor volumen que el observado en las papilas foliadas y muy parecido a las valladas. La DN=0,057 nos confirma que se encuentran en mayor número en esta papila respecto a los otros dos tipos papilares. En las células tipo III tratadas con **sacarina**, las vesículas claras tienen una DV=0,003, similar a las control y una DN=0,069, ligeramente mayor que lo contabilizado en las control.

Las vesículas claras y las nucleodensas forman parte del complejo de unión sináptica entre las células tipo III y terminales nerviosos. La imagen de este complejo de unión se completa con la existencia de un engrosamiento electrodenso de la

membrana citoplásmica en el punto de contacto con el terminal nervioso y la presencia de mitocondrias particularmente alargadas en los alrededores.

- Papilas valladas

Las vesículas claras se localizan exclusivamente en las proximidades de las zonas de contacto célula-terminal nervioso y tiene las características descritas en los otros tipos papilares. Se objetiva una $DV=0,002$, pequeña, y una $DN=0,048$. Las vesículas claras de las células tipo III de estas papilas tratadas con **sacarina** ofrecen características similares a las descritas en las control, $DV=0,002$ y $DN=0,050$.

4.2.6.- Vesículas nucleodensas (Tablas y Gráficos 15, 16 y 21).

- Papilas foliadas

Las vesículas nucleodensas y las vesículas claras son los orgánulos diferenciadores de las células tipo III, esto es así en todos los tipos papilares. Ambas aparecen en zonas próximas a las áreas de contacto célula-fibra nerviosa, más numerosamente en la región infranuclear (Fig. 30).

Las vesículas nucleodensas tienen una apariencia general similar a la de los gránulos densos de las células tipo I, pero se diferencian porque su localización no es casi nunca apical y su menor densidad de volumen ($DV=0,002$); además, carecen del halo electroclaro periférico propio de los gránulos densos y su contenido no es homogéneamente electrodenso. Su número también es menor ($DN=0,028$). En las células tipo III de las papilas foliadas tratadas con **sacarina** se observan unas vesículas nucleodensas con un volumen relativo a la célula ligeramente mayor y una densidad numérica más elevada que en las papilas foliadas control ($DV=0,004$; $DN=0,046$)(Fig.34).

- Papilas fungiformes

Las características generales que las definen son muy similares a las presentadas en las papilas foliadas y valladas, en cuanto a apariencia externa, forma y cantidad. Algunas diferencias a reseñar: son ligeramente de mayor densidad de volumen que las encontradas en las papilas foliadas ($DV=0,004$) y se presentan en mayor número que en los otros dos tipos papilares ($DN=0,080$) (Fig.32). Respecto a las vesículas nucleodensas de las papilas fungiformes tratadas con **sacarina**, se puede observar que representan un volumen mucho mayor, al compararlas con las control ($DV=0,023$), y mucho más numerosas ($DN=0,165$). Igualmente, este tipo papilar tratado con el

edulcorante objeto de nuestro estudio presenta las vesículas nucleodensas de mayor tamaño y en mayor cantidad que en el resto de tipos papilares tratados con sacarina.

- Papilas valladas

Aparecen preferentemente en la región infranuclear y especialmente en áreas próximas a las zonas de contacto con terminales nerviosos. Son de densidad de volumen similar a las encontradas en las papilas fungiformes ($DV=0,003$) y en número mayor que lo observado en las papilas foliadas, pero en menor cantidad que en las papilas fungiformes ($DN=0,053$). En las papilas tratadas con **sacarina** (Fig. 37), las vesículas nucleodensas tienen una densidad de volumen mayor ($DV=0,007$) que la observada en las células tipo III control y en cantidad ligeramente superior, en esta comparación ($DN=0,069$) (Fig. 33, 44).

5.- DISCUSION

5.1.- Generalidades.

Desde que Leydig en 1851 describió por primera vez las yemas gustativas en los peces y poco después Schwalbe (1867) en los mamíferos, los diferentes estudios referentes a estas estructuras anatómicas han sido muy prolijos y con ellos se ha pretendido ahondar en el conocimiento de los órganos encargados de la percepción sávida, de cuyo funcionamiento depende en gran medida una función vital como es la alimentación. El gusto es un sentido primario en todos los vertebrados que transmite de forma fiable información química desde la boca hasta el cerebro regulando la ingesta, es un sentido fisiológico importante que puede ayudar a reconocer y distinguir específicamente diversas sustancias gustativas (Qiao *et al.*, 2015).

Los seres humanos también se basan en el sabor a fin de seleccionar comidas y bebidas (Kapsimalia y Barlow, 2013). Debido a que el gusto está involucrado en el comportamiento ingestivo, este sistema sensorial está intrínsecamente ligado en el ser humano con enfermedades, tales como obesidad, accidentes cerebrovasculares, enfermedades del corazón o diabetes. Por tanto, el sabor no es una simple sensación hedónica, es fundamental para el comportamiento en la ingesta de nutrientes y, así, para la salud y el mantenimiento de las funciones vitales. El mejor conocimiento de las estructuras y mecanismos fisiológicos complejos permitirá comprender mejor las alteraciones del "gusto" y su patología (Brondel *et al.*, 2013).

Los avances en el conocimiento de estos órganos fueron escasos en principio, limitándose a la descripción de su presencia en nuevas especies con toscos apuntes estructurales, hasta la llegada al mundo de la investigación del microscopio electrónico. En 1956, Engstron y Rytzner utilizan por primera vez este avance tecnológico para el estudio de las yemas gustativas en el conejo describiendo la presencia de varios tipos celulares diferenciables por sus características ultraestructurales. A partir de este momento se suceden de forma vertiginosa los trabajos publicados en este campo tocando los diversos aspectos de la ultraestructura, fisiología, desarrollo, etc. de estos órganos.

Ciñéndonos a la ultraestructura y clasificación de tipos celulares, Trujillo-Cenoz (1957) describe la presencia de dos tipos celulares: células claras y células oscuras. DeLorenzo (1958, 1963) confirma la existencia de esos dos tipos celulares, pero apuntando la posibilidad de la existencia de formas de transición entre uno y otro. Farbman (1965) en las papilas fungiformes de la rata distingue cuatro tipos celulares:

periféricas, basales, oscuras y claras. Scalzi (1967) coincide en la descripción de células claras y oscuras pero también hace referencia a otros subtipos celulares no descritos hasta entonces.

Con este modelo de clasificación celular, incluyendo pequeñas variantes en una u otra dirección, aparecen publicados algunos trabajos más hasta que Murray *et al.* (1969) definen un nuevo tipo celular en las papilas foliadas de conejo no descrito anteriormente por ningún otro autor y que ellos denominaron células tipo III. En un trabajo posterior, Murray (1971) sienta las bases de una nueva clasificación de los tipos celulares en las yemas gustativas del conejo que incluye tres grupos celulares diferentes: células tipo I, células tipo II y células tipo III. Confirmado en diversos estudios por otros autores en esta misma especie (Rueda, 1991).

Progresivamente en el tiempo aparecieron nuevas publicaciones en este campo adscritas a este tipo de clasificación celular en numerosas especies distintas al conejo, tales como el hombre (Paran *et al.* 1975), el ratón (Takeda, 1976, 1977; Akisaka y Oda, 1978; Takeda y Kitao, 1980; Takeda *et al.*, 1981; Seta y Toyoshima, 1995), el criceto (Miller y Chaudhry, 1976a, b; Yoshie *et al.*, 1990), el mono (Farbman *et al.*, 1985), el pollo (Ganchrow *et al.*, 1991, 1994), rana (Gioglio *et al.*, 1988; Graziadei, 1992), lemures (Hellekant *et al.*, 1993), murciélagos (Tuckerman, 1988; Pastor *et al.*, 1993), cordero (Sweazey *et al.*, 1994), peces teleosteos (Toyoshima *et al.*, 1984; Zuwala y Jahubowski, 1993), conejillo de indias (Yoshie *et al.*, 1990), gato (Tichy, 1994), cerdo (Tichy, 1992; Macket *et al.*, 1977) y, por supuesto, en la rata, que es la especie que nos ocupa (Fujimoto, 1973; Nada e Hirata, 1975; Takeda y Oshino, 1975; Akisaka y Oda, 1978; Farbman *et al.*, 1985; Bloom y Fawcett, 1983; Ganchrow y Ganchrow, 1989; Yoshie *et al.*, 1996; Pumplín *et al.*, 1997).

En efecto, no todos los autores están de acuerdo con la tipificación celular preconizada por Murray desde 1969 y asumida por nosotros, tal y como se refleja en los resultados. Así, por ejemplo, Ide y Munger (1980) y Zham y Munger (1983a, b) trabajando sobre yemas gustativas de mono describen únicamente dos tipos celulares denominados células de sostén y células quimiosensoriales, a tenor de su función. Arvidson *et al.* (1981) en yemas gustativas de papilas fungiformes del hombre consideran que, en consecuencia con las características ultraestructurales observadas, sólo puede definirse un único tipo celular. Cottler-Fox (1980) apunta que las características estructurales de las células de las yemas gustativas están en función de los métodos de procesamiento de muestras utilizados en cada trabajo, lo cual impide una clasificación fiable de las células. Kinnamon y su grupo de investigación (Kinnamon

et al., 1985; Delay *et al.*, 1986; Royer y Kinnamon, 1988; Kinnamon *et al.*, 1993) en trabajos sobre yemas gustativas de ratón sólo consideran la existencia de células claras y células oscuras con fases intermedias, pero no consideran las células tipo III.

La misma disparidad de criterios se producía a la hora de establecer en qué tipo celular reside la capacidad de transmitir los impulsos gustativos hacia elementos superiores del sistema nervioso. Así, Farbman (1965a) considera a las células oscuras (tipo I) como las células gustativas propiamente dichas y para Uga (1969) dicha especialización recae sobre las células claras (tipo II). Estudios más recientes sugieren una función glial para las células tipo I por ciertas características como, por ejemplo, un aclaramiento del transmisor y aislamiento funcional de otros tipos de células gustativas (Finger, 2005). Las células tipo II, a nivel molecular han sido identificadas como células que expresan los receptores acoplados a la proteína G (GPCRs) para compuestos de sabor dulce, amargo y umami (Roper, 2013). En consecuencia, estas células han sido red denominadas como células receptoras.

Tras la descripción de las células tipo III muchos autores han coincidido en asignar la funcionalidad gustativa a este tipo celular, por poseer sinapsis (Yee *et al.*, 2001). Las células tipo III no secretan ATP, liberan serotonina, norepinefrina y GABA (Huang *et al.*, 2008; Dvoryanchikov *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011). En consonancia con la identificación de las sinapsis, las células de tipo III expresan proteínas asociadas con la transmisión sináptica, incluyendo SNAP 25, canales dependientes de voltaje de Ca^{2+} , enzimas biosintéticas para la serotonina y GABA, y transportadores de captación para aminas biogénicas (Dvoryanchikov *et al.*, 2011). Por ello, las células tipo III han sido red denominadas como células presinápticas (DeFazio *et al.*, 2006).

Una situación similar se produce a la hora de considerar el origen de los distintos tipos celulares de las yemas gustativas. Para unos cada tipo celular tiene su origen celular diferenciado, mientras que para otros todas las células tienen un mismo origen considerando a cada tipo celular como una fase de desarrollo distinta de una misma célula origen. Sin embargo, los estudios más recientes de Finger (2005), demuestran que deben existir múltiples linajes dentro de una papila gustativa, es decir, que los tres tipos de células no son meramente diferentes etapas de desarrollo de un solo tipo de células gustativas. Datos de otros investigadores (Kusakabe *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 2003) sugieren que las células tipo II y tipo III pueden proceder de una célula común. Por tanto, la cuestión de si las células de tipo II y tipo III son distintos linajes o simplemente diferentes puntos finales de un tipo de célula intermedio común permanece abierto a posteriores investigaciones.

Más recientemente, Ohtubo (2007) indica que las células tipo IV son las células progenitoras que reabastecen la yema gustativa durante el curso normal de recambio celular.

Se ha pretendido, en este estudio, aportar nuevos conocimientos que permitan, en la medida de lo posible, tipificar las características ultraestructurales de cada tipo celular mediante análisis estereológico y morfométrico, con lo cual se podrían establecer posibles correlaciones entre cada tipo celular y sus funciones fisiológicas o su origen histológico. A continuación se discuten los resultados correspondientes de cada uno de los tipos celulares de cada papila desde la perspectiva global y general de cada tipo, analizando las conclusiones histofisiológicas correspondientes. Posteriormente, se discuten los datos más significativos de cada tipo celular correspondiente a los diferentes tipos papilares control comparando estos con las diferencias o semejanzas de estos mismos tipos celulares de las diferentes papilas tratadas con sacarina, un edulcorante de uso ampliamente extendido en la sociedad.

A partir del incremento del uso de sacarina, como consecuencia de la prohibición del ciclamato, se han llevado a cabo numerosos estudios con el objeto de establecer los posibles efectos tóxicos de esta sustancia. Entre estos efectos se encuentra el cáncer de vejiga estando perfectamente establecida la relación entre la sacarina y el desarrollo de este cáncer.

Al igual que el resto de edulcorantes artificiales la sacarina produce otro efecto indeseado, como es el efecto paradójico sobre la toma de alimentos y sobre el peso (Blundell y Hill, 1986). La sensación gustativa dulce produce modificaciones neurosensoriales y hormonales, entre ellas un aumento de la secreción de insulina por el páncreas. Estos fenómenos preabsortivos preparan al organismo frente a una carga calórica que en realidad no llega, dando una sensación de hambre por disminución de la glucosa en sangre.

El sabor dulce que se provoca por azúcares o edulcorantes artificiales como la sacarina, es muy atractivo para los seres humanos y algunos animales debido a que este sabor indica la existencia de fuentes de carbohidratos y calorías en los alimentos (Yoshida *et al.*, 2013). Estudios recientes han puesto de manifiesto los mecanismos moleculares para la recepción y transducción de sabor dulce: Receptores acoplados a la proteína G, receptor de sabor de tipo T1R2 y T1R3, heterodímeros que actúan como receptores del sabor dulce (Li *et al.*, 2002) y que parecen encontrarse presentes en las células tipo II. Por todo ello, se considera de gran interés el análisis de los posibles

cambios a nivel ultraestructural de los tipos celulares de las yemas gustativas en animales sometidos a una dieta con sacarina.

5.2.- Yemas gustativas de los diferentes tipos papilares.

5.2.1.- Papilas foliadas.

Se localizan en la mucosa de las caras dorsolaterales de la lengua, en la región más aboral del cuerpo de dicho órgano, un número variable de pliegues o surcos paralelos entre sí que constituyen las papilas foliadas. El número de pliegues u hojas papilares que conforman cada papila están definido por Chamorro *et al.* (1987) en 15-19 para el conejo. Nuestras observaciones en la rata denotan una menor cantidad de pliegues, lo que puede significar una importancia relativamente menor de este tipo papilar en esta especie, al igual que lo observado por Herrero (1998).

En el epitelio que tapiza las paredes de estos surcos se aloja un gran número de yemas gustativas, las cuales tienen forma de cebolla, como describen Rogers *et al.* (1988). La yema gustativa es una comunidad de células que interactúan y se comunican célula-célula durante la estimulación gustativa. Ahora se sabe que las yemas gustativas no son meras estructuras sensoriales pasivas (Roper, 2013).

Las yemas están formadas por un número variable de células. Al microscopio electrónico pueden distinguirse tres tipos celulares distintos que se designan como células tipo I, células tipo II y células tipo III de acuerdo con la nomenclatura propuesta por Murray (1973) y utilizada por numerosos autores, también por nosotros, para este tipo papilar y para los siguientes.

Sus núcleos se ubican, en su mayoría, en la mitad basal de la yema y los respectivos citoplasmas se extienden apicalmente hasta alcanzar el poro por el que llegan a hacer profusión para contactar con los constituyentes del ambiente oral del surco papilar correspondiente. En las cercanías del poro los citoplasmas se apiñan y diferencian en terminales especializados llamados microvillis, entre los cuales se acumula un material fuertemente electrodensito que es la sustancia densa del poro. El número de células en cada yema es muy variable, Kinnamon (1988) lo cifra en 60-100 células por yema y Murray *et al.* (1969) da una cifra de 30-80 células por yema.

Las dimensiones de las yemas son de 65 μm de alto por 45 μm de anchura y el poro gustativo tiene un diámetro medio de 4-5 μm , valores todos ellos concordantes

con los que aparecen en trabajos de otros autores como Fhis *et al.* (1994) o Scalzi (1967).

El mantenimiento vascular corre a cargo de ramificaciones de las arterias ranina y sublingual y la inervación gustativa de ramas del nervio glossofaríngeo. Según Hannamory y Smith (1989), en los pliegues papilares más anteriores podrían intervenir también algunas ramificaciones de la cuerda del tímpano. Todas las estructuras vasculares y nerviosas acceden agrupadas a la cavidad gemal por su zona basal a través de lo que Royer y Kinnamon (1991) denominan poro o hilio basal.

5.2.2.- Papilas fungiformes.

Tal y como describen Farbman (1965b) y Hellekant *et al.* (1987), por toda la mucosa de los dos tercios anteriores de la lengua de las ratas se distribuye un elevado número de formaciones anatómicas (150-200), según un patrón muy irregular y propio de cada individuo, que son las papilas fungiformes. Están formadas por un cuerpo papilar en forma de hongo con 0,4-0,5 mm de altura y 0,2-0,4 mm de diámetro y rodeado por un surco muy poco profundo en forma de herradura (Toyoshima y Tandler, 1987). El cuerpo papilar de tejido conjuntivo está recubierto por un epitelio estratificado queratinizado que aloja, en la rata, una única yema gustativa, a diferencia de lo que ocurre en otras especies animales como el conejo en el que existen siempre dos o más yemas por papila, o en el hombre y algunos primates en los que el número de papilas por yema varía entre 4 y 15 por cada papila fungiforme, o aún más en el cerdo y jabalí (Chamorro *et al.*, 1993) o en los bóvidos en los que se contabilizan hasta 56 yemas por papila, según Dasgupta *et al.* (1990). La presencia de una sola yema gustativa por papila complica el estudio y obliga a realizar todos los pasos de los procesamientos de muestras con una mayor precaución para poder llegar hasta la fase de observación al microscopio electrónico con muestras de calidad suficiente.

En cuanto a las dimensiones de la yema gustativa hay que señalar algunas diferencias con respecto a las ya comentadas en papilas foliadas. La magnitud del eje mayor no presenta variación pero la del eje menor de la yema es un poco más pequeña, lo que otorga a estas yemas un aspecto más alargado. Como expresan de forma muy gráfica Royer y Kinnamon (1988), la silueta de las yemas de las papilas fungiformes se asemeja a la de una pera a diferencia de la forma de cebolla que se ha descrito para los otros casos. También existe variación a la baja en la amplitud del canal del poro gustativo, siendo en estas yemas, según nuestras observaciones, de 3-4 μm de diámetro, valor muy alejado de las 5-12 μm que da Arvidson (1976) pero

concordante con los valores que aparecen en los trabajos de Farbman (1965a) de 2-4 μm .

En el interior de esta existen tres tipos celulares cuyos núcleos se asientan principalmente en los dos tercios basales y con un citoplasma alargándose apicalmente hasta alcanzar el poro gustativo. Los microvillis apicales en este caso no van más allá de la estrecha entrada del canal del poro, al contrario que en los otros dos tipos papilares, por un material amorfo, electrodense, vesiculado, distinto de la sustancia densa del poro descrita anteriormente.

Otros aspectos a destacar en comparación con las yemas gustativas de los otros dos tipos papilares son la presencia de amplios espacios intercelulares en la mitad basal de la yema, la escasez de gránulos densos en la zona apical y la existencia de una gruesa capa de queratina en el epitelio lingual circundante a las yemas. Toda la estructura gemal se asienta sobre una especie de colchón o plexo vásculo-nervioso del que parten o al que llegan las formaciones vasculares y nerviosas necesarias para el mantenimiento y la función de las células de la yema.

A diferencia de las papilas valladas y foliadas, en las papilas fungiformes la inervación de las yemas gustativas corre a cargo enteramente de fibras de la cuerda timpánica, rama del VII par craneal, según describen Hannamory y Smith (1989), Kinnamon *et al.* (1993) y Oakley (1993).

5.2.3.- Papilas valladas.

En la rata y especies afines como el ratón o el criceto existe una única papila vallada (Farbman, 1965; Takeda y Hoshino, 1975; Miller y Chaudhry, 1976a; Kinnamon *et al.*, 1985) a diferencia de lo que ocurre en otras especies como el conejo donde aparecen dos (Chamorro *et al.*, 1987) o en el hombre en el que el número varía entre nueve y once papilas (Testut y Latarjet, 1976). Esta papila se sitúa, en la rata, en el tercio posterior de la lengua, en su línea media, y está conformada por un cuerpo papilar rodeado por un surco o valle relativamente profundo. Las dimensiones de la yema y el poro son muy semejantes a las encontradas en papilas foliadas.

Es precisamente en el epitelio que reviste la parte más profunda de este valle donde se localizan las yemas gustativas (Uga, 1969; Takeda y Hoshino, 1975; Yoshie *et al.*, 1990) cuyas dimensiones medias observadas en nuestro estudio son de 65 μm para su eje mayor y 45 μm para el menor. Estas yemas tienen forma ovoide y de tamaño variable. Están formadas por varias células claramente diferenciadas del epitelio lingual circundante, cuyos núcleos se asientan mayoritariamente en la mitad basal de

la yema, sus citoplasmas se extienden apicalmente hasta alcanzar el poro gustativo por el cual las especializaciones citoplásmicas apicales terminales se proyectan contactando con el ambiente oral, en este caso del valle papilar.

El poro gustativo tiene un canal que atraviesa el epitelio. A medida que nos acercamos más al poro los citoplasmas celulares se apiñan de forma que apenas quedan espacios intersticiales, las membranas celulares se relacionan entre sí muy estrechamente formando en algunas zonas complejos de unión del tipo desmosoma. Resalta, en las inmediaciones del poro, la presencia de gran número de gránulos densos en algunas células y el acúmulo de una gran masa oscura constituida por la sustancia densa del poro colocada a modo de tapón justo a la entrada del poro.

El aporte de nutrientes para estas células alojadas en una estructura capsulada llega por la zona basal de la yema a través de finas ramificaciones de las arterias ranina y sublingual y la inervación corre a cargo de fibras nerviosas derivadas del nervio glossofaríngeo (Hannamory y Smith, 1989) que se distribuyen por entre las células, principalmente por las zonas más basales, aunque nosotros hemos encontrado cortes de fibras nerviosas también en situaciones bastante apicales.

5.3.- Tipos celulares.

5.3.1.- Células tipo I.

Su apariencia general es estrecha y alargada en relación a los otros tipos celulares y su silueta profundamente invaginada, apreciación puesta de manifiesto y cuantificada en el bajo valor del coeficiente de forma (Tabla y Gráfico 2). Estas características son todas ellas coincidentes con las observaciones de Murray (1973), Farbman y Yonkers (1971), Takeda y Oshino (1975) y Kinnamon *et al.* (1993).

El tipo celular I es el que presenta menor coeficiente de forma comparado con los otros tipos celulares (estadísticamente significativo) y esto se observa en los tres tipos papilares siendo ligeramente mayor en las valladas y muy similar en foliadas y fungiformes (Tabla y Gráfico 2). En cuanto al espacio que ocupa en la yema, se aprecia una densidad de volumen similar a las células tipo II y superior a las tipo III. Comparados los tres tipos papilares, este tipo celular I se objetiva de mayor volumen relativo en las papilas foliadas y de menor tamaño en las fungiformes (Tabla y Gráfico 1).

Su extremo proximal descansa sobre la membrana basal de la yema y el extremo apical se extiende hasta el poro gustativo por el que se proyecta en forma de microvellosidades largas y estrechas (1-2 μm por 0,1-0,2 μm , según datos que aporta Scalzi, 1967).

Farbman (1965a) describe la presencia del núcleo en el tercio basal de la célula. Nuestros resultados corroboran sus apreciaciones, ofreciendo unos resultados (estadísticamente significativos) donde la densidad de volumen nuclear es similar en los tres tipos papilares y menor en las células tipo I comparado con las tipo III (Tablas y Gráficos 3 y 4). En cuanto a la densidad de superficie del núcleo podemos afirmar que es similar comparando los tres tipos papilares, y que es parecido entre las células tipo I y tipo II, siendo mayor del doble comparado con las tipo III en papilas foliadas y valladas. El contenido nuclear es muy abundante (Takeda, 1976; Delay *et al.*, 1986; Yoshie *et al.*, 1990) lo que le da una apariencia muy electrodensa, la heterocromatina se reparte por el núcleo de una forma poco uniforme dándole una apariencia de manchado que dificulta la identificación de nucléolos. La electrodensidad es compartida también por todo el citoplasma celular y se debe al acúmulo de elementos que ofrecen gran resistencia al paso de los electrones como los ribosomas, polirribosomas, retículo endoplásmico rugoso y a la abundante presencia de material filamentoso dispuesto en haces paralelos al eje mayor de la célula y en las inmediaciones del núcleo.

La diversidad de orgánulos citoplásmicos en este tipo celular es escasa. Se describen mitocondrias irregularmente repartidas (Tabla y Gráfico 18), cisternas y túbulos del aparato de Golgi y de retículo endoplásmico rugoso y algunas vacuolas y cuerpos densos aislados. En nuestras observaciones, apreciamos una densidad de volumen elevada en el aparato de Golgi (Tablas y Gráficos 7 y 8) de las células tipo I, casi el doble que en las células tipo II y III. Siendo más evidente en las células tipo I de las papilas foliadas. En cuanto a los resultados de la densidad de superficie del aparato de Golgi, esta es mucho mayor en las células tipo I de las papilas foliadas que en las tipo II y III de este tipo papilar y, en general, es de mayor tamaño en estas papilas comparado con fungiformes y valladas, lo cual es estadísticamente significativo.

En cuanto a las mitocondrias (Tablas y Gráficos 9 y 10) podemos constatar una menor densidad de volumen en las células tipo I de las papilas fungiformes (estadísticamente significativo) y una menor densidad numérica en las tipo I de este mismos tipo papilar (también estadísticamente significativa). Respecto al retículo endoplásmico rugoso podemos decir que en las células tipo I su densidad de superficie es ligeramente mayor en las papilas fungiformes, y que comparado con otros tipos

celulares solo se aprecia en las papilas foliadas unas cifras ligeramente mayores en las tipo I respecto a los tipos II y III. En cuanto a la densidad numérica de este orgánulo no nos aporta ningún dato a destacar (Tablas y Gráficos 11 y 12).

No obstante, existe un orgánulo que es característico y exclusivo de este tipo celular y que contribuye también a aumentar la apariencia electrodensa de las células, antes citada, se trata de los gránulos densos.

La mayoría de los autores describen la presencia de este orgánulo celular y le consideran como elemento exclusivo de las células tipo I (DeLorenzo, 1958; Murray y Murray, 1986; Uga, 1969; Paran *et al.*, 1975; Takeda y Hoshino, 1975, 1976; Miller y Chaudhry, 1976b; Ide y Munger, 1980; Farbman *et al.*, 1985; Royer y Kinnamon, 1991; Yoshie *et al.*, 1990; Rueda, 1991). Son orgánulos bastante numerosos, tal y como se pone de manifiesto por la densidad numérica media de nuestros resultados (0.044) (Tabla y Gráfico 5); no obstante, su densidad numérica es igual en papilas fungiformes y foliadas siendo inferior en valladas. Se concentran en su mayoría en la región supranuclear, en todos los tipos celulares se observan escasos gránulos densos en región perinuclear de la célula y solo en las valladas contabilizamos estos gránulos en la región infranuclear (Tabla y Gráfico 17). Este acúmulo de gránulos densos en la región supranuclear o, más concretamente, en la zona apical de las células tipo I se describe también por otros autores como Takeda y Hoshino (1975), Farbman *et al.* (1985) o Yoshie *et al.* (1990).

Son orgánulos recubiertos de membrana con forma casi esférica, y una densidad de volumen media de 0,0032, apreciándose que esta es mayor en papilas foliadas que en valladas, ocupando las fungiformes un lugar intermedio (Fig. 20). En cuanto a la densidad numérica podemos decir que encontramos cifras muy parecidas al comparar papilas foliadas con fungiformes y estas disminuyen en las papilas valladas.

Su contenido es denso y homogéneo, Farbman (1980) trabajando a grandes aumentos describe el contenido de estas estructuras como cintas de 60-80 Å de amplitud, dispuestas en grupos aleatorios y organizados en bandas alternativas de material más denso y menos denso siguiendo un modelo repetitivo con una periodicidad de 35-40 Å.

Estudios histoquímicos realizados por Scalzi (1967), mediante tinción con ácido de Schiff; Takeda y Hoshino (1975), utilizando técnicas de tinción PS-SM y PA-TCH y Omhura *et al.* (1989), mediante el uso de lectinas, ponen de manifiesto la existencia de una gran similitud entre la composición del contenido de los gránulos densos y la

naturaleza química de la sustancia densa del poro. En este mismo sentido Murray (1973) y Cummings *et al.* (1987) describen imágenes en las que se aprecia la fusión de la membrana de los gránulos densos con la membrana citoplasmática de las células tipo I en la zona apical vertiendo, por exocitosis, su contenido a los espacios intercelulares.

Nuestras observaciones de imágenes similares a las descritas arriba nos inclinan a apoyar la hipótesis de identidad entre el contenido de los gránulos densos y la sustancia densa del poro lo que permite apuntar como una de las funciones principales de las células tipo I la de segregar, mantener y renovar la sustancia densa del poro, tal y como se apuntaba ya en los primeros trabajos en este campo como los de Trujillo-Cenoz (1957). En últimos estudios se ha constatado como estas células sintetizan y depositan una potente ecto-ATPasa en sus superficies que degrada el transmisor liberado por otras células gustativas (Bartel *et al.*, 2006).

La sustancia densa del poro, como su propio nombre indica, es un producto electrodenso, amorfo, que ocupa el canal del poro y los espacios intersticiales más apicales de la yema. Se ha especulado con que pueda actuar como una resina de intercambio iónico que permite el paso hacia la yema de algunas moléculas e impide el de otras. También se ha señalado la posibilidad de que actúe como una barrera frente al paso de bacterias u otros microorganismos hacia las células gemales desde la cavidad oral.

Algunos autores, Kinnamon *et al.* (1985) o Farbman en su trabajos anteriores al descubrimiento de las células tipo III (1965, 1969), proponen como función principal de las células tipo I la de actuar como neurotransmisores de los impulsos gustativos, después de describir la existencia de relaciones con terminales nerviosos con características propias de una unión sináptica.

Nuestras observaciones no nos permiten compartir esta posibilidad puesto que, aunque sí observamos la existencia de contactos entre las células tipo I y fibras nerviosas, en ningún caso hemos encontrado estructuras que nos hagan pensar en la existencia de relaciones de tipo sináptico. En áreas próximas al trayecto de las fibras nerviosas se pueden apreciar prolongaciones citoplásmicas que envuelven a aquellas de forma tal que recuerda a las células de Schwan. Apreciaciones en este sentido se describen también en otras publicaciones (Zham y Munger, 1983; Murray, 1986). Pumplin *et al.* (1997), en las que se describe que las células tipo I también se caracterizan por extensos procesos lamelares que envuelven a otras células gustativas tal vez para seguir limitando la propagación del transmisor(es) y evitar que los cambios

locales en las concentraciones de iones lleguen a otras regiones de la yema gustativa durante la percepción gustativa. En recientes estudios, se cree que las células tipo I tienen funciones gliales (Fig. 18), como señalan (Dvoryanchikov *et al.*, 2009). En este mismo sentido, Roper (2013) señala que este tipo celular tiene similitudes con las células gliales.

No podemos descartar, en todo caso, la posibilidad de que las células tipo I intervengan de alguna forma en la vehiculación de los estímulos gustativos desde la cavidad oral hasta las fibras nerviosas, puesto que sus microvellosidades apicales, las más largas y numerosas de todos los tipos celulares, representan la primera línea de contacto de las yemas gustativas con los estímulos orales.

Otra función que se le ha asignado a la célula tipo I es la de sustentación de la estructura de la yema. Así, Fujimoto (1980) denomina a estas células como células sustentaculares basándose para esta afirmación en la presencia de abundante material filamentoso en la constitución del citoesqueleto y en la presencia de complejos de unión del tipo desmosomas muy bien desarrollados entre estas células y células gemales vecinas o células de la periferia gemal. No podemos dar argumentos en favor o en contra de esta hipótesis, pero sí podemos constatar la existencia de los citados complejos de unión en distintos puntos de la superficie celular, siendo especialmente patentes en las regiones más apicales y periféricas de la yema. Igualmente ratificamos la abundante presencia de material filamentoso, mucho más abundante que el cualquiera de los otros dos tipos celulares.

El origen de las células de este tipo está en alguno de los miembros de la población de células basales indiferenciadas de la yema. Alguna de estas células, predeterminadas por mecanismos no conocidos, posiblemente dependientes de señales químicas emitidas por células nerviosas, se diferencia progresivamente en células con características cada vez más parecidas a las descritas a lo largo de todo este apartado (Fujimoto *et al.*, 1993). La diferenciación comienza por un alargamiento celular hasta alcanzar la región del poro. Simultáneamente, las estructuras del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico rugoso, aquí analizados y definidos bajo una base matemática, crecen y maduran y comienzan su función secretora apareciendo en el citoplasma los gránulos densos y pequeñas vesículas que migran hacia la región apical y aportan pequeñas porciones de membrana que contribuyen a la formación de los microvillis apicales. Alcanzada la madurez de la célula se inicia una migración hacia el centro de la yema degenerando progresivamente hasta acabar reabsorbida por los capilares vasculares que irrigan la yema. Este proceso se repite durante toda la vida de

la yema una y otra vez con un periodo de renovación celular cifrada en 9 días por Beidler y Smallman (1965) y Farbman (1980) después de exhaustivos estudios histoquímicos utilizando timidina tritiada. En estudios más recientes Finger (2005) no puede probar la existencia de un progenitor común, más bien dice que tenemos suficientes datos que refutan la hipótesis de un linaje común. Más recientemente, Ohtubo (2007) indica que las células tipo IV son las células progenitoras que reabastecen la yema gustativa durante el curso normal del recambio celular.

5.3.2.- Células tipo II.

Estas células se presentan en menor número que las células tipo I ya descritas, pero son ostensiblemente más grandes. Se extienden desde la base de la yema hasta el poro gustativo donde concluyen formando unas microvellosidades anchas y cortas y en escaso número que quedan embebidas en la sustancia densa sin llegar a hacer protrusión fuera del poro.

La apariencia general de este tipo celular es, aparte de voluminosa, ovalada (Tablas y Gráficos 1 y 2). En efecto, son las células más voluminosas de las yemas gustativas, ocupando una densidad de volumen media de 0,071 según nuestros resultados (0,076 según Herrero, 1998). Podemos decir que estos resultados son muy similares en los tres tipos de papilas y, comparando con los otros tipos celulares, el tipo II presenta una densidad de volumen semejante al tipo I y mucho mayor que las tipo III (estadísticamente significativa en valladas y foliadas). Su silueta es lisa, de contornos homogéneos, con pocas invaginaciones como la demuestran los resultados obtenidos en el coeficiente de forma, que es el mayor de todos los tipos celulares (estadísticamente significativo) y esto aparece en todos los tipos papilares.

El núcleo está situado entre el tercio medio y el tercio basal de la célula y comparte con ella las características de amplitud, laxitud en los contornos y forma redondeada. En cuanto al núcleo, la densidad de superficie del núcleo comparado con los otros tipos celulares es similar a las tipo I, siendo menor que en las tipo III (estadísticamente significativo). Esto se repite en los tres tipos papilares. En cuanto a la densidad de volumen del núcleo podemos decir que ocupa un lugar intermedio entre los dos tipos celulares, siendo significativamente estadístico solo en papilas foliadas (Tablas y Gráficos 3 y 4). De entre su contenido destacan de forma clara uno o dos nucléolos y los pequeños acúmulos de material cromatínico adheridos a la cara interna de la membrana nuclear. Todas estas características del núcleo y de la célula coinciden a grandes rasgos con las que aparecen en la mayoría de los trabajos publicados en este campo.

Otra característica que define en gran medida a este tipo celular es su escasa resistencia al paso de los electrones, lo que les otorga una apariencia electroclara que contrasta de forma ostensible con el resto de las células gemales. Esto explica que algunos autores las denominaran células claras, especialmente en los trabajos pioneros con el microscopio electrónico (Beidler *et al.*, 1960; Beidler y Smallman, 1965; DeLorenzo, 1963; Farbman, 1965, 1967; Murray, 1960, 1967), aunque aún en trabajos más recientes sigue manteniéndose esa denominación, como es el caso de los trabajos del grupo de investigación liderado por Kinnamon *et al.* (1985, 1988, 1993).

Tanto unos como otros explican esa apariencia electroclara (Fig. 21) como una consecuencia de la escasa presencia en el material citoplasmático de elementos electrodensos como los descritos en las células tipo I, es decir, de ribosomas, aislados o asociados en polirribosomas o con el retículo endoplásmico rugoso, material filamentoso empaquetado en gruesos haces o gránulos densos. A todo esto hay que añadir la abundancia de otros orgánulos de índole electroclara como son los sáculos y túbulos del aparato de Golgi y del retículo liso y, en especial, de vacuolas (Fig. 27).

La densidad de volumen del aparato de Golgi es intermedio en relación con los otros dos tipos celulares y se aprecia que en las papilas fungiformes es donde adquiere mayor tamaño. En cuanto a la densidad de superficie es la menor de los tres tipos celulares, es decir presenta contornos más lisos, siendo más evidente en papilas fungiformes y foliadas (estadísticamente significativo en estas últimas (Tablas y Gráficos 7 y 8)

También destacan por su abundancia las mitocondrias, según nuestros resultados su densidad numérica es la mayor respecto a los otros dos tipos celulares, siendo más abundantes en las papilas fungiformes (estadísticamente significativo) (Tablas y Gráficos 9 y 10). En cuanto a su tamaño relativo, podemos decir que la densidad de volumen ocupado es mayor en las células tipo II respecto a los tipo I y tipo III. Esto es más evidente en las papilas fungiformes (estadísticamente significativo). Estos datos concuerdan con las descripciones hechas por Murray (1973), Farbman (1985), Akisata (1980) o Takeda y Hoshino (1975).

Otros orgánulos que hemos podido describir en el análisis ultraestructural de este tipo celular son los cuerpos densos, identificados según Murray (1973) con los lisosomas; los cuerpos lipídicos, formaciones casi esféricas con contenido de naturaleza grasa y los sáculos y túbulos de retículo endoplásmico liso. Esta última estructura es característica y exclusiva de las células tipo II, según manifiestan Takeda y Hoshino (1975), Takeda (1976), Murray (1986) y Yoshie *et al.* (1990). No obstante,

Farbman *et al.* (1985) trabajando sobre yemas gustativas de mono identifican como células tipo III a algunas que poseen formaciones de retículo liso dispuestas en una configuración espiral característica.

Los túbulos de retículo rugoso están distribuidos de forma irregular y casi siempre con escaso desarrollo. Esta afirmación la constata los resultados obtenidos de la densidad numérica del retículo endoplásmico rugoso y confirma lo expuesto por otros autores, la cifra es la más baja comparada con otros tipos celulares, esto se aprecia más en las papilas foliadas donde la densidad numérica es la más baja de los tres tipos papilares. En cuanto a la densidad de superficie podemos decir que es la más baja de los tres tipos celulares y también es en las papilas foliadas donde más se aprecia (Tablas y Gráficos 11 y 12).

Al igual que en las células tipo I, también existen contactos más o menos amplios con fibras nerviosas. Estos contactos son más frecuentes en la mitad basal, pero también es posible observar zonas de relación célula-nervio en la mitad apical, incluso en regiones cercanas al poro tal y como describen Paran *et al.* (1975). Uga (1969), Kinnamon *et al.* (1985), Royer y Kinnamon (1989) y Delay *et al.* (1986) reconocen estructuras suficientes en las inmediaciones de las áreas de contacto como para considerar la unión como de tipo sináptico. Para otros, en cambio, la ausencia de engrosamientos de membrana no permite definir como sináptico el contacto entre las células tipo II y los terminales nerviosos.

Investigadores como Fujimoto y Murray (1970), Takeda (1976), Akisata (1980), Ide y Munger (1980), Royer y Kinnamon (1989), Yoshie *et al.* (1996) describen unas estructuras características denominadas como cisternas subsuperficiales, que son cisternas dilatadas del retículo endoplásmico liso que se sitúan inmediatamente por debajo de la membrana citoplásmica en alguna de las zonas en las que existe contacto célula-nervio. Estructuras semejantes se han descrito asociadas a sinapsis eferentes en células de probada actividad sensorial como son las células cocleares (Simon y Liberman, 1988). Según esto, sería razonable pensar que las células tipo II están capacitadas para actuar como receptores gustativos. En el mismo sentido argumentan trabajos como los de Murray (1973,1986) y Takeda y Hoshino (1975). Sí es posible que las células tipo II puedan recibir desde los terminales nerviosos señales neuroquímicas que pueden intervenir en los procesos de desarrollo y mantenimiento del ciclo vital de estas células, tal y como apuntan Mbiene y Farbman (1993), Oakley (1993) Witehead y Moate (1994) o Yoshie *et al.* (1996).

Abundando en la función secretora de estas células, Toyoshima y Tandler (1987) basándose en el amplio desarrollo del sistema tubular de retículo liso apuntan una elevada actividad secretora de productos como el glucógeno o ciertos derivados esteroideos cuya actividad en los órganos gustativos es difícil de interpretar.

Según últimos estudios las células gustativas tipo II expresan receptores acoplados a proteínas G (GPRS) para, compuestos amargos, umamis o dulces (Roper, 2013). En consecuencia, estas células han sido red denominadas como células receptoras. Cada célula receptora responde principalmente a una sola calidad del sabor, como el dulce, el amargo o el umami (Yoshida *et al.*, 2006; Tomchik *et al.*, 2007). Por tanto, cada célula receptora está bien “sintonizada” con un estímulo de sabor específico. Pero, curiosamente, estas células no poseen sinapsis estructuralmente identificables (Clapp *et al.*, 2004) y, así, desde hace muchos años no estaba claro cómo se comunican las células receptoras con fibras aferentes sensoriales. Ahora, sin embargo, sabemos que las células receptoras secretan ATP como un neurotransmisor sobre las fibras aferentes sensoriales, probablemente a través de hemicanales pannexina1 en su membrana de superficie (Romanov *et al.*, 2012). Por lo tanto, la liberación sináptica de ATP a partir de células receptoras del gusto no implica exocitosis vesicular o sinapsis bien definidas (Roper, 2013).

Cada célula tipo II responde principalmente a un solo tipo de sabor (dulce o amargo, o umami, presumiblemente debido a que cada receptor celular expresa GPCRs para cada tipo de sensación gustativa. Sin embargo, no hay una estricta expresión de receptor gustativo célula-célula como el que aparece en el caso de la olfacción (Mombaerts, 2004; Serizawa *et al.*, 2004). Es decir, algunas células receptoras gustativas tipo II responden a dos o más gustos diferentes y expresan múltiples GPCRs del gusto (Tomchik *et al.*, 2007; Dando *et al.*, 2012).

En las yemas fungiformes el contenido citoplásmico de este tipo celular es bastante diferente a los otros tipos celulares ya comentados. Aparecen mitocondrias grandes y numerosas distribuidas por toda la célula, aunque son más abundantes en la región supranuclear. Nuestros resultados apoyan claramente esta afirmación, pues la densidad de volumen y la densidad numérica es la mayor de los tres tipos celulares y esta es más evidente en las papilas fungiformes donde es significativamente estadístico. El aparato de Golgi, bien desarrollado, se localiza en la mayoría de las ocasiones en posición perinuclear. En nuestros resultados la densidad de volumen del Golgi es mayor en las papilas fungiformes, respecto a los otros dos tipos papilares. Son, así mismo, abundantes las vacuolas y las vesículas de distintos tamaños y formas, lo

que contribuye a dar la apariencia electroclara de estas células. La mayoría de estas vacuolas se presentan vacías, pero algunas tienen un contenido granular suavemente teñido. Otros orgánulos rodeados de membrana aparecen irregularmente distribuidos, además de cuerpos lipídicos y partículas de glucógeno. Finalmente, puede verse un delicado material filamentoso similar al descrito para las células tipo I, pero en mucha menor cantidad.

Ohtubo (2007) observó células de tipo II en todas las yemas gustativas examinadas, mientras que las células tipo III existían en el 92% de las yemas gustativas, lo que indica que casi todas yemas tienen tanto las células tipo II como tipo III, si bien en un porcentaje de 5 a 1 tipo II/tipo III. Según este autor las células tipo II se pueden clasificar en dos subtipos según expresen ciertos receptores específicos del gusto asociados a proteínas G: los T1Rs y los T2Rs. Los primeros se presentan como heterodímeros. El T1R1/T1R3 es un receptor de aminoácidos ampliamente comprobado (Nelson *et al.*, 2002). Qin *et al.* (2010) señalan que en la actualidad es ampliamente reconocido que las células de tipo II y tipo III están relacionadas con la percepción gustativa y transducción de señales (Clapp *et al.*, 2006). Los receptores del dulce (T1R2/T1R3), del amargo (T2RS) y del umami (T1R1/T1R3) son todos receptores acoplados a la proteína G. Estos receptores comparten una vía de señalización similar: la activación de la proteína G, la liberación de Ca^{2+} almacenado, la activación de TRPM5 y los canales de sodio dependientes de voltaje, y generación de potenciales de acción. Los potenciales de acción y un aumento del Ca^{2+} abren los hemicanales para liberar TP sobre las fibras nerviosas gustativas (Yoshida *et al.*, 2010).

A tenor de nuestras observaciones lo único que podemos concretar con respecto a la funcionalidad de estas células y que apoyaría las conclusiones de los últimos estudios realizados es la presencia de un elevado número de mitocondrias en su citoplasma, sobre todo en las papilas fungiformes, el buen desarrollo del sistema del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico liso, lo que implica una actividad metabólica muy amplia, con gran consumo energético, lo que explicaría, también, la presencia de acúmulos de material lipídico (cuerpos lipídicos) como reserva energética. En la misma línea se expresan también Farbman (1965b) y Paran *et al.* (1975).

La población de células de este tipo está en continua evolución, desapareciendo progresivamente unas y apareciendo otras en su lugar. Como en las células tipo I, y según trabajos de Beidler y Smallman (1965), Farbman (1980), Farbman y Mbiene (1991) y Ganchrow *et al.* (1993), el origen de las células tipo II parece estar en algunas

de las células indiferenciadas de la población de células basales. Estas células responderían a señales químicas desconocidas iniciando un proceso continuo de diferenciación que comienza con el alargamiento progresivo del citoplasma hasta llegar al poro gustativo. Al mismo tiempo van apareciendo y aumentando en número los orgánulos propios de este tipo celular hasta alcanzar la imagen típica de célula tipo II. Llegado este punto la evolución no se detiene, la célula inicia un proceso de migración hacia la periferia gemal y simultáneamente se eleva la presencia de cuerpos densos (lisosomas) y aumenta la vacuolización, signos, ambos, de degeneración celular que culmina con la desestructuración del citoplasma y la eliminación progresiva de los restos celulares.

En el proceso de eliminación de estos restos distintos autores ofrecen diferentes posibilidades. Para algunos son expulsados hacia la cavidad oral por el poro gustativo. Farbman (1969), Fujimoto y Murray (1970) y Murray (1986) atribuyen a las células tipo I una actividad fagocítica hacia las células degeneradas de cualquier tipo. Yoshie *et al.* (1990) en trabajos sobre papilas valladas de hámster no han encontrado actividad fagocítica en las células tipo I, este grupo de investigación sugiere que son los macrófagos de origen vascular los que se encargan de eliminar las células gustativas degeneradas, en el mismo sentido se pronuncian Suzuki *et al.* (1996).

Nuestros trabajos no nos permiten pronunciarnos a favor ni en contra de una u otra forma de eliminación, pero sí hemos observado variaciones en la ultraestructura de las células tipo II dependiendo de su localización en la yema, encontrando en las células más periféricas una mayor vacuolización que en las células de localización más central. Estas observaciones están más en concordancia con el proceso de evolución celular descrito por Beidler y Smallman (1965) y Farbman (1980) en el que se considera como origen de las células tipo II una línea de células basales específica, y contradice la teoría de Delay *et al.* (1986) y Kinnamon *et al.* (1985, 1988) según la cual todos los tipos celulares proceden de una única línea celular basal, siendo las células tipo I (de localización más periférica) células más jóvenes que progresivamente, pasando por estadios intermedios, se transforman en células tipo II más viejas (de localización más central). Estudios más recientes postulan que es altamente poco probable que una célula madura tipo III se transforme en una célula tipo II fenotípicamente madura; varios estudios postulan esta cuestión (Yee *et al.*, 2003). Sin embargo, los estudios más recientes de Finger (2005), que implican el análisis de ratones quiméricos (Stone *et al.*, 2002) demuestran que deben existir múltiples linajes dentro de una papila gustativa, es decir, que los tres tipos de células no son meramente diferentes etapas de desarrollo de un solo tipo de células gustativas. Datos de otros investigadores

(Kusakabe *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 2003) sugieren que las células tipo II y tipo III pueden proceder de una célula común, que expresa NCAM y Mash1. Finger (2005) reevaluó sus análisis de datos quiméricos para poner a prueba la posibilidad de que las células tipo I pudieran originarse de una población de células basales mientras que el tipo II y el III derivaran de células de una población proliferativa separada. El análisis llevado a cabo por Finger (2005) no prueba que las células tipo II y tipo III surgen de un progenitor común, más bien dice que tenemos suficientes datos que refutan la hipótesis de linaje común. Por tanto, la cuestión de si las células de tipo II y tipo III son distintos linajes o simplemente diferentes puntos finales de un tipo de célula intermedio común permanece abierto a ulteriores investigaciones. Ohtubo (2007) indica que las células tipo IV son las células progenitoras que reabastecen la yema gustativa durante el curso normal de recambio celular.

5.3.3.- Células tipo III.

Dentro de las yemas gustativas existen algunas células que no pueden ser encuadradas en ninguno de los tipos celulares comentados hasta ahora, son las células tipo III, las cuales representan no más del 5-15% del total de las células gemaes, lo cual complica el estudio particular de este tipo celular y explica que no hayan sido consideradas como un tipo celular en los primeros estudios hasta que Murray (1971) las describiera como un tipo celular independiente con características y funcionalidad propias.

Este tardío reconocimiento tiene también su explicación en su apariencia y características generales. Poseen una electrodensidad media y una forma intermedia entre las células tipo I y las células tipo II, lo que hizo que fueran consideradas como una fase intermedia en el proceso evolutivo de un tipo al otro (Beidler y Smallman, 1965; Scalzi 1967; Royer y Kinnamon, 1988). La diferencia más importante, sin embargo, es que las células tipo III poseen sinapsis (Yee *et al.*, 2001).

En efecto, el coeficiente de forma de las células tipo III (Tablas y Gráficos 1 y 2) que nosotros hemos obtenido es intermedio comparándolo con los otros dos tipos celulares, siendo significativamente estadístico en foliadas, y es similar comparando los tres tipos de papilas. Su silueta es también intermedia entre la anfractuosa y alargada de las células tipo I y la ovalada y lisa de las células tipo II.

Son células pequeñas, la densidad de volumen de las células tipo III es la más pequeña de todas las células gemaes, esto ocurre en todas las papilas gustativas, pero es significativamente estadístico en las foliadas y valladas. Se asientan generalmente

en zonas centrales de la yema gustativa, extendiéndose desde la base gemal hasta las inmediaciones del poro, pero sin hacer protrusión por éste. Carecen de microvellosidades apicales según nuestras observaciones, ya que el acceso al poro está truncado por prolongaciones citoplásmicas de las células tipo I.

Nuestros resultados respecto al núcleo (Tablas y Gráficos 3 y 4) afirman que su densidad de volumen es la mayor de los tres tipos celulares, esto ocurre en todos los tipos de papilas gustativas, si bien se advierte menor diferencia en las fungiformes y más en foliadas, donde es significativamente estadístico. La densidad de superficie del núcleo de las células tipo III es mayor que la obtenida para las tipo I y II. Esto ocurre en los tres tipos papilares siendo significativamente estadístico en las foliadas y valladas.

La apariencia moderadamente densa viene definida por su contenido citoplásmico, los ribosomas son abundantes, pero sin llegar a la cantidad en que se presentan en las células tipo I, tal como describe Takeda y Hoshino (1975), y lo mismo puede decirse de otros elementos electrooscuros como las agregaciones filamentosas o las estructuras del retículo endoplásmico rugoso pero, además, abundan también las formaciones electroclaras como las vacuolas.

Pueden observarse otros orgánulos como mitocondrias, aparato de Golgi en posición supranuclear casi siempre, cuerpos densos y cuerpos multivesiculares. Según nuestros resultados, el aparato de Golgi (Tablas y Gráficos 7 y 8) presenta una densidad de volumen igual que el observado en las células tipo II y mayor que el obtenido para las células tipo I en papilas fungiformes y valladas, en las foliadas la densidad de volumen de este orgánulo en las células tipo I es bastante mayor que en las tipo III. La densidad de superficie nos ofrece resultados que son significativamente estadísticos: la densidad de superficie en células tipo I es mucho mayor que en células tipo II y tipo III en foliadas; la densidad de superficie en fungiformes es más alta en células tipo III y menor en células tipo II, con valores intermedios para las tipo I.

Las mitocondrias aparecen dispersas por todo el citoplasma (Tabla y Gráfico 18), suelen ser grandes y con crestas bien desarrolladas. Los datos obtenidos de la densidad de volumen (Tabla y Gráfico 9) indican que estos orgánulos ocupan menor volumen en las células tipo III respecto a los otros dos tipos celulares en papilas foliadas y valladas, ocupando un lugar intermedio en las papilas fungiformes, siendo este resultado significativamente estadístico. En cuanto a los datos de densidad numérica (Tabla y Gráfico 10) podemos afirmar que se encuentran en menor cantidad, respecto a los otros dos tipos de células gemales en papilas foliadas y valladas,

mientras que presentan un número intermedio en las papilas fungiformes, teniendo esta afirmación significancia estadística.

La distribución del retículo endoplásmico rugoso es aleatoria por el citoplasma (Tabla 19). La densidad numérica varía en comparación con los distintos tipos celulares según la papila gustativa, así la densidad numérica en las células tipo III es la más alta respecto a las tipo I y II en papilas valladas (Gráfico 11); es igual a las tipo II y menor que las tipo I en papilas fungiformes y valores intermedios en papilas foliadas (Tabla 11). En cuanto a los datos obtenidos de la densidad de superficie (Tabla y Gráfico 12) para este orgánulo en las células tipo III podemos decir que presenta valores más altos en papilas valladas, más bajos en foliadas e intermedios en fungiformes.

Pero no son estos orgánulos los que confieren una identidad propia a este tipo celular. En las yemas de las papilas foliadas existen, según describió Murray *et al.* (1969, 1971) en el conejo, dos tipos de vesículas exclusivas de este tipo celular: las vesículas nucleodensas y las vesículas claras. Rueda (1991) tras la realización de un análisis discriminante, también en el conejo, demuestra la especificidad de las vesículas nucleodensas y las vesículas claras en las células tipo III. Nosotros hemos podido comprobar su existencia también en la rata, como ya apuntaron Fujimoto (1973), Takeda y Hoshino (1975, 1988) Takeda *et al.* (1992) o Bloom y Fawcett (1983).

Las vesículas nucleodensas aparecen dispersas por todo el citoplasma, especialmente en los dos tercios basales. Pueden observarse, según Murray *et al.* (1969) por todo el citoplasma, aunque son más frecuentes en las regiones peri e intranuclear. Derivado del resultado de nuestros datos, podemos decir que son más abundantes en las regiones infranuclear y perinuclear de las células tipo III de papilas valladas y fungiformes, pero no en papilas foliadas donde, también se distribuyen numerosamente en la región supranuclear de la célula (Tabla y Gráfico 20). Este orgánulo aumenta progresivamente su densidad numérica a medida que la observación se aproxima a zonas de citoplasma contiguas a terminaciones nerviosas. Su aspecto es bastante parecido al de los gránulos densos de las células tipo I pero se diferencian claramente de estos teniendo en cuenta las cuatro características distintivas que recoge Murray en su trabajo de 1986 y que son:

- 1) Las vesículas nucleodensas son más pequeñas, como ha corroborado Herrero (1998) a la observación con microscopio electrónico.
- 2) El tamaño es más uniforme y el contenido más heterogéneo en las vesículas nucleodensas, lo que también hemos podido poner de manifiesto en nuestro trabajo.

En una observación a grandes aumentos se puede comprobar cómo el contenido de las vesículas nucleodensas tiene un aspecto granular, con porciones más y menos electrodensas, en tanto que en los gránulos densos todo el contenido es homogéneamente electrodenso.

3) La localización de las vesículas es predominantemente peri e infranuclear (Tabla y Gráfico 21), con polarización hacia las áreas de contacto con terminales nerviosos. Los gránulos densos están mayoritariamente en posición supranuclear, sin relación aparente con fibras nerviosas.

4) Los gránulos densos son empaquetados en las estructuras del aparato de Golgi, mientras que no existe evidencia, según Murray (1986), de que las vesículas nucleodensas procedan de la actividad del aparato de Golgi. El tipo de estudio realizado por nosotros no permite comprobar este punto pero las tres características anteriores son suficientes para distinguir sin género de dudas los dos orgánulos (gránulos densos y vesículas nucleodensas) como estructuras diferentes.

Según nuestros datos, podemos afirmar que la densidad numérica de este orgánulo es mayor en las papilas fungiformes que en las valladas y en estas mayor que en las papilas foliadas, siendo esto significativamente estadístico (Tablas y Gráficos 15 y 16). En cuanto a la densidad de volumen podemos decir que el volumen que ocupan las vesículas nucleodensas en las células tipo III es similar en las papilas fungiformes y valladas, siendo menor en las foliadas.

En cuanto al contenido se ha especulado con que fueran monoaminas biógenas las sustancias empaquetadas en las vesículas nucleodensas (Graziadei ,1973; Nada e Hirata, 1975, 1976, 1977; Fujimoto y Yakamoto, 1980). Takeda en solitario o con su grupo de investigación han puesto de manifiesto, en sucesivos trabajos (desde 1975, 1976, 1977, 1980, 1981, 1982, 1983, 1985, 1988, hasta 1992) la naturaleza química de estas sustancias. Mediante métodos de fluorescencia histoquímica utilizados en todos los tipos papilares de varias especies animales han podido comprobar cómo tras la administración de precursores amínicos como la L-DOPA o 5-HTP marcados se han obtenido evidencias claras de su incorporación a las vesículas de las células tipo III, incrementándose el número de éstas y la cantidad del material acumulado en las ya existentes. Estudios posteriores (Roper, 1989; Delay *et al.*,1993; Kim y Roper, 1995; Zancanaro *et al.*, 1995) han comprobado que esos precursores amínicos son almacenados en las vesículas nucleodensas en forma de 5-HT o serotonina, sustancia de reconocida actividad neurotransmisora.

Al igual que las vesículas nucleodensas, según nuestras observaciones, las vesículas claras son orgánulos exclusivos de las células tipo III. Estas vesículas claras son orgánulos recubiertos de membrana, de muy pequeño tamaño y que se acumulan en grandes cantidades en el citoplasma celular adyacente a las fibras nerviosas con las que contacta. En nuestro trabajo hemos observado una densidad numérica del 100% en la región infranuclear en papilas foliadas, mientras que en fungiformes y valladas se objetivan en región peri e infranuclear (Tabla y Gráfico 20). Esta densidad numérica es mayor en las papilas fungiformes (Tabla y Gráfico 13) respecto a los otros dos tipos papilares que son similares entre sí. En cuanto a nuestros resultados respecto a la densidad de volumen podemos decir que este orgánulo ocupa un mayor volumen en las células tipo III de las papilas foliadas que en los otros dos tipos papilares, que es muy similar (Tabla y Gráfico 14). La presencia de estas pequeñas vesículas de contenido transparente en las células tipo III es admitida por la mayoría de los investigadores que han trabajado en este campo (Murray, 1971, 1986; Hirata y Nada, 1975; Takeda y Hoshino, 1975; Farbman, 1980, Farbman *et al.*, 1985; Fujimoto *et al.*, 1987; Nada y Komatsu, 1983; Endo, 1988; Yoshie *et al.*, 1988; Toyoshima y Tandler, 1989; etc.) y son reconocidas por todos ellos como vesículas sinápticas.

Si a todas estas circunstancias añadimos la presencia en las células tipo III, observada también por nosotros, de engrosamientos electrodensos de membrana en las zonas de contacto con terminales nerviosos, típicos de las uniones de tipo sinápticas aferentes, es razonable pensar que estamos ante un tipo celular con una marcada funcionalidad neurotransmisora. Las células de tipo III no secretan ATP, liberan serotonina, norepinefrina y GABA (Huang *et al.*, 2008; Dvoryanchikov *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011). En consonancia con la identificación de las sinapsis, las células de tipo III expresan proteínas asociadas con la transmisión sináptica, incluyendo SNAP 25, canales dependientes de voltaje de Ca^{2+} , enzimas biosintéticas para la serotonina y GABA, y transportadores de captación para aminas biogénicas (Dvoryanchikov *et al.*, 2011). Por ello, las células tipo III han sido red denominadas como células presinápticas (DeFazio *et al.*, 2006).

Abundando en lo anterior, Kimura *et al.* (2007) señalan que las células tipo III se caracterizan por presentar contactos sinápticos morfológicamente identificables con las fibras nerviosas gustativas y la expresión de la proteína sináptica de membrana SNAP25 (Yang *et al.*, 2000), así como la molécula de adhesión celular neural (NCAM) (Nelson y Finger, 1993). La presencia de un claro contacto sináptico implica a estas células en la transmisión de la información al sistema nervioso. Una cuestión a investigar en el futuro es cómo los diferentes tipos de células gustativas alargadas de

este tipo son reemplazados desde la población celular basal proliferativa (Finger, 2005).

Ohtubo (2007) señala que el tipo II, que expresa receptores del gusto, y las células de tipo III, que forman las sinapsis con los nervios del gusto, tienen una relación de tipo II a tipo III de 5 a 1, respectivamente. Esta proporción puede ser importante para la transducción de señales dentro de las yemas gustativas. Las células presinápticas (tipo III) transducen estímulos ácidos.

Ohtubo y Yoshii (2011) indican que las células de tipo III son sensibles a los ácidos (Huang *et al.*, 2008; Kataoka *et al.*, 2008) y, además, parece que hay interacciones celulares entre las células tipo II y tipo III (Hayato *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2007; Romanov *et al.*, 2007).

El origen de las células tipo III, como en las tipo I y II, son algunas células indiferenciadas de la zona basal de la yema. Dada la comprobada actividad neurotransmisora de este tipo celular, se especuló con la posibilidad de que las células basales que dan lugar a las células tipo III provinieran de colonias migradas desde el ectodermo neuroendogénico (tubo neural, crestas neurales o placas ectodérmicas) durante el desarrollo embrionario. Recientes estudios vienen a contradecir esta hipótesis; así, Stone *et al.* (1995) trabajando con lenguas de ratones mosaico con cromosoma X inactivado determina que todas las células de las yemas gustativas y las células del epitelio circundante siempre presentan un modelo de mosaico idéntico, lo que sugiere que las células epiteliales y las células gemales tiene un mismo progenitor y que los receptores gustativos derivan de elementos del tejido epitelial local. A la misma conclusión llegaron Barlow y Northealt (1995) trabajando en anfibios mediante el uso de anticuerpos monoclonales.

Sea como fuere, origen epitelial local o neuroectodérmico, el caso es que a partir de unas células basales específicas e indiferenciadas se produce un proceso de diferenciación que consiste en un alargamiento del citoplasma y desarrollo de los orgánulos característicos de este tipo celular. Según Farbman (1980), en las células tipo III más jóvenes abundan los ribosomas y son más escasas las vesículas claras y electrodensas. A medida que la célula madura aumenta el número de vesículas y aparecen vacuolas y cuerpos densos lisosómicos. Es posible que la funcionalidad sensitiva de estas células se modifique a medida que evoluciona su ciclo vital, tal y como apunta Mistretta (1989).

5.4.- Comparación entre tipos celulares control y sacarina.

En este estudio hemos procedido a comparar los cambios o similitudes encontrados en los tres tipos celulares de las distintas papilas, unas tratadas con sacarina y otras utilizadas como controles. Se consideraron los parámetros de nivel 1 así como los del nivel 2 referentes a mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso, gránulos densos, vesículas nucleodensas y vesículas claras. En este aspecto, hemos de reseñar que no existe bibliografía específica al respecto con la que poder discutir y comparar estos resultados. En general, las observaciones de la localización y estructura global de las papilas, así como la de sus yemas gustativas, no difieren de lo observado en las papilas tomadas como control y que hemos discutido con anterioridad.

5.4.1.- Células tipo I.

5.4.1.1.- Papilas foliadas sacarina.

Son estrechas y alargadas, se extienden desde la base de la yema hasta el poro. Las células tipo I de las papilas foliadas tratadas con sacarina presentan una localización, aspecto y densidad igual a la descrita en este tipo celular en las papilas foliadas control. Esto queda demostrado con los resultados obtenidos, la densidad de volumen que ocupan es menor que el de las células tipo II y III de este tipo papilar, siendo esta afirmación significativamente estadística (Tabla 1, Gráfico 1). El coeficiente de forma es el más pequeño respecto a los otros dos tipos celulares de este tipo papilar teniendo esto una significación estadística (Tabla 2, Gráfico 2). Comparando la densidad de volumen de este tipo celular de una papila foliada control con la tratada con sacarina observamos que es ligeramente inferior el de esta última. En cuanto al coeficiente de forma ocurre lo contrario y es mayor en la célula tipo I tratada con sacarina. Con estos resultados podemos decir que las células tipo I de las papilas foliadas tratadas con el edulcorante objeto de nuestro estudio ocuparían un volumen menor y su contorno sería menos alargado. Esto induce a pensar en una repercusión en las funciones reseñadas para este tipo celular, que se verían afectadas en los animales alimentados con sacarina, ya que las células tipo I se caracterizan por extensos procesos lamelares que envuelven a otras células gustativas (Pumplin *et al.*, 1997), tal vez para seguir limitando la propagación del transmisor(es) y evitar que los cambios locales en las concentraciones de iones lleguen a otras regiones de la yema gustativa durante la percepción gustativa. Además, Finger (2005) señala que estas características sugieren

una función glial para las células de tipo I, por ejemplo, un aclaramiento del transmisor y aislamiento funcional de otros tipos de células gustativas. Este aislamiento podría verse afectado en animales alimentados con sacarina habida cuenta de nuestros resultados y, por ello, la percepción sávida de otros tipos celulares (incluyendo el tipo II en el que se han detectado receptores específicos para el dulce de edulcorantes).

El núcleo se encuentra en el tercio inferior del citoplasma y comparte con él las características descritas anteriormente, estas apreciaciones subjetivas se objetivan con los resultados obtenidos (Tablas y Gráficos 3 y 4). La densidad de volumen del núcleo es menor en este tipo celular, igual que ocurre en las tipo I control, siendo significativamente estadístico. La densidad de superficie es similar a las tipo II y mucho menor que las células tipo III, igual que ocurre en las papilas foliadas control. Comparando la densidad de superficie y la densidad de volumen del núcleo de las células tipo I de las papilas foliadas control con las tratadas con sacarina no se objetivan cambios.

Los gránulos densos son los orgánulos más representativos del tipo celular I y estas formaciones se observan en gran número, igual forma y misma electrodensidad que en las células tipo I de estas papilas control. Hemos podido comprobar que la densidad numérica es similar en este tipo celular en papilas control y sacarina (Tabla y Gráfico 7), siendo la densidad de volumen ligeramente inferior en las control respecto a las tratadas con sacarina. Sí hemos observado una variación en cuanto a su dispersión: en las células tipo I control este orgánulo aparece en las regiones supranuclear y perinuclear, pero en las células tratadas con sacarina hasta un 20% de su densidad numérica se encuentra en la región infranuclear (Tabla 17 y Gráfico 17), lo cual vuelve a suponer un notable cambio de un orgánulo tan específico en los animales alimentados con sacarina.

El aparato de Golgi en estas células tipo I se encuentra habitualmente en posición supranuclear, igual que en las células control. Este orgánulo en este tipo celular de las papilas foliadas ocupa una densidad de volumen similar al de los otros tipos celulares y menor si lo comparamos con el de las células control (Tabla y Gráfico 7). La densidad de superficie (Tabla y Gráfico 8) es mucho menor que los otros dos tipos celulares, y comparado este parámetro con el de la célula control podemos decir que es mucho menor en la célula tratada con sacarina. En este sentido, conviene recordar que Murray (1986) describe cómo en las células tipo I el aparato de Golgi parece intervenir en la modificación y empaquetamiento de los productos sintetizados en el retículo rugoso dando a los denominados gránulos densos. Teniendo en cuenta Murray (1975)

y Takeda y Oshino (1975) se ha podido observar cómo las membranas de los gránulos densos están fusionadas con la membrana plasmática, vertiendo su material denso al espacio intercelular, contribuyendo a formar la sustancia densa del poro, es factible pensar que, a la vista de los resultados antedichos, en los animales tratados con sacarina la constitución y secreción de este material se vea comprometida o, al menos, modificada por la sacarina.

El retículo endoplásmico rugoso se encuentra irregularmente distribuido (Tabla y Gráfico 19) en el citoplasma, no encontrando diferencias entre las células control y las tratadas con sacarina. La densidad de superficie en este tipo celular de papilas foliadas sacarina es igual que para las tipo III e inferior que las tipo II (Tabla y Gráfico 12). Comparado con las control, esta densidad de superficie es mayor en las tratadas con el edulcorante comparadas con las control -una nueva alteración-. La densidad numérica de este orgánulo es intermedia comparada con los otros dos tipos celulares de esta papila, comparado con las células control podemos decir que la densidad numérica es mayor en las tratadas con el edulcorante, a tener en cuenta en relación a la funcionalidad que Murray (1986) otorga a este orgánulo en este tipo celular (Tabla y Gráfico 11). Según este autor el mayor desarrollo del retículo rugoso en las células tipo I denota una mayor actividad sintética, lo cual se manifiesta en las células tratadas con sacarina.

Las mitocondrias aparecen irregularmente distribuidas por todo el citoplasma (Tabla y Gráfico 18), de la misma forma que lo observamos en las células control. La densidad de volumen que ocupan es similar al de los tipos celulares en esta papila, y similar al observado en las control (Tabla y Gráfico 9). En cuanto a la densidad numérica es muy similar a la de las tipo II y ligeramente inferior a la de las tipo III de este tipo papilar. Al comparar con el control observamos que la densidad numérica de las mitocondrias también es mayor en las células tratadas con sacarina que en las control.

Hasta la fecha no está claro qué células en la yema gustativas son las encargadas de percibir la estimulación por el Na^+ , aunque parece que pudieran ser las células tipo I las responsables (Chandrashekar *et al.*, 2010). Los cambios observados en este tipo celular en esta papila entre controles y tratados con sacarina (sódica), y que también se apreciarán en el resto de papilas para el mismo tipo celular, hace pensar en que, efectivamente, pudiera estar relacionado.

Por otra parte, la morfometría ya reveló diferencias significativas en el tamaño de la papila entre los grupos control y diabéticos (Pai *et al.*, 2007). Estos hallazgos sugieren que el deterioro del gusto en sujetos diabéticos puede ser causado por

defectos derivados de una neuropatía y/o cambios morfológicos en las papilas gustativas. O dicho de otra manera, cambios morfométricos como los observados en las células de las yemas tratadas con sacarina pueden reflejar alteraciones histofisiológicas.

5.4.1.2.- Papilas fungiformes sacarina.

El aspecto de las células tipo I de las papilas fungiformes tratadas con sacarina es muy similar a las tipo I control lo cual se objetiva porque tienen una densidad de volumen similar a las tipo II, lo mismo ocurre en las fungiformes control con este parámetro (Tabla y Gráfico 1). El coeficiente de forma (Tabla y Gráfico 2) es el más bajo respecto a los otros dos tipos celulares tratados con sacarina, igual que en las papilas control. Comparando las células tipo I tratadas con la de las papilas control apreciamos que la densidad de volumen es menor en las tratadas con sacarina y ocurre lo contrario con el coeficiente de forma, siendo esto significativamente estadístico; igual que lo descrito en las células tipo I de la papilas foliadas sacarina, es decir, se podría ver afectada la función glial y de aislamiento funcional descrita para estas células por Finger (2005), al igual que hemos señalado en las tipo I de las papilas foliadas.

La densidad de volumen del núcleo es similar en los tres tipos celulares y su densidad de superficie es intermedia. Comparando estos parámetros entre las células tipo I de esta papila tratada con las control los resultados son muy similares (Tablas y Gráficos 3 y 4).

Los gránulos densos (Tablas y Gráficos 5 y 6) son también los orgánulos más característicos de este tipo celular. A diferencia de lo que ocurre en las células tipo I de los otros tipos papilares, son muy escasos en número y su forma varía desde la esférica hasta la de varilla. Dadas estas considerables diferencias entre los gránulos densos descritos en yemas valladas y foliadas y los descritos en fungiformes otros autores niegan la existencia de los gránulos densos en las células tipo I de las yemas fungiformes (Murray, 1973; Miller y Chaudhry, 1976b). En el caso de los gránulos densos de las células tipo I tratadas con sacarina sí cumple lo descrito anteriormente para las tipo I control, pues su densidad numérica es la menor comparada con el resto de tipos papilares y también es menor su densidad de volumen. Comparando estos parámetros podemos decir que no hay diferencia entre la densidad de volumen de este orgánulo de una célula control con otra tratada con sacarina y que la densidad numérica de los gránulos densos es inferior en las papilas fungiformes tratadas con el edulcorante artificial. En cuanto a su distribución en la célula en las papilas control se

encuentran en la región apical y en menor cantidad en la zona perinuclear, sin embargo, en las células tratadas con sacarina se encuentran en todas las regiones celulares e incluso en un alto porcentaje en la zona infranuclear. Corroboraría de nuevo el compromiso y/o alteración al que se ven sometidas estas células en los animales alimentados con sacarina de cara a la síntesis del elemento denso del poro (Murray, 1975; Takeda y Oshino, 1975), importante para la función gustativa.

En las inmediaciones del núcleo de las células tipo I tratadas con sacarina aparece el aparato de Golgi, ocupa una densidad de volumen ligeramente inferior que las células tipo II y III, una densidad de superficie igual que los otros dos tipos celulares y comparado con las células tipo I tomadas como control no ofrece variaciones.

En las células tipo I tratadas con el edulcorante artificial los túbulos y sáculos del retículo endoplásmico rugoso (Tablas y Gráficos 11 y 12) más o menos dilatado aparecen por todo el citoplasma (Tabla y Gráfico 19), al igual que ocurre en este tipo celular control. La densidad numérica es intermedia comparada con la de los otros dos tipos celulares y menor que la observada en las células tipo I tomadas como control. En cuanto a la densidad de superficie podemos decir que es intermedia respecto a los otros dos tipos celulares de esta papila tratada con el edulcorante artificial y menor que la encontrada en las células control.

En las células tipo I de este tipo papilar las mitocondrias se distribuyen irregularmente (Tabla y Gráfico 18), al igual que ocurre con las control. La densidad numérica es intermedia comparado con los otros dos tipos celulares de las papilas fungiformes tratadas con el edulcorante objeto de nuestro estudio, e igual a este tipo celular de las papilas control. La densidad de volumen es intermedia respecto a los otros dos tipos celulares y comparando la densidad de volumen de las papilas control es muy similar (Tablas y Gráficos 9 y 10).

5.4.1.3.- Papilas valladas sacarina.

Las tipo I son las células más numerosas de las yemas valladas. A la observación su forma es alargada y estrecha, como las encontradas en las control. Esto se objetiva porque su densidad de volumen es similar a las células tipo II y mayor que las tipo III, como ocurre en las papilas valladas control, y su coeficiente de forma muy bajo. Comparando estos parámetros con las células tipo I de valladas control podemos observar la densidad de volumen es menor en las tratadas con sacarina, al igual que lo observado en los otros dos tipos papilares, y el coeficiente de forma es mayor en las

células tipo I control, esto difiere con lo observado en los otros dos tipos papilares (Tablas y Gráficos 1 y 2).

Como ya mencionamos para las papilas foliadas, las células tipo I se caracterizan por extensos procesos lamelares que envuelven a otras células gustativas (Pumplin *et al.*, 1997), tal vez para seguir limitando la propagación del transmisor(es) y evitar que los cambios locales en las concentraciones de iones lleguen a otras regiones de la yema gustativa durante la percepción gustativa. Además, Finger (2005) señala que estas características sugieren una función glial para las células de tipo I, por ejemplo, un aclaramiento del transmisor y aislamiento funcional de otros tipos de células gustativas. Por ello, al igual que en las foliadas, este aislamiento podría verse afectado en animales alimentados con sacarina habida cuenta de nuestros resultados y, por ello, la percepción sávida de otros tipos celulares

El núcleo presenta un aspecto similar al tipo I control con uno o varios nucléolos y gran cantidad de cromatina. Al comparar la densidad de superficie del núcleo de las células tipo I control con este tipo celular tratado con sacarina los resultados son similares, lo mismo que ocurre con el parámetro de la densidad de volumen (Tablas y Gráficos 3 y 4).

En las células tipo I de las papilas valladas tratadas con sacarina la densidad numérica de los gránulos densos es mucho mayor que la objetivada en las tomadas como control, lo mismo ocurre con la densidad de volumen (Tablas y Gráficos 5 y 6). En cuanto a la distribución, ocurre lo contrario que en los otros dos tipos papilares descritos (Tabla y Gráfico 17). En este tipo papilar control los gránulos densos se encuentran por todo el citoplasma, pero en las papilas tratadas con el edulcorante su localización es en las regiones supra y perinuclear. Es decir, vuelve a verse afectado un orgánulo tan específico en los animales alimentados con sacarina con el correspondiente compromiso y/o alteración al que se ven sometidas estas células en dichos animales y su implicación en la síntesis del elemento denso del poro (Murray, 1975; Takeda y Oshino, 1975) y, por ello, en la función gustativa.

El aparato de Golgi en las células tipo I de esta papila aparece en la región peri o supranuclear y está bien conformado al igual que observamos en las control. La densidad de volumen es similar al resto de tipos celulares y, comparado con las control, ocupa mayor volumen el de la célula tratada con sacarina. La densidad de superficie de la célula tipo I es similar a la célula tipo II y mayor que en la tipo III. Comparado este parámetro, La densidad de superficie del aparato de Golgi es ligeramente superior en las células tratadas con sacarina (Tablas y Gráficos 7 y 8).

En las células tipo I se aprecia claramente el retículo endoplásmico rugoso, sus estructuras tubulares aparecen distribuidas por todo el citoplasma, al igual que ocurría en las células control. La densidad numérica es la menor de los tres tipos celulares en esta papila tratada con sacarina y similar a la densidad numérica observada en las células tipo I control. La densidad de volumen es la menor de los tres tipos celulares y muy similar al volumen ocupado por este orgánulo en la célula control (Tablas y Gráficos 11 y 12).

Las mitocondrias aparecen dispersas por todo el citoplasma (Tabla y Gráfico 18), la densidad de volumen es ligeramente superior al ocupado por las células tipo II y III de este tipo papilar tratado con el edulcorante. Este parámetro es muy similar en estas células control respecto a las tratadas con sacarina. La densidad numérica es muy similar entre los tres tipos celulares y es muy parecida a la obtenida para las mitocondrias de las células tipo I tratadas con sacarina (Tablas y Gráficos 9 y 10).

5.4.2.- Células tipo II.

5.4.2.1.-Papilas foliadas sacarina.

Las células tipo II se encuentran distribuidas irregularmente por la yema, tanto en las zonas centrales como periféricas, se extienden a lo largo de esta y rematan en cortas y escasas microvellosidades. Son células de contornos lisos y redondeadas como se constata por su densidad de volumen intermedia respecto a los otros dos tipos celulares, hallazgo significativamente estadístico y el mayor coeficiente de forma de los tres tipos celulares, siendo también significativamente estadístico (Tablas y Gráficos 1 y 2). Si comparamos estas células II sacarina con las tomadas como control podemos decir que estas ocupan un menor volumen y son más redondeadas que las control al tener una densidad de volumen menor que las control (con significación estadística) y un coeficiente de forma mayor. Este hecho vuelve a suponer un hito de especial importancia en este tipo celular por cuanto numerosos autores las describen como células grandes, con un núcleo redondo y que expresan todos los elementos de la cascada de transducción del sabor dulce, umami y amargo, incluyendo las familias de receptores del gusto T1R o T2R (para el amargo, dulce y umami) (Miyoshi *et al.*, 2001, Clapp *et al.*, 2004; Kinnamon y Vandenbeuch, 2009; Ohtubo y Yoshii, 2010), los componentes de transducción PLC β 2 y IP3R3 (Miyoshi *et al.*, 2001), y gustducina (Yang *et al.*, 2000; Finger 2005). Por tanto, y considerando sobre todo la reducción de la densidad de volumen, parece obvio pensar que esta funcionalidad se vería reducida.

Tanto el citoplasma como el núcleo presentan una apariencia general electrolúcida que destaca entre el resto de los elementos de la yema.

La densidad de volumen del núcleo es igual al encontrado para las células tipo III y mayor que para las tipo I (Tabla y Gráfico 3). En cuanto a la densidad de superficie (Tabla y Gráfico 4) podemos afirmar que es igual que el de las células tipo I y menor que el de las tipo III, siendo significativamente estadístico para los dos parámetros. Tanto la densidad de volumen como la densidad de superficie alcanzan mayores valores en las células tipo II de las papilas foliadas tratadas con el edulcorante objeto de estudio comparado con los controles, luego se podría decir que estos núcleos representarían un mayor volumen en la célula (posiblemente influenciado por la reducción significativa de la densidad de volumen celular observada en las tratadas con sacarina).

En las células tipo II encontramos el aparato de Golgi en posición perinuclear, La densidad de volumen es similar en los tres tipos celulares de este tipo papilar y la densidad de superficie es mayor que en las células tipo I y tipo III (Tablas y Gráficos 7 y 8). Comparado este orgánulo con los controles podemos decir que en las células tratadas con sacarina la densidad de volumen y de superficie son algo mayores.

El retículo endoplásmico rugoso (Tablas y Gráficos 11 y 12) se observa distribuido por todo el citoplasma igual a lo observado en las células control de este tipo papilar. La densidad numérica es mayor que en los otros dos tipos celulares en esta papila, lo mismo ocurre con la densidad de superficie. Al comparar la densidad numérica del retículo rugoso control con el de las células tratadas con sacarina se observa muchísimo mayor esta densidad numérica en las células tratadas con el edulcorante objeto de nuestro estudio, lo mismo ocurre con el parámetro de la densidad de superficie, siendo en ambos casos significativamente estadístico. Los datos de densidad numérica y densidad de superficie mucho más elevados del retículo endoplásmico rugoso en células tipo II tratadas con sacarina y significativamente estadísticos, respecto a lo encontrado en este mismo tipo celular control nos puede llevar a pensar que en estas células hay un mayor proceso de síntesis de sustancias, que en las control. A esto tendríamos que añadir los datos encontrados para el aparato de Golgi, sobre todo tras los estudios de diversos autores donde relacionan claramente las células receptoras tipo II con los sabores amargos, umamis y dulces (Roper, 2013; Yoshida *et al.*, 2006; Tomchik *et al.*, 2007; Dando *et al.*, 2012; Ohtubo, 2007; Nelson *et al.*, 2001).

Las mitocondrias en el tipo celular II son bastante redondeadas, su densidad de volumen es muy similar al encontrado en los otros dos tipos papilares y su densidad numérica es similar al del tipo celular I y menor al tipo III (Tablas y Gráficos 9 y 10). Las células tipo II tomadas como control presentan para las mitocondrias una densidad numérica y de volumen similar a la encontrada en las tratadas con sacarina, incluso las cifras son ligeramente inferiores en las control.

5.4.2.2.- Papilas fungiformes sacarina.

Estas células ofrecen poca resistencia al paso de electrones, lo que les da una apariencia clara que contrasta con la oscuridad de las células tipo I. La densidad de volumen es similar a la de las tipo I y mayor al ocupado por las tipo III (Tabla y Gráfico 1). El coeficiente de forma es mayor que el de los otros dos tipos celulares, siendo significativamente estadístico (Tabla y Gráfico 2). Esto apoya el aspecto más redondeado y de contornos lisos que observamos. Al comparar estos parámetros con los de las células tipo II tomadas como control podemos afirmar que la densidad de volumen es menor en las células tipo II tratadas con sacarina y que su coeficiente de forma es mayor, es decir son células que ocupan un menor volumen y de aspecto más redondeado. En cuanto a su significado, reiteramos lo mencionado en los mismos tipos celulares de las otras papilas.

En el núcleo se aprecia con cierta nitidez al menos un nucléolo y condensaciones de material nuclear. La densidad de volumen es similar en los tres tipos celulares y la densidad de superficie es la menor, menos invaginaciones, respecto a los tipos I y III, siendo estas observaciones estadísticamente significativas. Comparando estos parámetros de los núcleos tratados con el edulcorante con los de las células control, podemos decir que son muy similares (Tablas y Gráficos 3 y 4).

En estas células tipo II el aparato de Golgi se encuentra en posición perinuclear. La densidad de volumen para este orgánulo es intermedia respecto a los otros dos tipos celulares y su densidad de superficie es igual a la los tipos I y III (Tablas y Gráficos 7 y 8). Comparados estos parámetros de las células tipo II tratadas con el edulcorante artificial con los controles no se aprecian grandes variaciones, prácticamente iguales resultados en la densidad de volumen y la densidad de superficie, si bien mayor en las controles.

En este tipo celular el retículo endoplásmico rugoso (Tablas y Gráficos 11 y 12) está menos desarrollado con una densidad numérica y de superficie bajas, y comparando estos parámetros con los encontrados en las células tipo II control, podemos decir que

la densidad numérica y de superficie son ligeramente mayores en los controles. Distinto pues a lo observado en las papilas foliadas, si bien es cierto que en las yemas gustativas fungiformes el contenido citoplásmico es bastante diferente a los otros dos tipos celulares.

Las mitocondrias en este tipo papilar se encuentran aleatoriamente distribuidas por todas las regiones celulares, al igual que ocurre en el resto de papilas gustativas. La densidad de volumen ocupado en la célula es el mayor comparado con los otros tres tipos papilares, siendo significativamente estadístico, la densidad numérica también es la mayor en comparación con las células tipo I y III tratadas con sacarina. En el estudio comparativo con las control, apreciamos que la densidad de volumen y de superficie es menor en aquellas células tratadas con el edulcorante, esto presenta significación estadística.

5.4.2.3.- Papilas valladas sacarina.

Las células tipo II son células voluminosas y muy redondeadas, estas observaciones se comprueban por los datos de la densidad de volumen, que es igual a los de las células tipo I y mayores que las de las células tipo III, y el coeficiente de forma que es el mayor de los tres tipos celulares. Estos datos son significativamente estadísticos. Comparándolos con los de las células control podemos observar que en las tratadas con sacarina la densidad de volumen es menor y el coeficiente de forma es mayor (Tablas y Gráficos 1 y 2). Ocurre lo mismo que lo descrito en los otros tipos papilares siendo, por tanto, similar la discusión de estos resultados.

El núcleo suele estar situado en la zona basal de la célula y en él se distinguen uno o dos nucléolos y acúmulos de material nuclear adheridos a la parte interna de la membrana. La densidad de volumen de este es igual al observado en las células tipo III y mayor que en las tipo I, en cuanto al coeficiente de forma, las células tipo II ocupan un lugar intermedio respecto a los otros dos tipos celulares, estas afirmaciones son significativamente estadísticas (Tablas y Gráficos 3 y 4). Respecto al núcleo de las células tomadas como control podemos decir que no hay grandes cambios, estos dos parámetros son ligeramente inferiores en los núcleos de las células no tratadas.

El aparato de Golgi se encuentra en la región perinuclear, ocupa una densidad de volumen igual que en los otros dos tipos celulares y su densidad de superficie es menor respecto a lo encontrado en células tipo I y III (Tablas y Gráficos 7 y 8). Comparado con las células control, estos parámetros son mayores en las células tipo II

tratadas con sacarina, es decir el volumen ocupado por este orgánulo es mayor y es más anfractuoso en las células tratadas con el edulcorante artificial.

El retículo endoplásmico rugoso se distribuye aleatoriamente por el citoplasma (Tabla y Gráfico 19). La densidad de numérica es intermedia respecto a los otros dos tipos celulares de este tipo papilar y la densidad de superficie es la más alta (Tablas y Gráficos 11 y 12). Al comparar estos resultados con los de las células tipo II control se puede constatar que tanto la densidad numérica como la de superficie son mucho mayores en las células tipo II tratadas con la sacarina, siendo este último resultado estadísticamente significativo. Estos resultados son muy similares a los obtenidos para este orgánulo en las papilas foliadas y pueden apoyar la explicación dada.

A pesar de la marcada apariencia electrolúcida del tipo celular I, existe una gran variedad de orgánulos. Aleatoriamente distribuidas por el citoplasma se encuentran las mitocondrias. En este tipo papilar la densidad de volumen que ocupan y la densidad de superficie es intermedia en comparación con los otros dos tipos papilares. Al comparar estos parámetros con los de las mitocondrias de las células tomadas como control se advierten que son ligeramente inferiores los de las células tipo II de las papilas valladas tratadas con sacarina.

5.4.3.- Células tipo III.

5.4.3.1.- Papilas foliadas sacarina.

Las células tipo III son las menos numerosas, se extienden a lo largo de la yema pero concluyen antes de adentrarse al poro gustativo y carecen de las prolongaciones citoplasmáticas que observamos en los otros tipos celulares. Destaca la presencia de fibras nerviosas terminales en zonas próximas. Estas características son las mismas que apreciamos en las células tipo III de las papilas foliadas utilizadas como controles.

La densidad de volumen de este tipo celular tratado con sacarina es menor que el resto de tipos celulares y su coeficiente de forma intermedio, estos datos son significativos estadísticamente. Respecto a la comparación observada con las células tipo III control, podemos decir que las controles presentan una densidad de volumen mayor que la de las células tipo III tratadas con sacarina y el coeficiente de forma es mayor en las tratadas con el edulcorante. Es decir, las células tipo III tratadas con sacarina ocuparían un volumen menor y su aspecto sería más esférico que las control (Tablas y Gráficos 1 y 2).

De esta forma, y considerando las modificaciones antedichas, podemos suponer una afectación de la funcionalidad de estas células en los animales tratados con sacarina, ya que las células de tipo III expresan proteínas asociadas con la transmisión sináptica, canales dependientes de voltaje de Ca^{2+} , enzimas biosintéticas para la serotonina y GABA, y transportadores de captación para aminas biogénicas (Dvoryanchikov *et al.*, 2011). Por ello, las células tipo III han sido red denominadas como células presinápticas (DeFazio *et al.*, 2006). Además, parece que hay interacciones celulares entre las células tipo II y tipo III (Hayato *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2007; Romanov *et al.*, 2007), las cuales podrían verse afectadas a tenor de las modificaciones sufridas por ambos tipos celulares tanto en el coeficiente de forma como en la densidad de volumen en las células tratadas con sacarina. Redundando en ello, en estas células se da la expresión de la proteína sináptica de membrana SNAP25 (Yang *et al.*, 2000), así como la molécula de adhesión celular neural (NCAM) (Nelson y Finger, 1993), lo que se verá alterado si hay un cambio en la densidad de volumen y coeficiente de forma como el observado.

En cuanto al núcleo, la densidad de volumen de este es similar al de las células tipo II y mayor que el de las células tipo I, la densidad de superficie es mayor que en el resto de tipos celulares, estas afirmaciones son significativamente estadísticas (Tablas y Gráficos 3 y 4). Las características de los núcleos de aquellas células tratadas con sacarina son similares a las control, aunque hay que hacer mención a la densidad de superficie que es ligeramente superior en las células de las papilas con el aporte de sacarina por ser un dato estadísticamente significativo.

Las vesículas nucleodensas y las vesículas claras son los orgánulos diferenciadores de las células tipo III, esto es así en todos los tipos papilares. Ambas aparecen en zonas de contacto célula-fibra nerviosa (Tablas y Gráficos 13 a 16). Estas características son idénticas que las descritas para las células controles. En las células tipo III tratadas con sacarina se han observado en las tres regiones celulares (Tablas y Gráficos 20 y 21), situándose el 70% en la región peri e infranuclear. Comparando esta distribución con la de las tipo III utilizadas como control, podemos decir que es prácticamente similar. La densidad numérica de este orgánulo en las tipo III de las foliadas es la menor de los tres tipos papilares, al igual que su densidad de volumen. Comparando estos dos parámetros con los obtenidos en las células III de las papilas foliadas control, podemos decir que la densidad numérica y la densidad de volumen son ligeramente mayores en las papilas tratadas con el edulcorante artificial.

Las vesículas claras se encuentran exclusivamente en las células tipo III, en general son de menor tamaño que las vesículas nucleodensas. La distribución de las vesículas claras es proporcionada en las tres regiones celulares, diferente a lo observado en las control donde solo aparecen en la región infranuclear. La densidad numérica en este tipo papilar es muy similar a la obtenida en las papilas fungiformes y mayor que para las valladas, la densidad de volumen es parecida en los tres tipos papilares (Tablas y Gráficos 13 y 14). La comparación con la densidad numérica de las vesículas claras de las células controles nos indica que es mayor en aquellas tratadas con el edulcorante. En cuanto a la densidad de volumen se refiere, las vesículas claras ocupan un mayor volumen en la célula control que en las células tratadas con sacarina.

El aparato de Golgi (Tablas y Gráficos 7 y 8) en las células tipo III aparece normalmente en posición supranuclear. La densidad de volumen que ocupa es similar a la de los otros dos tipos celulares de esta papila y tiene una densidad de superficie intermedia. Comparando estos hallazgos con los de las células control podemos apreciar que el volumen que ocupa en la célula tratada con sacarina es mayor y que la densidad de superficie es muy similar.

Los túbulos correspondientes al retículo endoplásmico rugoso aparecen distribuidos aleatoriamente por todo el citoplasma (Tablas y Gráficos 19). La densidad de numérica en las células tipo III de las papilas foliadas es la menor de los tres tipos celulares y la densidad de superficie es similar a la de las células tipo I y mucho menor que la encontrada para las tipo II (Tablas y Gráficos 11 y 12). Al confrontar estos resultados con los parámetros del retículo rugoso de las células control observamos que la densidad numérica y la de superficie son mayores en las células tipo III tratadas con sacarina en este tipo papilar.

Las mitocondrias en este tipo papilar presentan una densidad de volumen similar a la de los otros dos tipos papilares y una densidad numérica ligeramente superior. Cotejando estos datos con los obtenidos en este tipo celular tratado con el edulcorante artificial podemos observar que tanto la densidad de volumen como la numérica están más elevadas en las células de las papilas en las que hemos utilizado sacarina.

5.4.3.2.- Papilas fungiformes sacarina.

Son las células más escasas de la yema y están habitualmente rodeadas por las células tipo I de tal forma que estas les impiden el acceso al poro gustativo por lo que terminan de forma truncada, sin prolongaciones citoplasmáticas. Son de aspecto

similar a las células tipo III de las papilas fungiformes utilizadas como control. La densidad de volumen de las células tratadas con el edulcorante artificial es el más pequeño y su coeficiente forma es intermedio respecto a los otros tipos celulares (Tablas y Gráficos 1 y 2). Comparando estos parámetros obtenidos con los mismos de las células control observamos que el volumen que ocupan las control es mayor que las tratadas con el edulcorante y que el coeficiente de forma es mayor para las células tipo III sacarina, estas dos aseveraciones son estadísticamente significativas. Es decir, aparece una modificación significativa de estos parámetros en las células tratadas con sacarina lo que ha de afectar a la funcionalidad asignada a las mismas, ya que, como hemos mencionado anteriormente, las tipo III expresan proteínas asociadas con la transmisión sináptica, canales dependientes de voltaje de Ca^{2+} , enzimas biosintéticas para la serotonina y GABA, y transportadores de captación para aminas biogénicas así como la molécula de adhesión celular neural (NCAM) (Nelson y Finger, 1993; Yang *et al.*, 2000; Dvoryanchikov *et al.*, 2011); presentando interacciones celulares con las células tipo II (Hayato *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2007; Romanov *et al.*, 2007), las cuales podrían verse afectadas a tenor de las modificaciones sufridas por ambos tipos celulares tanto en el coeficiente de forma como en la densidad de volumen en las células tratadas con sacarina.

El núcleo presenta condensaciones de cromatina adheridas a la membrana interna y nucléolos más o menos visibles entre el material nuclear, su aspecto observado a través del microscopio electrónico es muy similar al presentado por las células controles. La densidad de volumen del núcleo de las células tipo III tratadas con el edulcorante objeto de estudio es igual que para el resto de tipos celulares en esta papila y la densidad de superficie es la mayor, estas dos afirmaciones son significativamente estadísticas. Respecto a las controles la densidad de volumen es igual y la densidad de superficie es superior en las células tratadas con sacarina y esto tiene significación estadística (Tablas y Gráficos 3 y 4), lo que redundaría en la aparición de cambios citofisiológicos en las células tratadas con sacarina.

Las vesículas claras y nucleodensas forman parte del complejo de unión sináptica entre las células tipo III y terminales nerviosos. Al microscopio electrónico, la imagen de este complejo se completa con la existencia de engrosamientos electrodensos de la membrana citoplásmica en el punto de contacto con el terminal nervioso y la presencia en las proximidades de mitocondrias de aspecto alargado, idéntico aspecto que el observado en las células no tratadas. La distribución de las vesículas claras en las células III de este tipo papilar se reparte al 50% entre la región perinuclear y la intranuclear (Tabla y Gráfico 20). En las controles esta disposición es muy similar,

siendo más abundantes en la zona infranuclear, encontrándose en esta región hasta el 65% del total. La densidad numérica es igual que en foliadas y mayor que en valladas, y la densidad de volumen es igual para los tres tipos papilares (Tablas y Gráficos 13 y 14). Respecto a la comparación con los controles, podemos observar que la densidad numérica es algo mayor en las tratadas con el edulcorante y la densidad numérica es muy similar.

El aparato de Golgi que encontramos en estas células ocupa un volumen parecido al de las células tipo II y algo mayor que en las células tipo I (Tabla y Gráfico 7). En cuanto a la densidad de volumen es igual entre los tres tipos papilares de las papilas fungiformes (Tabla y Gráfico 9). Comparando los dos parámetros de este orgánulo entre células tipo III control y sacarina, comprobamos que estos tienen valores menores para las células tratadas con sacarina.

El retículo endoplásmico rugoso se encuentra dispuesto aleatoriamente en el citoplasma celular (Tabla y Gráfico 19); en este tipo papilar la densidad numérica es elevada en relación con los otros tipos celulares y la densidad de superficie es la mayor (Tablas y Gráficos 11 y 12). Cotejando los resultados de estos parámetros con los de los controles, podemos apreciar que tanto la densidad numérica como la densidad de superficie son más elevadas en las células tipo III donde hemos empleado sacarina, lo que volvería a representar un cambio citofisiológico en las células tratadas con sacarina.

Las mitocondrias se encuentran repartidas por todas las regiones de la célula (Tabla y Gráfico 18), aunque se observan en mayor número en las proximidades de los terminales nerviosos, lo mismo que ocurre en las células utilizadas como controles. Presentan la densidad de volumen y numérica menor de los tres tipos celulares de estas papilas (Tablas y Gráficos 9 y 10). Confrontando estos resultados con los obtenidos para este orgánulo en los controles podemos decir que las mitocondrias ocupan un mayor volumen y mayor densidad numérica en los controles que en las células tipo III donde ha intervenido la sacarina.

5.4.3.3.- Papilas valladas sacarina.

Las células tipo III son el tipo celular menos frecuente en el total de las células de las yemas de las papilas valladas. Su apariencia comparte características de las células tipo I y tipo II, al igual que se observa en las células controles. La densidad de volumen es menor que la de los otros dos tipos celulares en esta papila y su coeficiente de forma es intermedio, teniendo estas conclusiones significación estadística (Tablas y

Gráficos 1 y 2). Comparando con las células tipo III de los controles podemos decir que, la densidad de volumen es mayor en las células tipo III controles y el coeficiente de forma es mayor en las células tipo III sacarina. Esta observación se ha repetido para este tipo celular en los tres tipos de papilas, por lo que la discusión señalada antes vuelve a ser válida en este caso.

En el núcleo se observan nucléolos y condensaciones de material cromatínico junto a la membrana nuclear interna, la densidad de volumen es igual al de las células tipo II y mayor que el de las tipo I, su densidad de superficie es la mayor de los tres tipos celulares en esta papila (Tablas y Gráficos 3 y 4). Estas dos afirmaciones tienen significación estadística. Comparando con las células tipo III tomadas como control, podemos decir que son muy similares a las tratadas con sacarina. Las densidades de volumen de los núcleos son iguales y la densidad de superficie de las células tratadas con sacarina es ligeramente superior.

Las vesículas nucleodensas (Tabla y Gráfico 21) en este tipo papilar se encuentran repartidas proporcionalmente por todas las regiones del citoplasma y sobre todo en las áreas próximas a los terminales nerviosos. En las células tipo III de este tipo papilar utilizado como control, esta distribución varía, ocupando el 60% de estas vesículas la zona perinuclear y el resto ocupando la región supranuclear.

La densidad numérica y la densidad de volumen de este orgánulo en las células valladas es intermedio respecto a los otros dos tipos papilares (Tablas y Gráficos 15 y 16). Comparados con las papilas control, podemos decir que tanto la densidad numérica como la densidad de volumen son más elevadas en las células tratadas con sacarina que en las controles. Como ya hemos visto esto mismo ocurre en todos los tipos papilares.

En este tipo papilar la distribución de las vesículas claras en las células tipo III es mayoritariamente en la zona infranuclear (Tabla y Gráfico 20), tan solo un 25% estaría en disposición perinuclear, algo muy similar ocurre en las papilas valladas utilizadas como controles. La densidad numérica y de volumen ofrece características similares entre las controles y las tratadas con sacarina (Tablas y Gráficos 13 y 14).

El aparato de Golgi lo encontramos generalmente en posición supranuclear. La densidad de volumen es similar a los otros dos tipos papilares y la densidad de superficie es igual a la de las células tipo I y mayor que en las tipo II (Tablas y Gráficos 7 y 8). La comparación con los resultados de estos parámetros del aparato de Golgi en papilas valladas control nos demuestra que son muy similares.

Las formaciones correspondientes al retículo endoplásmico rugoso aparecen repartidas por todo el citoplasma (Tabla y Gráfico 19), al igual que ocurre con este orgánulo en las células control. Tiene una densidad de volumen mayor que en el resto de los tipos células en este tipo papilar y una densidad de superficie intermedia (Tablas y Gráficos 11 y 12). Cotejando estos resultados con los obtenidos para el retículo rugoso de estas células control, podemos observar que la densidad de superficie es mayor en las tratadas con sacarina y la densidad numérica ligeramente superior. Esto se ha repetido en los tres tipos papilares y pondría de manifiesto un aumento en los procesos de síntesis en las células tipo III donde se ha empleado la sacarina.

Las mitocondrias en las células III de este tipo papilar ocupan una densidad de volumen muy parecido al de las células tipo II y algo menor que en las células tipo I (Tabla y Gráfico 9). La densidad numérica es similar en los tres tipos papilares. Confrontando estos resultados con los obtenidos en las células controles, podemos decir que son muy similares los resultados obtenidos en estos dos parámetros.

6.- CONCLUSIONES

1ª.- Nuestros resultados demuestran que en las yemas gustativas de las papilas linguales foliadas, fungiformes y valladas de la rata existe una tipificación celular con tres tipos celulares: I, II y III, los cuales se diferencian entre sí por presentar diferente morfología, electrodensidad u orgánulos específicos para cada tipo celular, con diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros morfométricos y estereológicos que definen estructuras comunes a los tres tipos celulares, tales como mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso y célula y núcleo en su conjunto. Esta misma tipificación celular es constatada en las yemas gustativas de los tres tipos papilares tratados con sacarina.

2ª.- Del estudio de los datos obtenidos en el nivel 1 se concluye, en términos generales, que las células tipo I son más alargadas, de contornos irregulares y electrodensas. Las células tipo II son las más redondeadas, de contornos más regulares y las más claras, mientras que las células tipo III están en una situación intermedia.

Por su parte, la densidad de volumen de las células tipo I es muy similar a la de las células tipo II, mientras que las tipo III representan un volumen relativo menor.

3ª.- En general, podemos afirmar que en las células de los individuos a los que se les ha aplicado una dieta rica en sacarina presentan en todos los tipos celulares una densidad de volumen menor y un coeficiente de forma mayor, sin presentar modificaciones importantes en los parámetros estudiados en los núcleos celulares. Esto lo podríamos traducir en que las células sometidas al edulcorante artificial objeto de nuestro estudio ocupan un menor volumen y adoptarían una forma de contornos más redondeados lo que ha de afectar a la citofisiología de las mismas.

4ª.- Del estudio ultraestructural emprendido en el nivel 2, constatamos que las células tipo I están caracterizadas principalmente por la abundante presencia de gránulos densos, especialmente en la región supranuclear, existiendo diferencias patentes entre los tres tipos papilares (en papilas foliadas y fungiformes disposición apical y perinuclear mientras que en valladas también en región infranuclear). Resalta también en este tipo celular el notable desarrollo del aparato de Golgi y de las estructuras correspondientes al retículo endoplásmico rugoso.

- 5ª.-** En las células tipo I de las papilas sometidas a sacarina podemos observar en el nivel 2 que los gránulos densos presentan diferente distribución respecto a los controles, de forma que en papilas foliadas y valladas aparecen en las tres regiones celulares y en las valladas solo en disposición supranuclear.
- 6ª.-** En las células tipo II -responsables de la transducción del sabor dulce de edulcorantes- se presenta una abundante presencia de mitocondrias, destacando en las células tipo II de las papilas fungiformes. En este tipo celular sometido a sacarina observamos una menor cantidad de mitocondrias que, además, ocupan un menor volumen en todos los tipos papilares. En contrapartida, se observa un importante desarrollo de las estructuras del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico rugoso en los tipos papilares de foliadas y valladas tratadas con sacarina, lo que denota una modificación citológica en las células de animales alimentados con sacarina.
- 7ª.-** En el estudio del nivel 2 de las células tipo III se verifica la presencia de vesículas nucleodensas y vesículas claras como orgánulos característicos de este tipo papilar, presentando una densidad numérica más elevada, de ambas, en las células tipo III de las papilas fungiformes. En este tipo papilar las estructuras del aparato de Golgi ocupan un mayor volumen en las células tipo III y presentan una densidad de superficie mucho más elevada que en el resto de tipos papilares.
- 8ª.-** En las células tipo III tratadas con sacarina se objetiva claramente un aumento de la densidad de volumen y densidad numérica de las vesículas nucleodensas en comparación con las células tipo III utilizadas como controles, siendo más evidente en las papilas fungiformes. En cuanto a las vesículas claras se aprecia un aumento de la densidad numérica en los tres tipos papilares respecto a lo observado en las control.

En los tres tipos papilares de estas células el retículo endoplásmico rugoso ocupa un mayor volumen y presenta mayor densidad de superficie que el observado en las células control. Todo esto lo podríamos traducir en que en las células tipo III tratadas con sacarina hay un aumento de los procesos de síntesis, con un incremento de las vesículas claras y nucleodensas y, por tanto una mayor actividad sináptica. En todo caso, se confirma una alteración citológica de estas células consideradas como sinápticas.

7.- RESUMEN

Se ha realizado un estudio de las yemas gustativas de las papilas valladas, foliadas y fungiformes de la rata a partir de fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión. Se dividió a los individuos en dos grupos, uno control y otro sacarina. En este último se añadió a la dieta estándar la DDA de sacarina multiplicada por un factor de seguridad de 100. Las fotografías fueron analizadas mediante un sistema de análisis de imagen (Nikon NIS Elements v.3) a fin de realizar un estudio morfométrico y estereológico de las yemas gustativas de cada tipo papilar (células tipo I, tipo II y tipo III) y sus componentes (gránulos densos, aparato de Golgi, mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso, vesículas nucleodensas y vesículas claras).

Se establecieron dos niveles de estudio: nivel 1, en el que se analizan parámetros correspondientes a las células en conjunto y al núcleo (densidad de volumen, DV; coeficiente de forma, CF; y densidad de superficie, DS). En el nivel 2 se consideraron la densidad de volumen (DV), la densidad de superficie (DS) y la densidad numérica (DN) correspondientes a los orgánulos celulares antedichos.

Con todos los datos obtenidos en estos dos niveles de trabajo se realizó un análisis estadístico comparando entre sí los parámetros de los distintos tipos celulares de una misma papila, entre los mismos tipos celulares de diferentes papilas y entre los mismos tipos celulares de las mismas papilas y sus correspondientes tratados con sacarina.

Nuestros resultados demuestran que en las yemas gustativas de las papilas linguales foliadas, fungiformes y valladas de la rata existe una tipificación celular con los tres tipos celulares básicos, I, II y III. Se diferencian entre sí por presentar diferente morfología, electrodensidad u orgánulos específicos para cada tipo celular. Además, presentan diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros morfométricos y estereológicos que definen estructuras comunes a los tres tipos celulares. (mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso y célula y núcleo en su conjunto).

Esta misma tipificación celular es constatada en las yemas gustativas de los tres tipos papilares tratados con sacarina.

Del estudio de los datos obtenidos en el nivel 1 se concluye, en términos generales, que la densidad de volumen de las células tipo I es muy similar al de las células tipo II y las tipo III serían más pequeñas. Las células tipo I son más alargadas, de contornos irregulares y electrodensas. Las células tipo II son las más redondeadas, de contornos más regulares y las más claras, mientras que las células tipo III están en una situación intermedia.

En general, podemos afirmar que en las células de los individuos a los que se les ha aplicado una dieta rica en sacarina presentan en todos los tipos celulares, de las distintas papilas gustativas, una densidad de volumen menor y un coeficiente de forma mayor, sin presentar modificaciones importantes en los parámetros estudiados en los núcleos celulares. Esto lo podríamos traducir en que estas células sometidas al edulcorante artificial objeto de nuestro estudio ocuparían un menor volumen, y adoptarían una forma de contornos más redondeados, lo que ha de afectar a la citofisiología de las mismas.

Del estudio ultraestructural emprendido en el nivel 2, constatamos que las células tipo I están caracterizadas principalmente por la abundante presencia de gránulos densos, especialmente en la región supranuclear, existiendo diferencias patentes entre los tres tipos papilares (en papilas foliadas y fungiformes disposición apical y perinuclear, en valladas también en región infranuclear). Resalta también en este tipo celular el notable desarrollo del aparato de Golgi y de las estructuras correspondientes al retículo endoplásmico rugoso.

En las células tipo I de las papilas sometidas a sacarina podemos observar en este nivel 2, como diferencias respecto a los controles, que los gránulos densos presentan diferente distribución (en papilas foliadas y valladas en las tres regiones celulares y en las valladas solo en disposición supranuclear). En general, las estructuras del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico rugoso son menos abundantes y están menos desarrolladas.

En las células tipo II se manifiesta una abundante presencia de mitocondrias ocupando el citoplasma celular, destacando en las células tipo II de las papilas fungiformes. En este tipo celular -responsables de la transducción del sabor dulce de edulcorantes- sometido a sacarina observamos una menor cantidad de mitocondrias y ocupando menor volumen en todos los tipos papilares. En contrapartida, se observa un importante desarrollo de las estructuras del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico rugoso en los tipos papilares de foliadas y valladas.

En el estudio del nivel 2 de las células tipo III se verifica la presencia de vesículas nucleodensas y vesículas claras como orgánulos característicos de este tipo papilar, presentando una densidad numérica más elevada, de ambas, en las células tipo III de las papilas fungiformes. En este tipo papilar las estructuras del aparato de Golgi ocupan un mayor volumen en las células tipo III y presentan una densidad de superficie mucho más elevada que en el resto de tipos papilares.

En las células tipo III tratadas con sacarina se objetiva claramente un aumento de la densidad de volumen y densidad numérica de las vesículas nucleodensas comparando este parámetro con las células tipo III utilizadas como controles, siendo más evidente en las papilas fungiformes. En cuanto a las vesículas claras se aprecia un aumento de la densidad numérica en los tres tipos papilares respecto a lo observado

en las control. En las células tipo III donde se ha empleado sacarina no se aprecian variaciones en el aparato de Golgi, pero sí podemos confirmar que en los tres tipos papilares el retículo endoplásmico rugoso ocupa un mayor volumen y presenta mayor densidad de superficie que el observado en las células control. Con estos datos podríamos inferir que en las células tipo III tratadas con sacarina hay un aumento de los procesos de síntesis, con un aumento de las vesículas claras y nucleodensas y, por lo tanto, una mayor actividad sináptica. En todo caso, se confirma una alteración citológica de estas células consideradas como sinápticas.

8.- BIBLIOGRAFIA

- Adler E, Hoon MA, Mueller KL, Chandrashekar J, Ryba NJ, Zuker CS (2000). A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 100: 693–702.
- Akabas MH (1990). Mechanisms of chemosensory transduction in taste cells. *Int. rev. Neurobiol.* 32: 241-279.
- Akabas M, Dodd J, Al-Awqati Q (1990). Identification of electrophysiologically distinct subpopulations of rat taste cells. *J. Membrane Biol* 114: 71-78.
- Akisata T (1980). Morphological and functional aspects of de rat taste bud by mens of electron microscope. *J. Osaka. Dent. Univ.* 14: 1-28.
- Akisata T, Oda M (1978). Taste buds in the vallate papillae of d rat studied with frezze fracture preparation. *Arch. Histol. Jap.* 41: 87-98.
- Al'Absi M, Nakajima M, Hooker S, Wittmers L, Cragin T (2012). Exposure to acute stress is associated with attenuated sweet taste. *Psychophysiology* 49: 96-103.
- Allen GV, Saper CB, Hurley KM, Cechetto DF (1991). Organization of visceral and limbic connections in the insular cortex of the cat. *J Comp. Neurol.* 311: 1–16.
- Arvidson K (1976). Scanning electron microscopy of fungiform papillae on the tongue of man and monkey. *Acta Otolaringol.* 81: 496-502.
- Arvidson K, Cottler-Fox M, Friberg V (1981). Fine structure of taste buds in the human fungiform papillae. *Scand Dent.Res.* 89:297-306.
- Askar A (1988). A review on sweeteners. *Ernahrung/Nutrition.* Vol 12.: 706-712.
- Avenet P, Hofmann F, Lindemann B (1988). Transduction intaste receptor cells requires cAMP-dependent protein kinase. *Nature.*331: 351-354.
- Barlow LA, Northealt RG (1995). Embryonic origin of amphibian taste bud. *Dev. Biol.* 169: 273-285.
- Bartel DL, Sullivan SL, Lavoie EG, Sevigny J, Finger TE (2006). Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is the ecto-ATPase of type I cells in taste buds. *J. Comp. Neurol.* 497: 1-12.
- Beidler LM (1969). Inervation of rat fungiform papillae. En. *Proccedings of the Third International Symposium on Olfation andTaste, New York, 1968* Vol. 2 pp. 352-369.
- Beidler LM, Nejad MS, Smallman RL, Takeda M (1960). Rat taste cell proliferation. *Federation Proc.* 19: 302.

- Beidler LM, Smallman R (1965). Renewal of cells within taste bud. *J. Cell Biol.* 27: 262-272.
- Black RM, Tanaka PA, Leiter LA, Anderson GH (1991). Soft drinks with aspartame: Effect on subjective hunger, food selection, and food intake of young adult males. *Physiol. Behav.* 45:387-395.
- Black RM, Leiter LA, Anderson GH (1993). Consuming aspartame with and without taste: Differential effects on appetite and food intake of young adult males. *Physiol. Behav.* 53: 459-466.
- Bloom W, Fawcett W (1983). *Tratado de Histología*. Ed. Labor, Barcelona.
- Blundell JE, Hill AJ (1986). Paradoxical effects of and intense sweetener (aspartame) on appetite. *Lancet* 1: 1902-1903.
- Boolootian RA (1976). *Elements of Human Anatomy and Physiology*. St Paul, Minn: West Publishing Co.
- Booth DA, Lee M, McAleavey C (1976). Acquired sensorial control of satiation in man. *Br. J. Psychol.* 67: 137-147.
- Bowen DJ, Grunberg NE (1990). Variations in food preference and consumption across the menstrual cycle. *Physiol. Behav.* 47: 287-291.
- Brala PM, Hagen RL (1983). Effects of sweetness perception and caloric value of a preload on short term intake. *Physiol. Behav.* 30:1-9.
- Brondel L, Jacquin A, Meillon S, Pénicaud L. (2013). Le goût: physiologie, rôles et dysfonctionnements. *Nutrition Clinique et métabolisme* 27: 123-133.
- Budavaris (1989). Ed. Merck index, 11th ed. Rahway, NJ: Merck & Co.
- Cabanac M, Duclaus R (1970). Specificity of internal signals in producing satiety for taste stimuli. *Nature* 227: 966-967.
- Canty DJ, Chan MM (1991). Effects of consumption of caloric vs. noncaloric sweet drinks on indices of hunger and food consumption in normal adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 1159-1164.
- Chamorro CA, De Paz P, Sandoval J, Fernández JG (1986). Comparative scanning electron microscopic study of the lingual papillae in two species of domestic mammals (*Equus caballus* and *Bos taurus*). 1. Gustatory papillae. *Acta Anat.* 125 (2): 83-87.

- Chamorro CA, J. Sandoval J, Fernández JG, Fernández M, De Paz P (1987). Estudio comparado de las papilas linguales del gato (*Felis Catus*) y del conejo (*Oryctolagus cuniculus*) mediante el microscopio electrónico de barrido. *Anat. Histol. Embriol.* 16: 37-47.
- Chamorro CA, De Paz P, Fernández JG, Anel L (1993). Fungiform papillae of the pig and wild boar analyzed by scanning Electron microscopy. *Scanning Microsc.* 7 (1): 313-322.
- Chandrashekar J, Mueller KL, Hoon MA, Adler E, Feng L, Guo W (2000). T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* 100: 703-11.
- Chandrashekar J, Hoon M, Ryba N, Zuker C (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444: 288-294.
- Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky DA, Hummler E, Ryba NJ (2010). The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature* 464: 297-301.
- Chaudhari N, Yang H, Lamp C, Delay E, Cartford C, Than T, Roper S (1996). The taste of MSG: membrane receptors in taste buds. *J. Neurosci.* 16: 3817-3826.
- Chaudhari N, Roper SD. (2010). The cell biology of taste. *J. Cell Biol.*, 190: 285-96
- Chen K, Yan J, Suo Y, Li J, Wang Q, Lv B (2010). Nutritional status alters saccharin intake and sweet receptor mRNA expression in rat taste buds. *Brain Research* 1325: 53-62
- Clapp TR, Medler KF, Damak S, Margolskee RF, Kinnamon SC. (2006). Mouse taste cells with G protein-coupled taste receptors lack voltage-gated calcium channels and SNAP-25. *BMC Biol.* 4:7.
- Clapp TR, Yang R, Stoick CL, Kinnamon SC, Kinnamon JC (2004). Morphologic characterization of rat taste receptor cells that express components of the phospholipase C signaling pathway. *J. Comp. Neurol.* 468: 311–21.
- Clauss K, Jensen H (1973). Oxathiazinone dioxides: A new group of sweetening agents. *Angew. Chem.* 12: 869-881.
- Cottler-Fox M, Arvidson K, Friberg V (1980). On the occurrence of dark and light cells in the fungiform taste buds. *J. Dent. Res.* 59: 1913.
- Coveñas R, Riñero J, Aguirre JA, Aijon J, López Campos JL (1982). Aplicación de las técnicas histoquímicas y convencionales a los cortes semifinos. *Morf. Normal Patol.* A.6: 209-217.
- Crook CK (1978). Taste perception in the new born infant. *Infant Behav. Dev.* 1: 52-69.

- Cummings TA, Delay RJ, Roper SD (1987). Ultrastructure of Apical specialization of taste cells in the mudpuppy, *Necturus maculosus*. *J. Comp. Neurol.* 261: 604-615.
- Dando R, Dvoryanchikov G, Pereira E, Chaudhari N, Roper SD (2012). Adenosine enhances sweet taste through A2B receptors in the taste bud. *Journal of Neuroscience* 32: 322-30.
- Dasgupta K, Singh A, Ireland WP (1990) Taste bud density on circumvallate and fungiform papillae of the bovine tongue. *Histol. Histopath.* 5: 169-172.
- De Lorenzo AJ (1958). Electron microscopic observation on the taste buds of the rabbit. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4: 143-150.
- De Lorenzo AJ (1963). Studies on the ultrastructure and Histophysiology of cell membranes, nerve fibers and synaptic junctions in chemoreceptors. En: *Olfaction and Taste*, pp. 5-17.
- DeFazio RA, Dvoryanchikov G, Maruyama Y, Kim JW, Pereira E, Roper SD (2006). Separate populations of receptor cells and presynaptic cells in mouse taste buds. *J. Neurosc.* 26: 3971-80.
- Delay RJ, Kinnamon JC, Roper SD (1986). Ultrastructure of mouse vallate taste buds: cell types and cell lineage. *J. Comp. Neurol.* 253: 242-252.
- Delay RJ, Taylor R, Roper SD (1993). Merkel-like basal cells in *Necturus* taste buds contain serotonin. *J. Comp. Neurol.* 335: 606-613.
- Desor J, Greene L, Maller O (1975). Preferences for sweet and salty in 9-to 15-year old humans. *Science* 190: 686-687.
- Dramane G, Akpona S, Besnard P, Khan N (2014). Cell mechanisms of gustatory lipids perception and modulation of the dietary fat preference. *Biochimie* 107: 11-14
- Dubois GE, Walters DE, Schiffman SS, Warwick ZS, Booth GE, Pecore SD, Gibes K., Carr BT, Brands LM (1991). Concentration-responses relationships of sweeteners: systematic study. In: Walters DE, Orthoefer FT, Dubois GE, eds. *Sweeteners: Discovery molecular design, and chemoreception*. ACS Symposium Series 405. Washington, DC: American Chemical Society: 1991: 261-276.
- Dvoryanchikov G, Sinclair MS, Perea-Martinez I, Wang T, Chaudhari N (2009) Inward rectifier channel, ROMK, is localized to the apical tips of glial-like cells in mouse taste buds. *Journal of Comparative Neurology* 517:spc1.

- Dvoryanchikov G, Huang YA, Barro-Soria R, Chaudhari N, Roper SD (2011). GABA, its receptors, and GABAergic inhibition in mouse taste buds. *J. Neurosci.* 31: 5782-91.
- Endo Y. (1988). Exocytotic release of neurotransmitter substances from nerve ending in the taste buds of the rat circumvallate papillae. *Arch. Histol. Jpn.* 51: 489-494.
- Epel E, Lapidus R, McEwen B, Brownell K (2001). Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. *Psychoneuroend.* 26: 37-49.
- Fantino M (2011). Nutritional and metabolic effects of intense sweeteners. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 46: 35-39.
- Fantino M, Hosote J, Apfelbaum M (1986). An opioid antagonist, naltrexone, reduces preferences for sucrose in humans. *Am. J. Physiol.* 251: R91-R96.
- Farbman AI (1965a). Fine structure of taste bud. *J. Ultrastruct. Res.* 12: 328-350.
- Farbman AI (1965b). Electron microscope study of the developing taste bud in rat fungiform papillae. *Develop. Biol.* 11: 110-135.
- Farbman AI (1967). Structure of chemoreceptors. En: *Symposium on Foods Chemistry and Physiology of Flavours*, pp. 25-51.
- Farbman AI (1969). Fine structure of degenerating taste buds after denervation. *JEEM* 22.
- Farbman AI, Yonkers JD (1971). Fine structure of the taste bud in the mudpuppy, *Necturus maculosus*. *Am. J. Anat.* 131: 353-370.
- Farbman AI (1980). Renewal of taste bud cells in rat circumvallate papillae. *Cell Tissue Kinet.* 13: 349-357.
- Farbman AI, Hellekant G, Nelson A (1985). Structure of taste buds in foliate papillae of the Rhesus Monkey. *Macaca mulata*. *Amer. J. Anat.* 172: 41-56.
- Farbman AI, Mbiene JP (1991). Early development and innervation of taste bud bearing papillae on the rat tongue. *J. Comp. Neurol.* 304: 172-186.
- Faurion A, Saito S, McLeod P (1980). Sweet taste involves several distinct receptor mechanisms. *Chem. Senses.* 5: 107-121.
- Finger TE (2005). Cell Types and Lineages in Taste Buds. *Chem. Senses* 30 (suppl 1): i54-i55

- Fish HS, Malone PD, Richter CP (1994). The anatomy of tongue of the domestic Norway rat. I. The skin of the tongue; the various papillae; their number and distribution. *Anat. Rec.* 89: 429-440.
- Fitch C (2016). Saccharin-How Sweet It Is. Reference Module in Food Science, de Encyclopedia of Food and Health: 659-664.
- Fujimoto S (1973). On the Golgi-derived vesicles in the rabbit taste bud cells. Electron microscopy and related cytochemistry. *Kurume Med. J.* 20: 133-148.
- Fujimoto S, Murray RG (1970). Fine structure of the degeneration and regeneration in the denervated rabbit vallatae taste buds. *Anat. Rec.* 168: 393-413.
- Fujimoto S, Yakamoto K (1980). Electron microscopy of terminal buds on the Barbers of the silund fish *Corydorus paleatus*. *Anat. Rec.* 197: 133-141.
- Fujimoto S, Hueda H, Kagawa H (1987). Immunocytochemistré on the localization of 5-hydroxytryptamine in monkey and rabbit taste buds. *Acta Anat.* 128: 80-83.
- Fujimoto S, Yamamoto K, Yoshizuka M, Yokoyama M (1993). Pre- and postnatal development of Rabbit foliate papillae with special reference to foliate gutter formation and taste bud and serous gland differentiation. *Microsc. Res. Technique.* 26: 120-132.
- Fukushima S, Kurata Y, Shibata ,lkawa I, Ito N (1983). Promoting effect of sodium O-henylphenate and O-phenylphenol on two stage urinary bladder carcino- genesis in rats. *Gann* 74, 625
- Ganchrow D, Ganchrow JR, Goldstein RS (1991). Ultrastructure of palatal taste bud in the perihatching chick. *Am. J. Anat.* 192: 69-78.
- Ganchrow JR, Ganchrow D (1989). Long-term effects of gustatory neurectomy on fungiform papillae in the young rat. *Anat. Rec.* 225: 224-231.
- Ganchrow D, Ganchrow JR, Kinnamon JC (1994). Ontogenesis and taste bud cell turnover in the chicken. I. Gemmal cell renewal in the hatchling. *J. Comp. Neurol.* 345: 105-114.
- Gioglio L, Rapuzzi G, Dell'orbo C (1988). Fine structure of fungiform papilla in a ranid frog (*Rana esculenta*). *J. Morphol.* 195: 1-16.
- Glauert AM (1975). Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. Ed. Glauert AM. North Holland, Amsterdam.
- Gray EG (1975). Presynaptic microtubules and their association with synaptic vesicles. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)*. 190: 369-372.

- Gray EG, Wathins KC (1965). Electron microscopy of taste buds of the rat. *Z. Zellforsch.* 66: 583-595.
- Graziadei PPC (1973). En: *Ultrastructure of animal tissue and organs*, pp 267-284, North-Holland, Amsterdam.
- Green DE, Baum H (1970). *Energy and the mitochondrion*. New York: Academic Press.
- Guyton AC (1979). *Physiology of the Human Body*. Philadelphia Penn: Saunders College Publishing; 1979.
- Hall WG, Bryan TE (1981). The ontogeny of feeding in rats: IV. Taste development as measured by intake and behavioural responses to oral infusions of sucrose and quinine. *J. Comp. Physiol. Physiol.* 95: 240-251.
- Hanamori T, Smith DV (1989). Gustatory innervation in the rabbit: central distribution of sensory and motor components of the chorda tympani, glossopharyngeal, and superior laryngeal nerves. *J. Comp. Neurol.* 282: 1-14.
- Hayato R, Ohtubo Y, Yoshii K (2007). Functional expression of ionotropic purinergic receptors on mouse taste bud cells. *J. Physiol.* 584: 473-488.
- Hegenbart S (1992). Flavor enhancement: making the most of what's There. *Food Product Desing.* February: 56-58, 60, 65, 66, 69, 70.
- Hellekant G, Kasahara Y, Harada S, Grassl M, Hard C (1987). Stability of fungiform papilla patterns in rats. *Chemical Senses.* 12: 411-415.
- Hellekant G, Hladik CM, Dennys V, Simmen B, Roberts TW, Glaser D, Dubois G, Walters DE (1993). On the sense of taste in two malagasy primates (*Microcebus murinus* and *Eulemur mongoz*). *Chemical Senses.* 18: 307-320.
- Herrero A (1998). Análisis ultraestructural de las yemas gustativas de rata. Tesis doctoral. Universidad de León.
- Hirata K, Nada O (1975). A monoamine in the gustatory cell of the frog's taste organ. A fluorescence histochemical and electron microscopic study. *Cell. Tiss. Res.* 159: 101-108.
- Holland VF, Zampighi GA, Simon SA (1991). Tight junction in taste buds: possible role in perception of intravascular gustatory stimuli. *Chemical senses.* 16: 69-79.
- Hoogveen H, Dalenberg J, Renken R, Ter Horst G, Lorist M (2015). Neural processing of basic tastes in healthy young and older adults- an fMRI study. *Neuroimage* 119: 1-12

- Hosley MA, Oakley B (1987). Postnatal development of the vallate papilla and taste buds in rats. *Anat. Rec.* 218: 216-222.
- Huang, YJ, Maruyama Y, Dvoryanchikov G, Pereira E, Chaudhari N, Roper SD (2007). The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell–cell communication in mouse taste buds. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104: 6436-6441.
- Huang YA, Maruyama Y, Roper SD (2008). Norepinephrine is correlated with serotonin in mouse taste buds. *J. Neurosci.* 28: 13088-93.
- Huang YA, Pereira E, Roper SD (2011). Acid stimulation (sour taste) elicits GABA and serotonin release from mouse taste cells. *PLoS ONE* 6: e25471.
- Ide C, Munger BL (1980). The citologic composition of primate laryngeal chemosensory corpuscles. *Am. J. Anat.* 158: 193-209.
- Ileri-Gurel E, Pehlivanoglu B, Dogan M (2013). Effect of acute stress on taste perception: in relation with baseline anxiety level and body weight. *Chem. Senses* 38: 27-34.
- Iwasaki S (1992). Fine structure of the dorsal lingual epithelium of the crab-eating monkey, *Macaca irus*. *Ann. Anat.* 174: 523-529.
- Iwasaki S, Yoshizawa H, Kawahara I (1996). Study by scanning electron microscopy of the morphogenesis of three types of lingual papillae in the mouse. *Acta Anat.* 157: 41-52.
- Iwasaki S, Yoshizawa H, Kawahara I (1997). Study by scanning electron microscopy of the morphogenesis of three types of lingual papillae in the rat. *The Anatomical Record.* 247: 528-541.
- Jacobs HL (1964). Observations on the ontogeny of saccharine preference in the neonate rats. *Psychon. Sci.* 1: 105-106.
- Jahnke K, Baur P (1979). Freeze fracture study of taste bud pores in the papillae on the rabbit. *Cell Tissue Res.* 200: 245-256.
- Kapsimalia M, Barlowd L (2013). Developing a sense of taste. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 24: 200-209
- Kataoka S, Yang R, Ishimaru Y, Matsunami H, Seigny J, Kinnamon JC, Finger TE (2008). The candidate sour taste receptor, PKD2L1, is expressed by type III taste cells in the mouse. *Chem. Senses* 33: 243-254.
- Kim SD, Dubois GE (1991). Natural high potency sweeteners. In: Marie S y Piggott JR. *Handbook of sweeteners*. Glasgow: Blackie. 1991: 116-185.

- Kim DJ, Roper SD (1995). Localization of serotonin in taste buds: a comparative study in four vertebrates. *J. Comp. Neurol.* 353: 364-370.
- Kimura K, Ohtubo Y, Kumazawa T, Yoshii K (2007). Electrophysiological identification of mouse taste bud cells. *International Congress Series 1301*: 254-257.
- Kimura K, Ohtubo Y, Tateno K, Takeuchi K, Kumazawa T, Yoshii K (2013). Cell-type-dependent action potentials and voltage-gated currents in mouse fungiform taste. *Eur. J. Neurosci.* 39 24–34.
- Kinnamon SC (1988). Taste transduction: a diversity of mechanisms. *Trends Neurosci.* 11: 491-496.
- Kinnamon S (2012). Taste receptor signaling-- from tongues to lungs. *Acta Physiol.* 204: 158-168
- Kinnamon JC, Taylor BJ, Delay RJ, Roper SD (1985). Ultrastructure of mouse vallate taste buds: I. Taste cells and their associated synapses. *J. Comp. Neurol.* 235: 48-60.
- Kinnamon JC, Sherman TA, Roper SD (1988). Ultrastructure of mouse vallate taste buds: III. Patterns of synaptic connectivity. *J. Comp. Neurol.* 270: 1-10.
- Kinnamon SC, Cummings TA (1992). Chemosensory transduction mechanisms in taste. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 715-731.
- Kinnamon JC, Henzler DM, Royer SM (1993). HVEM ultrastructural analysis of mouse fungiform taste buds, cell types and associated synapses. *Microsc. Res. Technique.* 26: 142-156.
- Kinnamon SC, Margolskee RF (1996). Mechanisms of taste transduction. *Current Opinion in Neurobiology.* 6: 506-513.
- Kinnamon SC, Vandenbeuch A (2009). Receptors and transduction of umami taste stimuli. *Ann. NY Acad. Sci.* 1170: 55–59.
- Kusakabe, Y., Miura, H., Hashimoto, R., Sugiyama, C., Ninomiya, Y. and Hino, A. (2002). The neural differentiation gene Mash-1 has a distinct pattern of expression from the taste reception-related genes gustducin and T1r2 in the taste buds. *Chem. Senses* 27: 445-451.
- Lawton, D.M., Furness, D.N., Lindemann, B. and Hackney, C.M. (2000). Localization of the glutamate–aspartate transporter, *glast*, in rat taste buds. *Eur. J. Neurosci.* 12: 3163-3171.
- Leydig F (1851). Ueber die Haut einiger Susswasserfische. *Zeitschr. Wiss. Zool.* 3: 1-12.

- Li X, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M, Adler E (2002). Human receptors for sweet and umami taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 4692-6.
- Lindemann B (2001). Receptors and transduction in taste. *Nature* 413: 219–25.
- Lipsitt LP, Behi G (1990). Taste-mediated differences in the sucking behaviour of human new-borns. In: Capaldi ED y Powley TL eds. *Taste, experience, and feeding*. Washington DC: American Psychological Association. 75-93.
- Looy H, Weingarten HP (1991). Effects of metabolic state on sweet taste reactivity in humans depend on underlying response profile. *Chem. Senses*. 16: 123-130.
- Looy H, Callaghan S, Weingarten HP (1992). Hedonic response of sucrose likers and dislikers to other gustatory stimuli. *Physiol. Behav.* 52: 219-225.
- Lopez-Espinoza A, Martinez Moreno AG, Zepeda Salvador AP, Aguilera Cervantes G (2013). Effect of early exposure to sucralosa on fluid intake in rats. *Revista Mexicana de Trastornos Alimentarios* 4, 2: 116-123.
- Lyman B (1989). *A Psychology of Food: More Than A Matter of Taste*. New York, NY: Van Nostrand Reinhold.
- Mack A, Singh A, Gilroy C, Ireland W (1977). Porcine lingual taste buds: a quantitative study. *The Anatomical Record*. 247: 33-37.
- Margolskee RF (1993). The molecular biology of taste transduction. *BioEssay*. 15: 645-650.
- Matess R (1990a). Hunger ratings are not a valid proxy measure of reported food intake in humans. *Appetite* 15: 103-113.
- Matsumoto I, Ohmoto M, Abe K (2013). Functional diversification of taste cells in vertebrates. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 24: 210-214
- Maxwell MH (1978). Two rapid and simple methods used for the removal of resins from 1 micra thick epoxy sections. *Jo. Microsc.* 112: 253-255.
- Mbiene JP, Farbman AI (1993). Evidence for stimulus access to taste cells and nerves during development: an electron microscopy study. *Microsc. Res Technique*. 26: 94-105.
- McGee H (1984). *On Food and Cooking*. New York, NY: Charles Scribner's Sons.
- Miller RL, Chaudhry AP (1976a). An ultrastructural study on the development of vallate taste bud of the golden Syrian hamster. *Acta Anat.* 95: 190-206.

- Miller RL, Chaudhry AP (1976b). Comparative ultrastructure of vallate, foliate and fungiform taste buds of Golden Syrian hamster. *Anat.* 95: 75-92.
- Miller IJ, Reedy FE (1990). Quantification of fungiform papillae and taste pores in living human subjects. *Chemical Senses.* 15: 281-294.
- Mistretta CM (1989). Anatomy and neurophysiology of the taste system in aged animals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 561: 277-290.
- Mistretta CM, Baum BJ (1984). Quantitative study of taste buds in fungiform and circumvallate papillae of young and aged rats. *J. Anat.* 138: 323-332.
- Mistretta CM, Oaklet IA (1986). Quantitative study of taste buds in fungiform papillae of young aged rats. *J. Gerontol.* 41: 315-318.
- Miura H, Kusakabe Y, Kato H, Miura-Ohnuma J, Tagami M, Ninomiya Y, Hino A (2003). Co-expression pattern of Shh with Prox1 and That of Nkx2.2 with Mash1 in mouse taste bud. *Gene Expr. Patterns* 3: 427-430.
- Miura H, Kusakabe Y, Hashido K, Hino A, Ooki M, Harada S (2014) The glossopharyngeal nerve controls epithelial expression of Sprr2a and Krt13 around taste buds in the circumvallate papilla. *Neuroscience Letters* 580: 147-152
- Miyoshi MA, Abe K, Emori Y (2001). Ip(3) receptor type 3 and Plcbeta2 Are co-expressed with taste receptors T1r and T2r in rat taste bud cells. *Chem. Senses* 26: 259-265.
- Mombaerts P (2004). Odorant receptor gene choice in olfactory sensory neurons: the one receptor-one neuron hypothesis revisited. *Current Opinion in Neurobiology* 14: 31-6.
- Mueller KL, Hoon MA, Erlenbach I, Chandrashekar J, Zuker CS, Ryba NJP (2005). The receptors and coding logic for bitter taste. *Nature* 434: 225-9.
- Murata Y, Yasuo T, Yoshida R, Obata K, Yanagawa Y, Margolskee RF, Ninomiya Y (2010). Action potential-enhanced ATP release from taste cells through . *J. Neurophysiol.* 104: 896-901.
- Murray RG (1971). Ultrastructure of taste receptors. En L.M. Beidler (ed.) *Handbook of sensory Physiology. Chemical Senses, Vol. 2. taste* New York: Springer-Verlang, pp. 31-50.
- Murray RG (1973). The ultrastructure of taste buds. En I. Friedemann (ed.) *The ultrastructure of sensory orgasm.* Amsterdam, North Holland, pp. 1-81.

- Murray RG (1986). The mammalian taste bud type III cell: a critical analysis. *J. Ultrastr. Mol. Str. Res.* 95: 175-188.
- Murray RG (1993). Cellular relations in mouse circumvallate taste buds. *Microsc. Res. Technique.* 26: 209-224.
- Murray RG, Murray A, Fujimoto S (1969). Fine structure of gustatory cells in rabbit taste buds. *J. Ultrastruc. Res.* 27: 444-461.
- Murray RG, Murray A (1970). The anatomy and ultrastructure of taste endings. En: *Ciba Foundation Symposium on Taste and Smell in Vertebrates*, pp. 3-30.
- Murray RG, Murray A (1976). Fine structure of taste buds of rabbit foliate papillae. *J. Ultrastruc. Res.* 19:327.
- Nada O, Hirata K (1975). The occurrence of the cell type containing a specific monoamine in the taste bud of the rabbit's foliate papilla. *Histochemistry.* 43: 237-240.
- Nada O, Hirata K (1976). Pharmaco-histochemical studies on a specific monoamine in the gustatory epithelia of the rabbit. *Histochemistry.* 50: 111-117.
- Nada O, Hirata K (1977). The monoamine-containing cell in the gustatory epithelium of some vertebrates. *Arch. Histol. Jap.* 40 (suppl.): 197-206.
- Nada O, Komatsu K (1983). Immunohistochemical observations on the serotonin-containing cells in the taste buds of the Rabbit. *Acta Anat. Nippon.* 58: 311A.
- Nancy KD (1992). Saccharin's aversive taste in rats: Evidence and Implications. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* Los Angeles USA. Vol. 17, pp. 359-372.
- Nelson GM, Finger TE (1993) Immunolocalization of different forms of neural cell adhesion molecule (NCAM) in rat taste buds. *J. Comp. Neurol.* 336: 507-516.
- Nelson GM, Hoon M, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba N, Zuker C (2001). Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106: 381-390.
- Nelson GM, Chandrashekar J, Hoon M, Feng L, Zhao G, Ryba N, Zuker C (2002). An amino-acid taste receptor. *Nature* 416: 199-202.
- Nemetschek-Gansler H, Ferner H (1964). Uberdie ultrastruktur der geschmacksknospen. *Z. Zellforsch.* 63: 155-178.
- Nizhnikov ME, Petrov ES, Varlinskaya EI, Spear NE (2002). Newborn rats' first suckling experience: Taste differentiation and suckling plasticity. *Physiology & Behavior* 76: 181-198.

- Nordmann HJ (1991). Will the new EC guideline on sweeteners lead to new nutritional awareness? FO Licht, Jahrbuch. 1991: 9-10.
- Nowlis GH, Kessen W (1976). Human newborns differentiate differing concentrations of sucrose and glucose. Science 191: 865-866.
- Núñez-Jaramilo L, Ramírez-Lugo L, Herrero-Morales W, Miranda M. (2010). Taste memory formation: Latest advances and challenges. Behavioral Brain Research 207: 232-248.
- Oakley B (1972). The role of taste neurons in the control of the structure and chemical specificity of mammalian taste receptors. En: D. Schneider (ed.) Olfaction and Taste IV, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MBM, pp. 63-69.
- Oakley B (1993). The gustatory competence of the lingual epithelium requires neonatal innervation. Developmental Brain Research. 72: 259-264.
- Ohmura S, Horimoto S, Fujita K (1989). Lectin cytochemistry of the dark granules in the type I cells of Syrian hamster circumvallate taste buds. Arch. Oral. Biol. 34: 161-166.
- Ohtubo Y (2007). Quantitative study on cell types in adult mouse taste buds. International Congress Series 1301: 250-253.
- Ohtubo Y, Yoshii K (2010). Quantitative analysis of taste bud cell numbers in fungiform and soft palate taste buds of mice. Brain Res. 1367: 13-21.
- Ohtubo, Y, Yoshii, K (2011). Quantitative analysis of taste bud cell numbers in fungiform and soft palate taste buds of mice. Brain Res. 1367: 13-21
- Olsted JMD (1920). The nerve as a formative influence in the development of taste buds. J. Comp. Neurol. 31: 465-468.
- Pai M, Ko T, Chou H (2007). Effects of streptozotocin-induced diabetes on taste buds in rat vallate papillae. Acta histochem. 109: 200-207.
- Paran N, Mattern CF, Henkin RI (1975). Ultrastructure of the taste bud of the human fungiform papilla. Cell. Tiss. Res. 161: 1-10.
- Parker M, Feng D, Chamuris B, Margolskee R (2014). Expression and nuclear translocation of glucocorticoid receptors in type 2 taste receptor cells. Neuroscience Letters 571: 72-77.
- Pastor JF, Moro JA, Verona JA, Gato A, Represa JJ, Barbosa E (1993). Morphological study by scanning electron Microscopy of the lingual papillae in the common European bat. (*Pipistrellus pipistrellus*). Arch. Oral. Biol. 38: 597-599.

- Pumplin DW, Chengsi Y, Smith DV (1997). Light and dark cells of rat vallate taste buds are morphologically distinct cell types. *J. Comp. Neurol.* 378: 389-410.
- Qiao L, Lihua J, Guangchang P, Junbo X (2015). A novel pungency biosensor prepared with fixing taste-bud tissue of rats. *Biosensors Bioelectronics* 68: 454-461.
- Qin Y, Shi J, Zhang G, Deng S, Wang T (2010). A reliable method to obtain cells of taste buds from fungiform papillae of mice. *Acta histochemica* 112: 107-112
- Ramirez I (1990). Why do sugars taste good? *Neurosci. Biobehad. Rev.*, 1. 14: 125-134.
- Reynolds JEF (1989). Ed. Martindale the extra pharmacopoeia 29th ed. London: The Pharmaceutical Press.
- Roach M (1989). Accounting for taste. *Hippocrates*. November-December: 49-54.
- Rogers PJ, Blundell JE (1989). Separating the actions of sweeteners and calories: effects of saccharin and carbohydrates on hunger and food intake in human subjects. *Physiol. Behav.* 45: 1093-1099.
- Rogers PJ, Carlyle J, Hill AJ, Blundell JE (1988). Uncoupling sweet taste and calories. Comparison of the effects of glucose and three intense sweeteners on hunger and food intake. *Physiol. Behav.* 43: 547-552.
- Rogers PJ, Fleming HC, Blundell JE (1990). Aspartame ingest without tasting inhibits hunger and food intake. *Physiol. Behav.* 47: 1239-1243.
- Rolls BJ, Kim S, Federoff IC (1990). Effects of drinks sweetened with sucrose or aspartame on hunger, thirst and food intake in men. *Physiol. Behav.* 48: 19-26.
- Romanov RA, Bystrova MF, Rogachevskaya OA, Sadovnikov VB, Shestopalov VI, Kolesnikov SS. (2012). Dispensable ATP permeability of Pannexin 1 channels in a heterologous system and in mammalian taste cells. *Journal of Cell Science*. JCS online publication date 6 September 2012.
- Romanov RA, Rogachevskaja OA, Bystrova MF, Jiang P, Margolskee RF, Kolesnikov SS (2007). Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. *EMBO J.* 26: 657-667.
- Roper SD (1989). The cell biology of vertebrate taste receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 12: 329-353.
- Roper SD (2009) Parallel processing in mammalian taste buds? *Physiology & Behavior* 97: 604-608.

- Roper SD (2013) Taste buds as peripheral chemosensory processors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*: 71-79.
- Royer SM, Kinnamon JC (1988). Ultrastructure of mouse foliate taste buds: synaptic and nonsynaptic interactions between taste cells and nerve fibers. *J. Comp. Neurol.* 270: 11-24.
- Royer SM, 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.
- Rueda R (1991). Análisis estructural de las yemas gustativas por métodos morfométricos y estereológicos. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo.
- Ryotaro H, Tsutomu K, Mai M, Yoko H, Yoshitaka O, Takashi K, Kiyonori Y (2004) Cell-networks in mouse taste buds. *International Congress Series* 1269: 53– 56
- Sainz E, Korley JN, Battey JF, Sullivan SL (2001). Identification of a novel member of the T1R family of putative taste receptors. *J. Neurochem.* 77: 896-903.
- Scalzi HA (1967). The cytoarchitecture of gustatory receptors form the rabbit foliate papillae. *Zeitschrift für Zellforschung.* 80: 413-435.
- Schwalbe G (1867). Das epithel der papillar vallatae. *Arch. Mikrosk. Anat. En twichl.* 3: 504-508.
- Schiffman SS, Lindley MG, Clark TB, Markino C (1981). Molecular mechanism of sweet taste: Relationship of hydrogen bonding to taste sensitivity for both young and elderly. *Neurobiol. Aging.* 2:173-185.
- Schiffman SS, Reilly DA, Clark TB (1979). Qualitative differences among sweeteners. *Physio. Behav.* 23: 1-9
- Scott TR (1987). Coding in the gustatory system. In: Finger, T. E., ed. *Neurobiology of taste and smell.* New York: Jhon Wiley & Sons 355-378.
- Segovia C, Hutchinson I, Laing D, Jinks A (2002). A quantitative study of fungiform papillae and taste pore density in adults and children. *Develop Brain Res* 138: 135-146
- Serizawa S, Miyamichi K, Sakano H. (2004) One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system. *Trends in Genetics* 20: 648-53.
- Seta Y, Toyoshima YK (1995). Three-dimensional structure of the gustatory cell in the Mouse fungiform taste buds: a computer-assited reconstruction from serial ultrathin sections. *Anat. Embryol. Berl.* 191: 83-88.

- Seta Y, Harada H, Toyoshima K (1997). Isolation, partial purification, and ultrastructure of taste bud cells from rabbit foliate papillae. *Neurosci-Lett.* 227 (1): 61-64.
- Sigoillot M, Laffite A, Neiers F, Briand L (2015). Les inhibiteurs du gout sucré: perspectives thérapeutiques. Sweet taste inhibitors. *Cahiers de Nutrition et de Diét.*
- Simon DD, Liberman MC (1988). Afferent innervation of outer hair cells in adult cats: II. Electron microscopic analysis of fibers labelled with horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 270: 145-154.
- Simon SA, Roper SD (1993). Mechanisms of taste transduction. CRC Press, London.
- Sinclair M, Perea-Martinez I, Abouyared M, St. John S, Chaudhari N (2015) Oxytocin decreases sweet taste sensitivity in mice. *Physiology & Behavior* 141: 103-110.
- Stone LM, Finger TE, Tam PP, Tam SS (1995). Taste receptor cells rise from local epithelium, not neurogenic ectoderm. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 92: 1916-1920.
- Stone, L.M., Tan, S.S., Tam, P.P. and Finger, T.E. (2002) Analysis of cell lineage relationships in taste buds. *J. Neurosci.* 22: 4522-4529.
- Sugita M (2006). Taste perception and coding in the periphery. *Cell Mol Life Sci* 63: 2000-15.
- Sugita M, Yamamoto K, Hirono C, Shiba Y (2013) Functional dissection of sweet and bitter taste pathways. *J Oral Biosci* 55: 66-72
- Suzuki Y, Takeda M, Obara N, Nagai Y (1996). Phagocytic cells in the taste buds of rat circumvallate papillae after denervation. *Chemical Senses.* 21: 467-476.
- Sweazey R.D, Edwards CA, Kapp BM (1994). Fine structure of taste buds located on the lamb epiglottis. *Anat. Rec.* 238: 517-527.
- Swithers-Mulvey SE, Hall WG (1992). Control of ingestion by oral habituation in rat pups. *Behav. Neurosci.* 4: 710-717.
- Takeda M (1976). An electron microscopy study of the innervation in the taste buds of the mouse circumvallate papillae. *Arch. Histol. Jap.* 39: 257-269.
- Takeda M (1977). Uptake of 5-hydroxytryptophan by gustatory cells in the mouse taste buds. *Arch. Histol. Jap.* 40: 243-250.
- Takeda M, Hoshino T (1975). Fine structure of taste buds in the rat. *Arch. Histol. Jap.* 37: 395-413.

- Takeda M, Kitao K (1980). Effects of monoamines on the taste buds in the mouse. *Cell. Tissue Res.* 210: 71-78.
- Takeda M, Shishido Y, Kitao K, Suzuki Y (1981). Biogenic monoamines in developing taste buds of mouse circumvallate papillae. *Arch. Histol. Jap.* 44: 485-495.
- Takeda M, Shishido Y, Kitao K, Suzuki Y (1982). Monoamines of taste buds in the fungiform and foliate papillae of the mouse. *Arch. Histol. Jap.* 45: 239-246.
- Takeda M, Suzuki Y, Shishido Y (1985). Effects of colchicine on the ultrastructure of Mouse taste buds. *Cell Tissue Res.* 242: 409-416.
- Takeda M, Obara N, Suzuki Y (1988). Intermediate filaments in mouse taste bud cells. *Arch. Histol. Citol.* 51: 99-108
- Takeda M, Obara N, Suzuki Y (1989). Cytoskeleton in the apical region of mouse taste bud cells. *Shika. Kiso. Igakkai. Zasshi.* 31: 317-323.
- Takeda M, Obara N, Suzuki Y (1990). Keratin filaments of epithelial and taste bud cells in circumvallate papillae of adult and developing mice. *Cell Tissue. Res.* 260: 41-48.
- Takeda M, Suzuki Y, Obara N, Nagai Y (1992). Neural cell adhesion molecule of taste buds. *J. Electron Microscop.* 41: 375-380.
- Tateno K, Yoshii K, Ohtubo Y, Miki T (2007). A network model toward a taste bud inspired sensor. *International Congress Series* 1301: 52-55
- Teper BJ, Mattes RD, Farkas BK (1991). Learned flavour cues influence food intake in humans. *J Sensory Stud.* 6: 89-100.
- Testut L, Latarjet A (1976). Sentido del gusto. En: *Tratado de Anatomía Humana. Tomo III*, pp. 493-517. Salvat Editores, Barcelona.
- Tichy F (1992). The ultrastructure of taste bud in the newborn pig. *Acta Vet. Brno.* 61: 171-177.
- Tichy F (1994). The ultrastructure of taste bud in the newborn cat. *Acta Vet. Brno.* 63: 49-54.
- Tokita K, Inoue T, Boughter Jr. J (2009). Afferent connections of the parabrachial nucleus in C57BL/6J mice. *Neuroscience* 161: 475-88.
- Tomchik SM, Berg S, Kim JW, Chaudhari N, Roper SD (2007). Breadth of tuning and taste coding in mammalian taste buds. *Journal of Neuroscience* 27: 10840-8.

- Tonosaki K, Funakoshi M (1988). Cyclic nucleotides may mediate taste transduction. *Nature*. 331: 354-356.
- Toyoshima K, Nada O, Shimamura A (1984). Fine structure of monoamine containing basa cells in the taste buds on the barbells of three species of teleosts. *Cell Tissue Res*. 235(3): 479-484.
- Toyoshima K, Tandler B (1986). Dividing type II cell in rabbit taste bud. *Anat. Rec.* 214: 161-164.
- Toyoshima K, Tandler B (1987). Modified smooth endoplasmic reticulum in type II cells of rabbit taste buds. *J. Submicrosc. Cytol.* 19: 85-92.
- Toyoshima K, Tandler B (1989). Densed-cored vesicles and unusual lamellar bodies in type III gustatory cells in taste buds of rabbit foliate papillae. *Acta. Anat.* 135: 365-369.
- Trujillo-Cenoz O (1957). Electron microscope study of the rabbit gustatory bud. *Z. Zellforsch.* 46: 272-280.
- Tuckerman F (1988). Observation on the structure of the gustatory organs of the bat (*Vespertilio subulatus*). *J. Morph.* 11(1): 1-7.
- Uga S (1969). A study of the cytoarchitecture of taste buds of rat circumvallate papillae. *Arch. Histol. Jap.* 31: 59-72.
- Van der Well H, Arvidson K (1978). Qualitative psychophysical studies on the gustatory effects of the sweet tasting proteins thaumatin and monellin. *Chem. Senses.* 3: 291-297.
- Vigorito M, Sclafani A ((1988). Ontogeny of Polycose and sucrose appetite neonatal rats. *Dev. Psychobiol.* 21: 457-465.
- Wakisaka S (2006). Development and Cell Lineage of Taste Bud Cells. *J. Oral Biosci.* 48: 177-184.
- Warwick ZS, Schiffman SS (1990). Sensory evaluations of fat-sucrose and fat-salt mixtures: Relationship to age and weight status. *Physiol. Behav.* 48: 633-636.
- Weibel ER, Bolender RP (1973). Stereological techniques for electron microscopy morphometry. En: *Principles and techniques of electron microscopy*. Vol.3. Ed. A.M. GLAUERT. North Holland. Amsterdam.
- Wells AG (1989). The use intense sweeteners in soft drinks. In: Grenby TH, ed. *Progress in sweeteners*, London: Elsevier Applied Science. 1989: 169-214.

- Whitear M, Moate RM (1994). Microanatomy of taste buds in the dogfish, *Scyliorbinus canicula*. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 26: 357-367.
- Whitehead MC, Kachele DL (1994). Development of fungiform papillae, taste bud, and their innervation in the hamster. J. Comp. Neurol. 340: 515-530.
- Willians M (1977). Stereological techniques. En: Practical Methods in Electron Microscopy. Vol. 6. Ed. A.M. GLAUERT. North Holland. Amsterdam.
- Yamamoto T (2006). Neural substrates for the processing of cognitive and affective aspects of taste in the brain. Arch Histol. Cytol. 69: 243-55.
- Yang, R, Crowley, HH, Rock, M.E. and Kinnamon, JC (2000) Taste cells with synapses in rat circumvallate papillae display Snap-25-like immunoreactivity. J. Comp. Neurol. 424: 205-2.
- Yarmolinsky D, Zuker C, Ryba N (2009). Common sense about taste: from mammals to insects. Cell 139: 234-244.
- Yee CL, Yang R, Bottger B, Finger TE, Kinnamon JC (2001). "Type III" cells of rat taste buds: immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific enolase, protein gene product 9.5, and serotonin. J. Comp. Neurol. 440: 97-108.
- Yee CL, Jones KR, Finger TE (2003) Brain-derived neurotrophic factor is present in adult mouse taste cells with synapses. J. Comp. Neurol. 459: 15-24.
- Yoshida R, Niki M, Jyotaki M, Sanematsu K, Shigemura N, Ninomiya Y (2013). Modulation of sweet responses of taste receptor cells. Seminars in Cell & Developmental Biology 24: 226-231.
- Yoshida R, Shigemura N, Sanematsu K, Yasumatsu K, Ishizuka S, Ninomiya Y (2006). Taste responsiveness of fungiform taste cells with action potentials. Journal of Neurophysiology 96: 3088-95.
- Yoshida R, Niki M, Murata Y, Shigemura N, Ninomiya Y. (2010). Reception and Transmission of Taste Information in Type II and Type III Taste Bud Cells. J. Oral Biosci. 52: 358-364.
- Yoshie S, Kanazawa H, Fujita T (1996). A possibility of efferent innervation of the gustatory cell in the rat circumvallate taste buds. Arch. Histol. Cytol. 59: 479-484.
- Yoshie S, Wakasugi C, Teraki Y, Fujita T (1990). Fine structure of the taste bud in guinea pigs. I. Cell characterization and innervation patterns. Arch. Histol. Cytol. 53: 103-119.

- Yoshie S, Wakasugi C, Teraki Y, Ignanawa T, Fujita T (1988). Immunocytochemical localizations of neuron-specific proteins in taste buds of the guinea pig. *Arch. Histol. Cytol.* 51: 379-384.
- Yuequin Peng, Sarah Gillis-Smith, Hao Jin, Dimitri Tränkner, Nicholas J P, Ryba & Charles S Zuker (2015). Sweet and bitter taste in the brain of awake behaving animals. *Nature* 2015.
- Zahm DS, Munger BL (1983a). Foetal development of primate chemosensory corpuscles. I. Synaptic relationships in late gestation. *J. Comp. Neurol.* 213: 146-162.
- Zahm DS, Munger BL (1983b). Foetal development of primate chemosensory corpuscles. II. Synaptic relationships in early gestation. *J. Comp. Neurol.* 219: 36-50.
- Zallen E, Hooks LB, O'Brien K (1990). Salt taste preferences and Perceptions of elderly and young adults. *J Am Diet Assoc.* 90: 947-950.
- Zancanaro C, Sbarbati A, Bolner A, Accordini C, Piemonte G, Osculati F (1995). Biogenic amines in the taste organ. *Chem. Senses.* 20: 329-335.
- Zellner D, Loaiza S, Gonzalez Z, Pita J, Morales J, Pecora D, Wolf A (2006). Food selection changes under stress, *Physiol. Behav.* 87: 789-793.
- Zhang Y, Hoon M, Chandrashekar J, Mueller K, Cook B, Wu D, Zuker C, Ryba N. (2003) Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112: 293-301.
- Zhang X, Zhou L, Banb X, Liua D, Jianga W, Liua X (2011). Decreased expression of CD36 in circumvallate taste buds of high-fat diet induced obese rats. *Acta Histochemica* 113: 663-667
- Zhao G, Zhang Y, Hoon M, Chandrashekar J, Erlenbach I, Ryba N, Zuker C (2003). The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* 115: 255-66.
- Zuwala K, Jakubowski M (1993). Light and electron (SEM, TEM). Microscopy of taste buds in the trench, *Tinca tinca* (Pisces: Cyprinidae). *Acta Zoologica.* 74: 277-282.

9.- ANEXO. IMÁGENES

9.1. – Fotografías

En este apartado se incluyen las microfotografías realizadas mediante microscopía electrónica de transmisión más representativas de las yemas gustativas de cada papila, observándose en el Nivel 1 los distintos tipos celulares e identificándose en él los correspondientes valores de densidad de volumen celular, el coeficiente de forma celular, la densidad de volumen del núcleo y la densidad de superficie del núcleo.

En las microfotografías del nivel 2 se pueden apreciar los orgánulos celulares que tienen membrana y que han sido analizados en este estudio: mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso (RER), aparato de Golgi, gránulos densos, vesículas claras y vesículas nucleodensas, pudiéndose apreciar en ellas una idea gráfica de los datos medidos: Densidad Numérica (DN, $N/\mu\text{m}^3$), Densidad de volumen (DV, $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$), Densidad de Superficie (DS, $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$) y Coeficiente de Forma (CF) de los diferentes orgánulos, ya sean comunes o específicos de cada tipo celular.

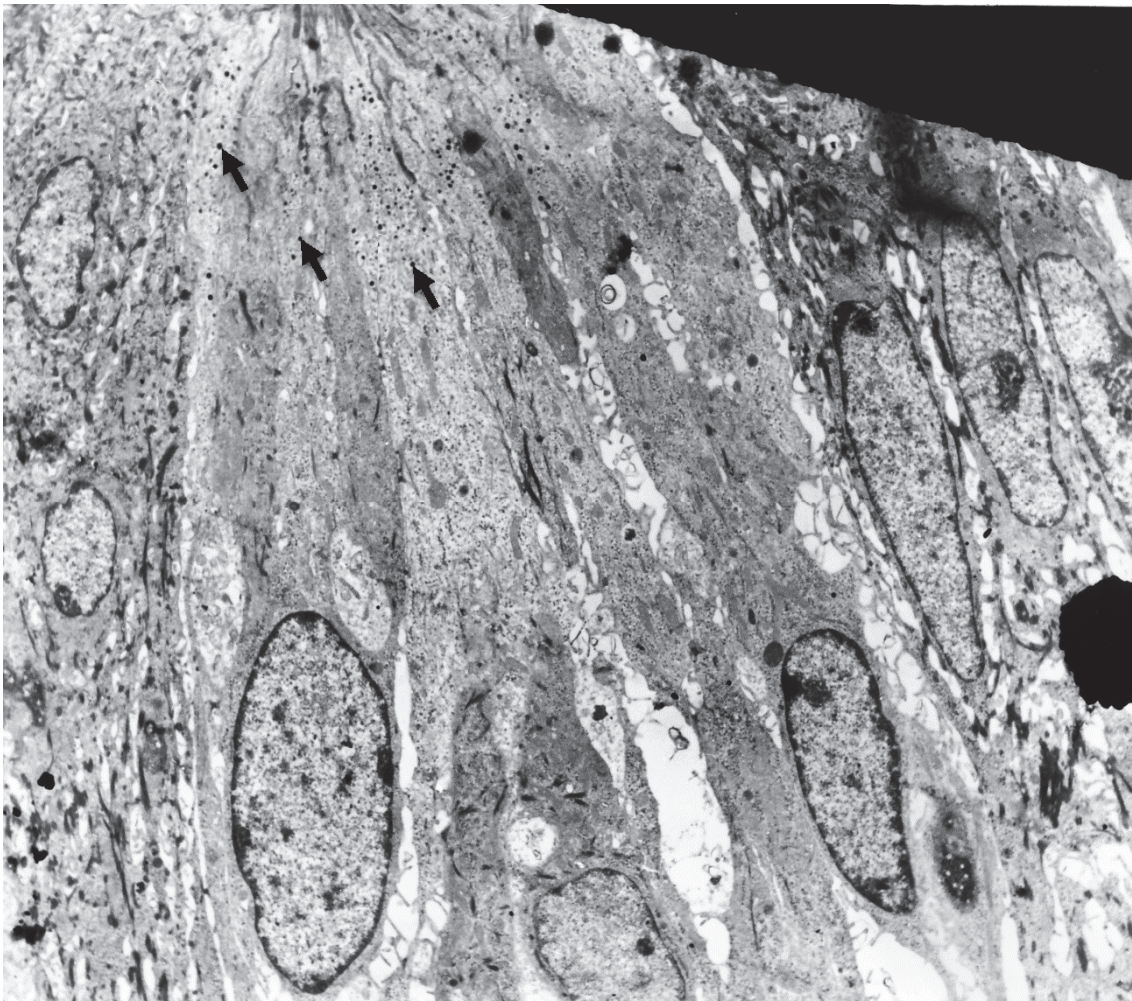


Figura 1.- Nivel 1. Yema fungiforme control. Se aprecian varias células tipo I con gran cantidad de gránulos densos (Flechas) en región apical. 2.308X.

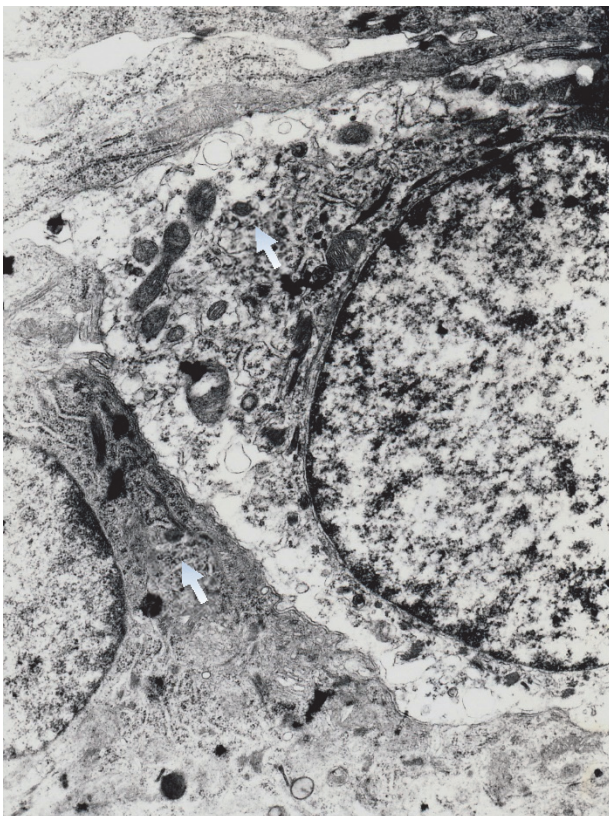


Figura 2.- Nivel 2. Célula tipo II de papila foliada control. Se aprecia un citoplasma electrolúcido, donde apreciamos retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias y polirribosomas (flechas). El núcleo se presenta electroclaro y de contorno redondeado. 8.000X.

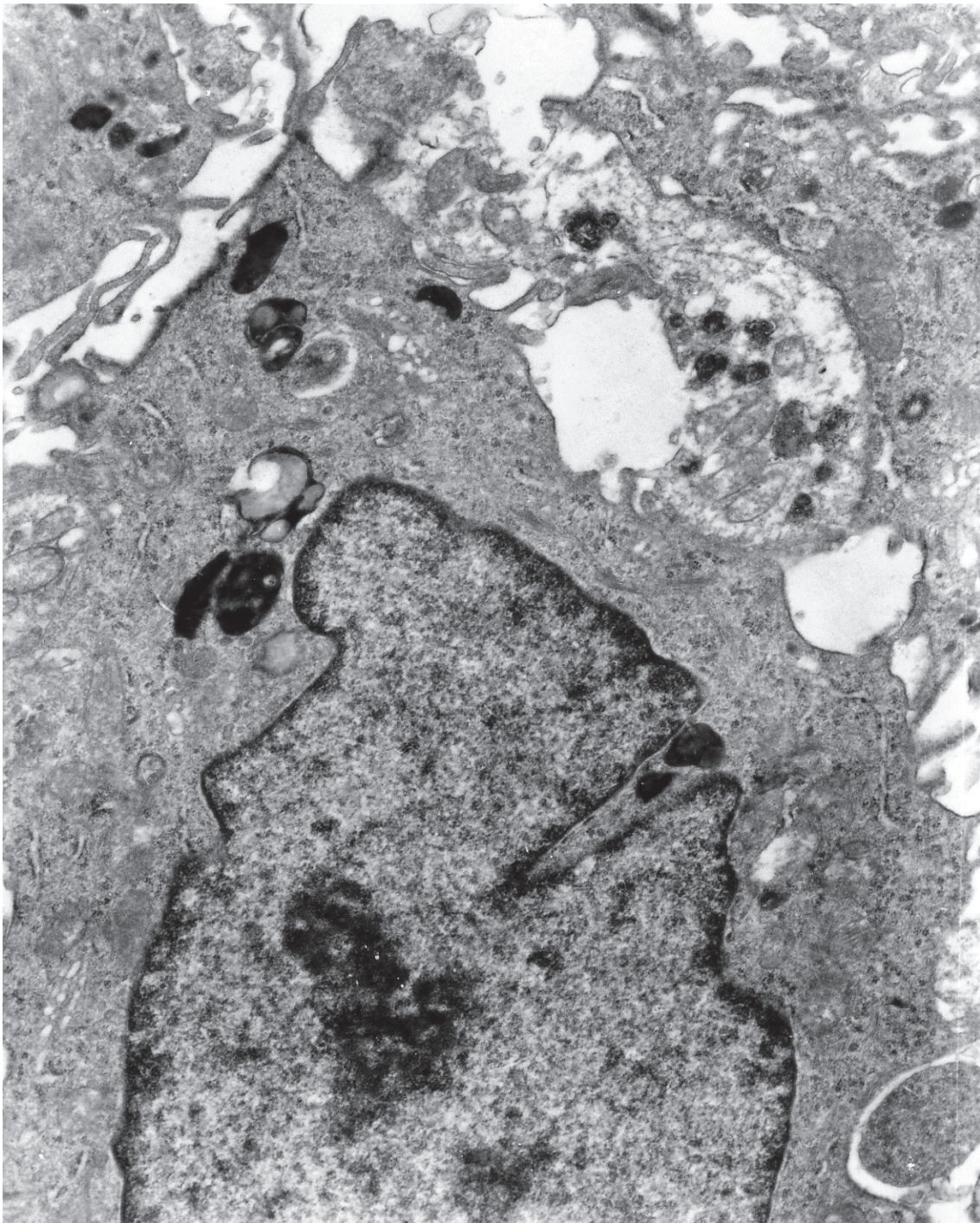


Figura 3.- Nivel 2. Región supranuclear de célula tipo III en papila foliada control. Célula de tamaño y contornos intermedios respecto a los otros dos tipos celulares. 10.435X.

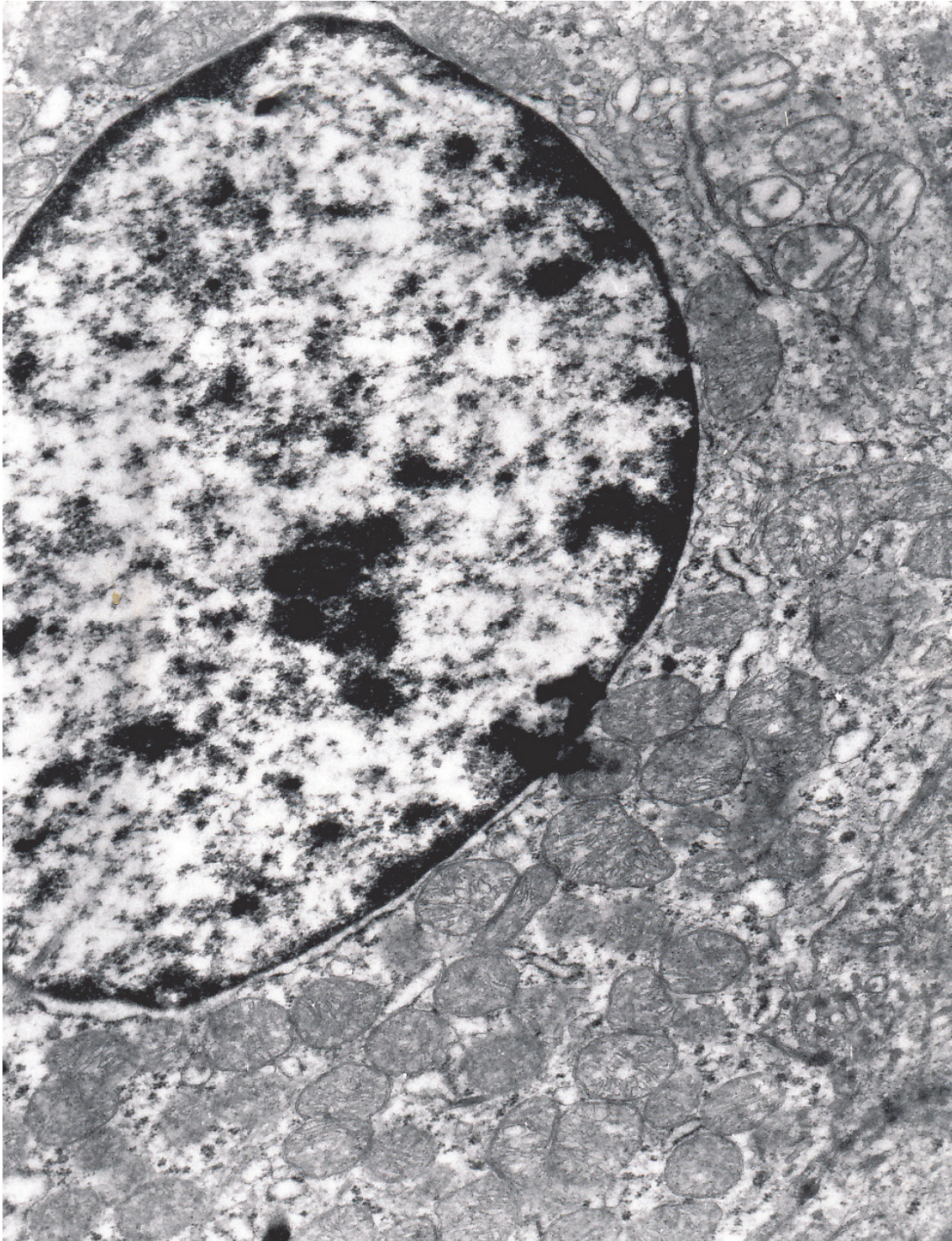


Figura 4.- Nivel 2. Región perinuclear de célula tipo II de papila fungiforme control, en ella se aprecia una elevada densidad numérica de mitocondrias.14.545X.

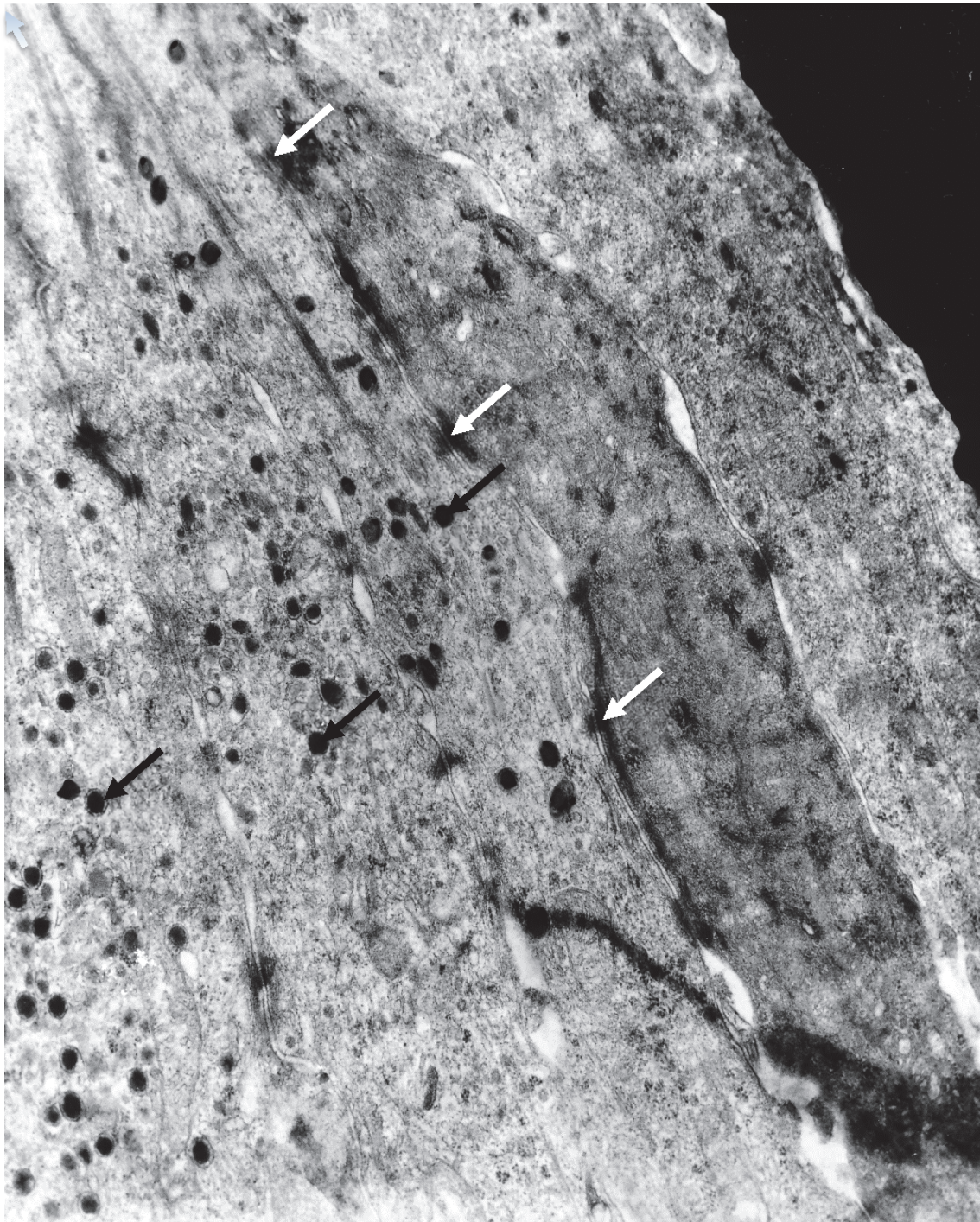


Figura 5.- Nivel 2. Región apical de varias células tipo I de una yema foliada control. Se aprecia una importante cantidad de gránulos densos (flechas negras) y desmosomas (flechas blancas) en las uniones intercelulares. 10.435X.

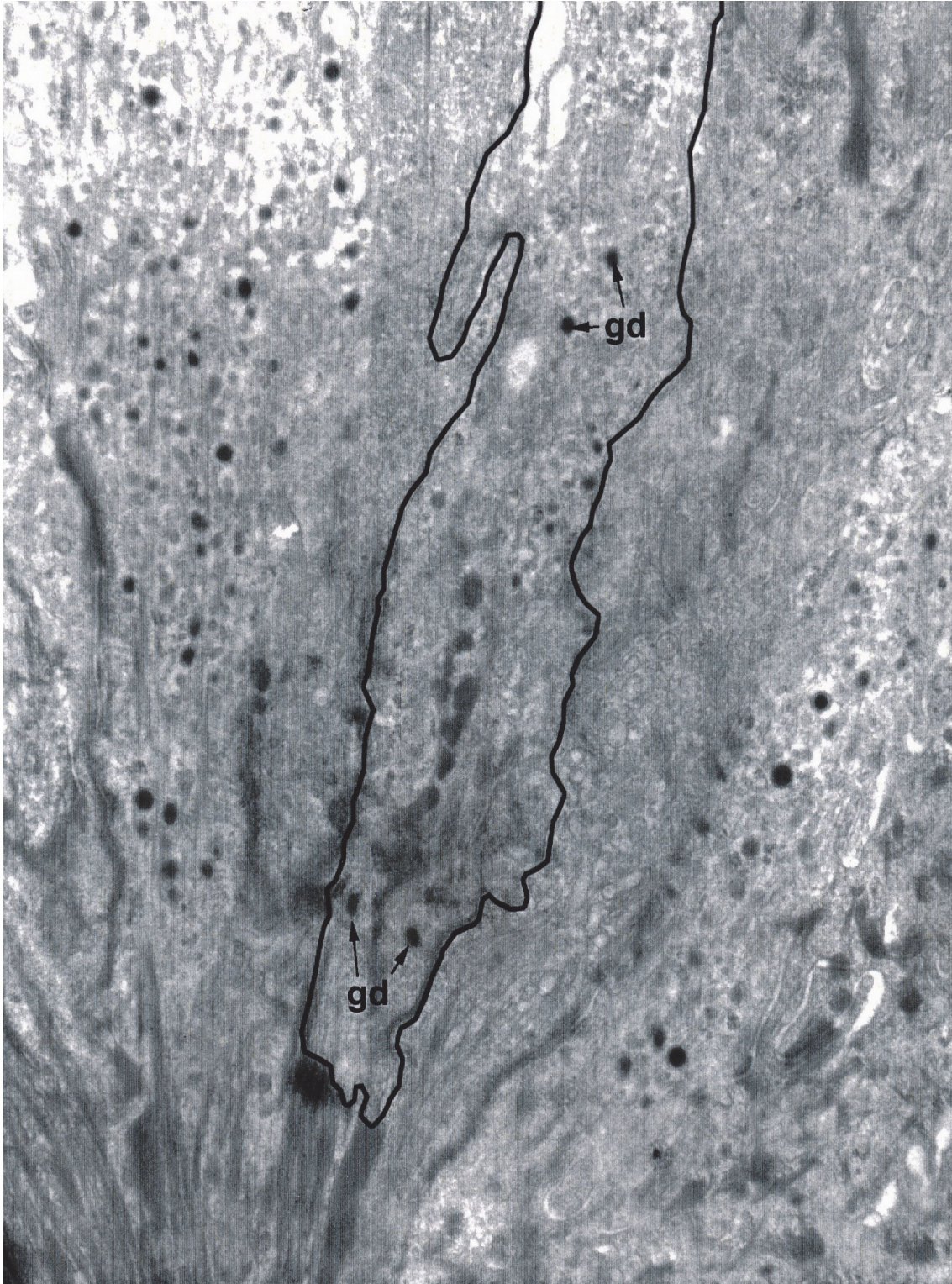


Figura 6.- Terminaciones en el poro de una célula foliada-sacarina tipo I con abundantes gránulos densos (gd). 10.435X.



Figura 7.- Gránulos densos (flechas) en región del poro en una papila vallada control. 5000X.

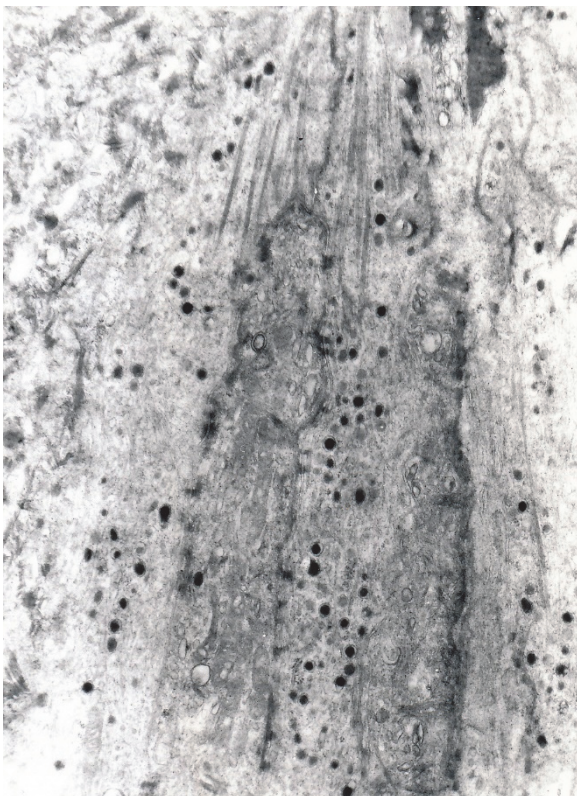


Figura 8.- Gránulos densos en región apical de poro gustativo en una papila vallada sacarina. 8000X

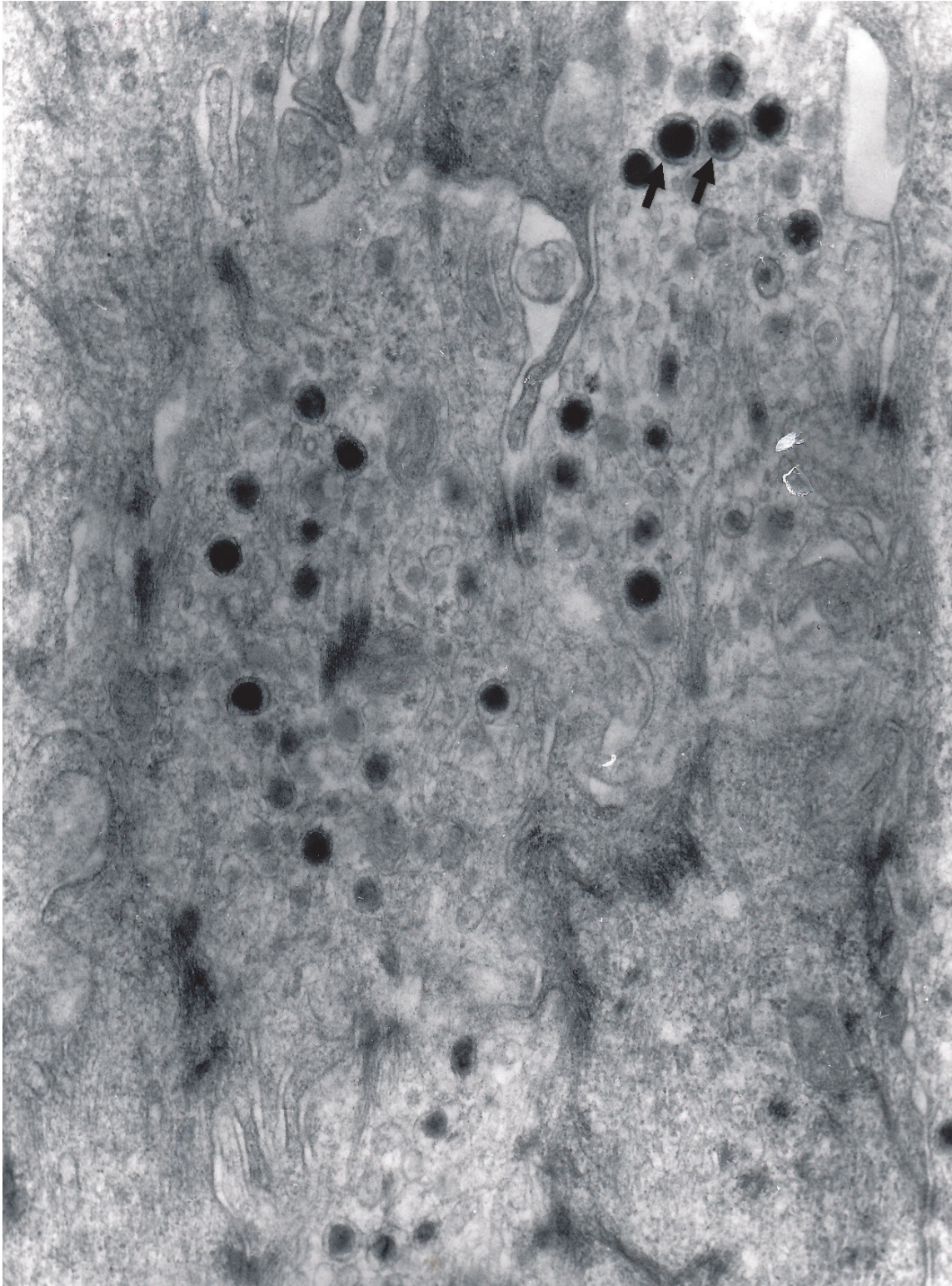


Figura 9.- Gránulos densos en papila vallada sacarina, a gran aumento, donde se aprecia el halo (flechas) que envuelve claramente el contenido nucleodenso. 64.000X.

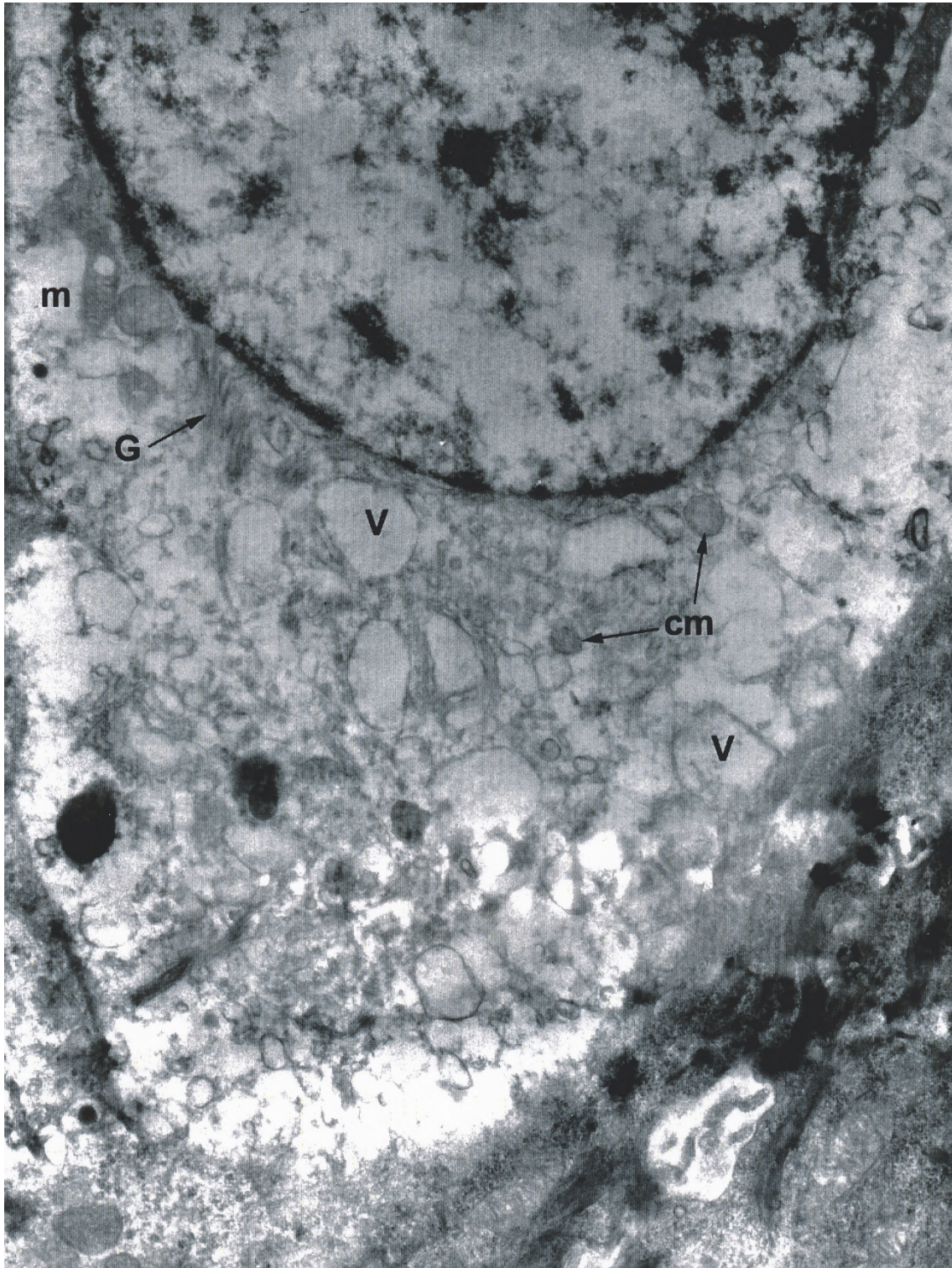


Figura 10.- Citoplasma de una célula tipo II de papila vallada-sacarina. Se pueden observar múltiples vacuolas (V), mitocondrias (m), cuerpos multivesiculares (cm) y aparato de Golgi (G). 10.435X.

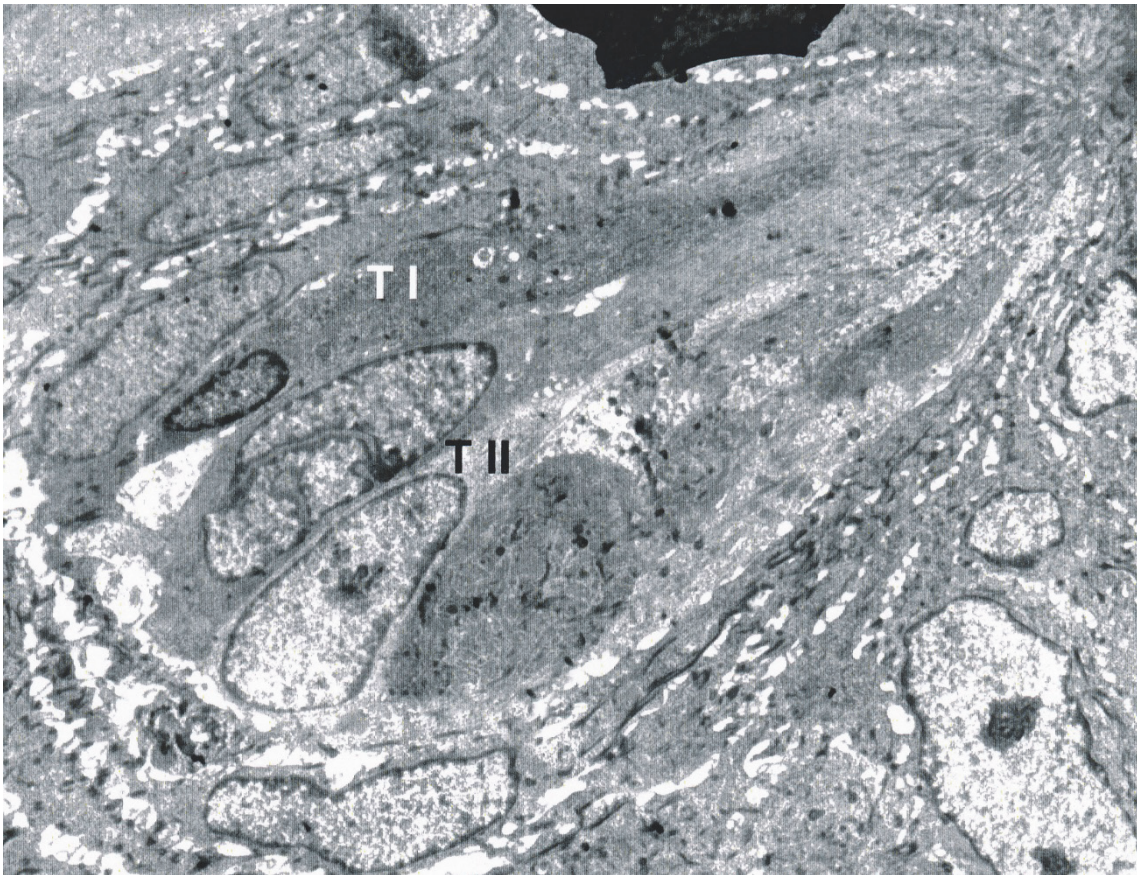


Figura 11.- Aspecto de una yema de papila foliada-control con diferentes tipos celulares: Tipo I (T I) y II (T II). 2.600X.

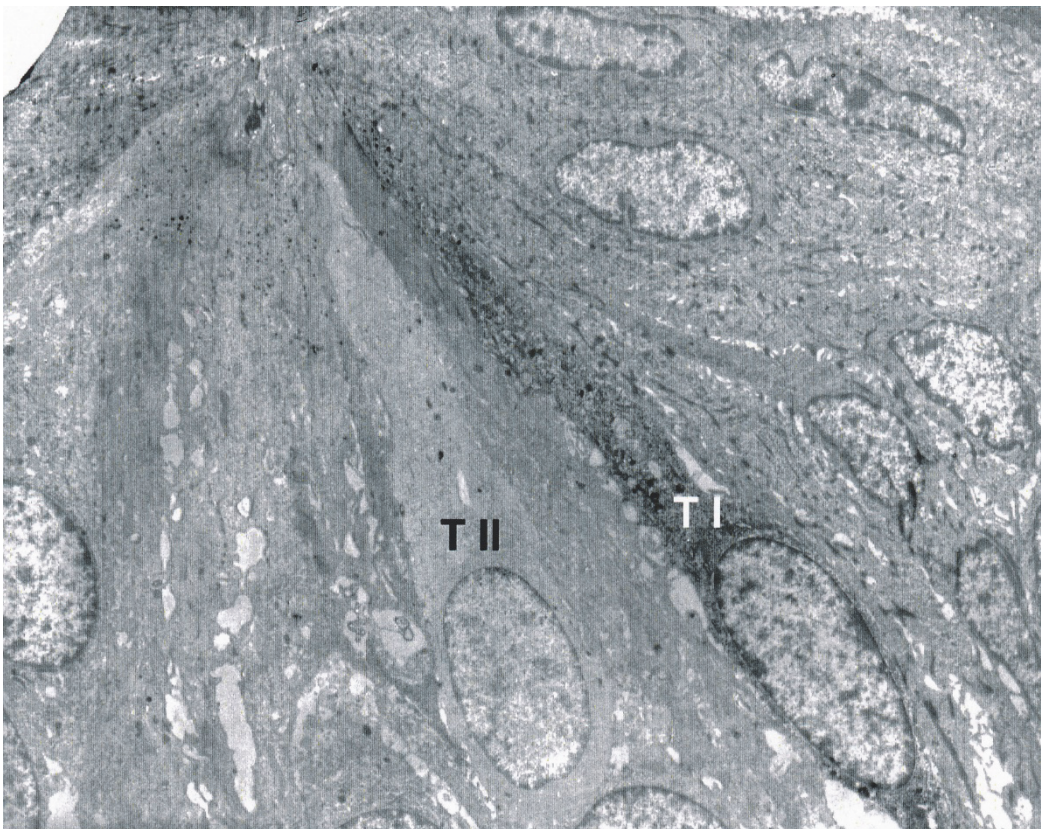


Figura 12.-: Aspecto global de una yema foliada sacarina con distintos tipos celulares: Tipo I (T I) y II (T II). 2.000X.

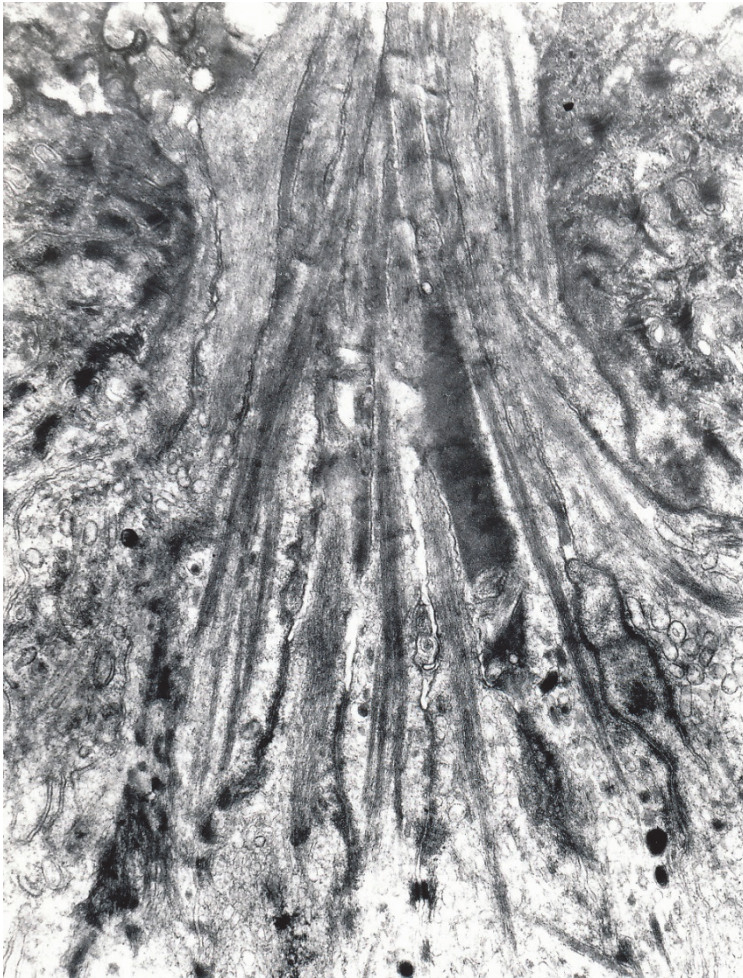


Figura 13.-Aspecto de un poro gustativo perteneciente a una papila foliada control, donde se aprecia como las terminaciones citoplasmáticas de las células tipo I llegan hasta el poro de la yema. Se aprecian abundantes gránulos densos y sustancia densa del poro. 12.500X.

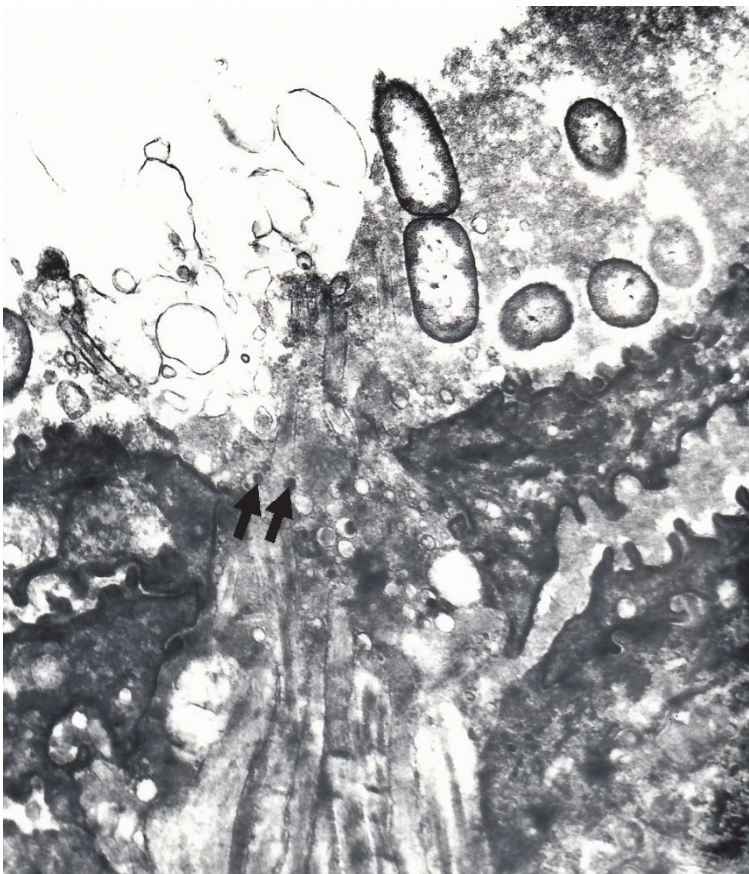


Figura 14.- Poro gustativo perteneciente a una papila foliada control, donde se aprecia las sustancias sápidas en contacto con la sustancia densa del poro y abriéndose en él gránulos densos (flecha). 12.120X



Figura 15.- Aspecto de poro de papila vallada-control, se observa como finalizan los microvillis en la cavidad del poro gustativo así como abundantes gránulos densos.7.060X.

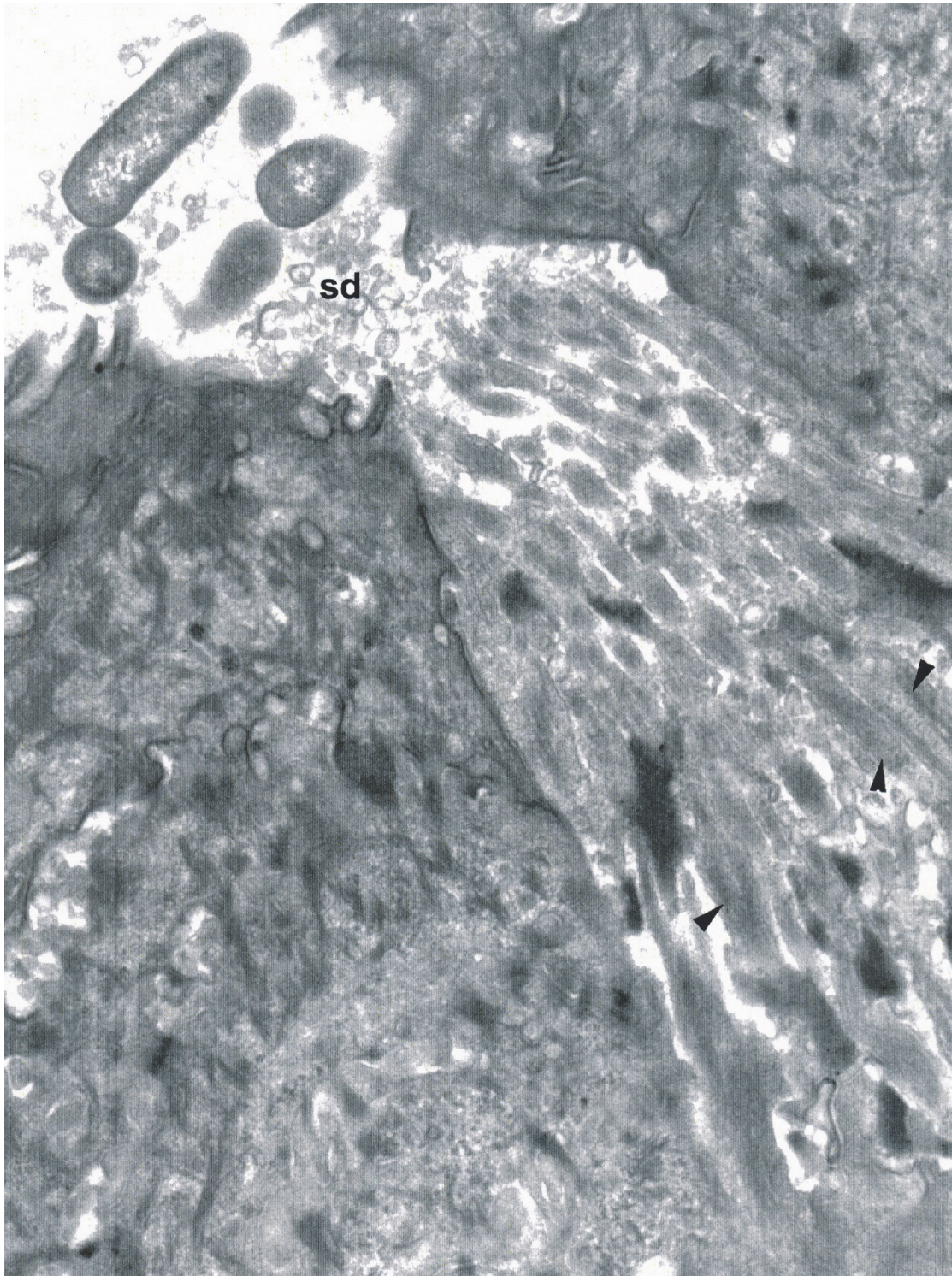


Figura 16.- Región del poro de una yema foliada tratada con sacarina. Se aprecian numerosas microvellosidades (cabezas de flecha) y sustancia densa del poro (sd). 13.000X.

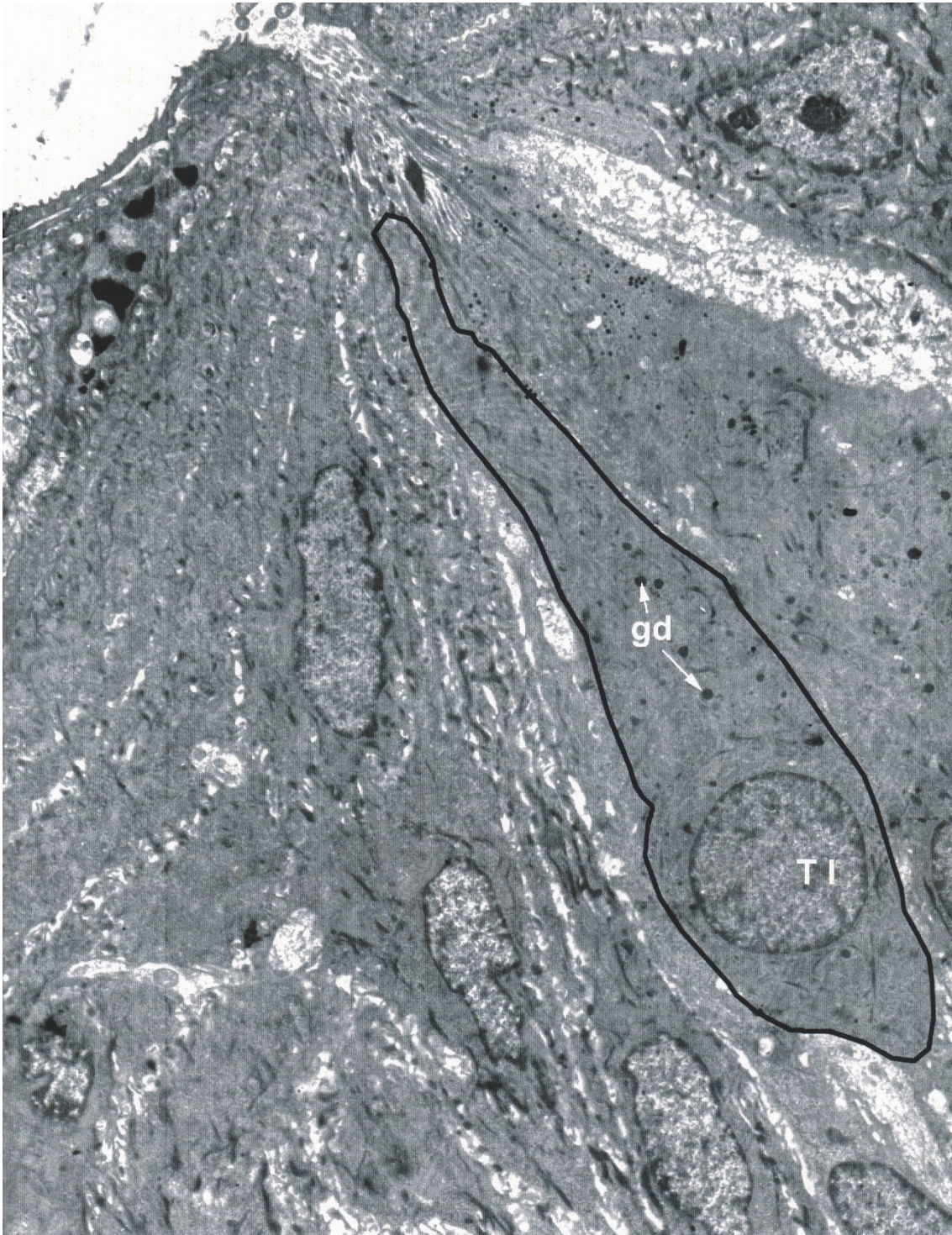


Figura 17.- Yema gustativa de una papila foliada-sacarina- Célula tipo I delimitada (TI), en la que se observan abundantes gránulos densos (gd). 2000X

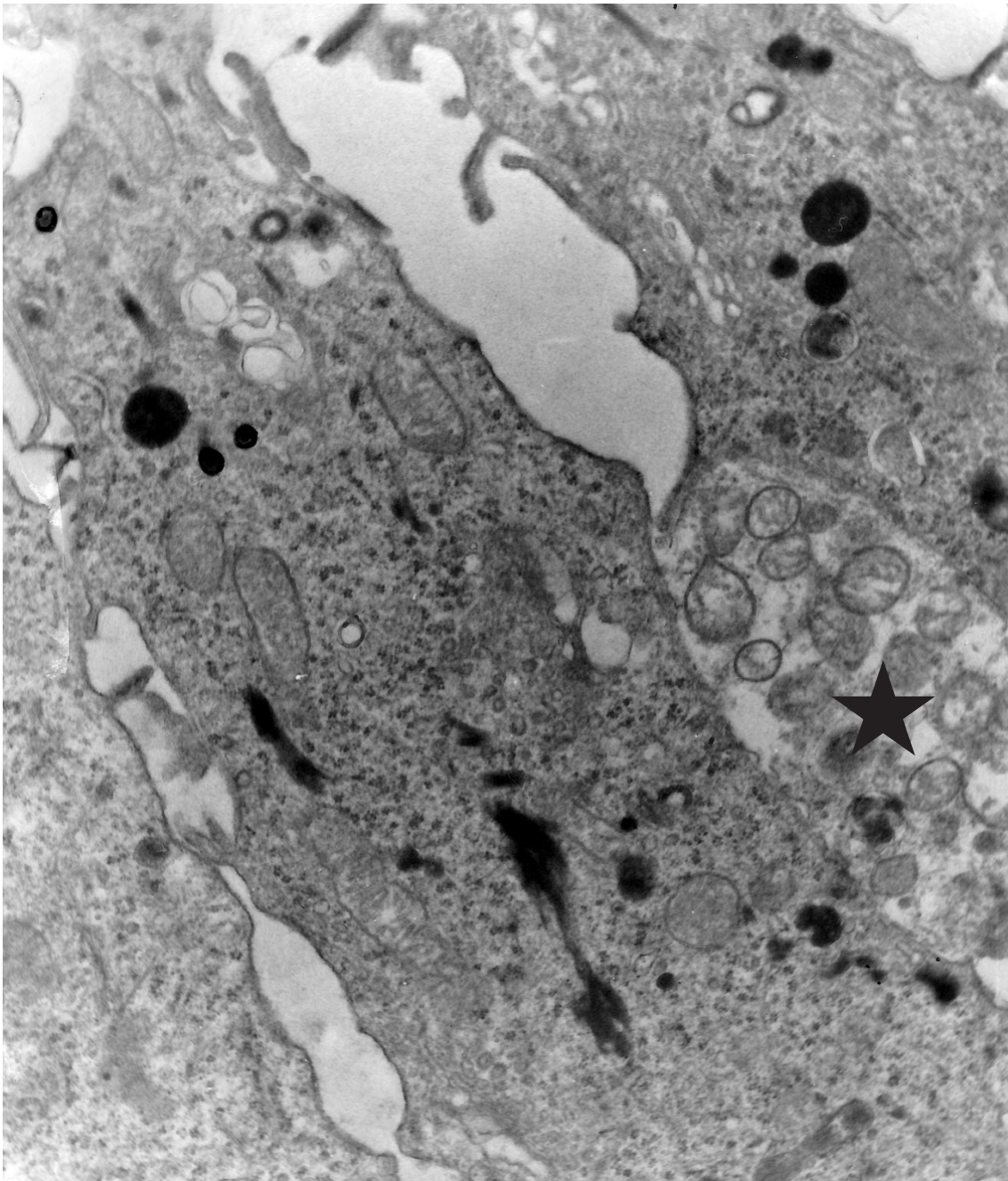


Figura 18.- Nivel 2. Región supranuclear de célula tipo I en papila fungiforme-sacarina. En las proximidades se observa un axón (estrella). Las células tipo I se les ha otorgado funciones similares a células gliales. 10.910X.

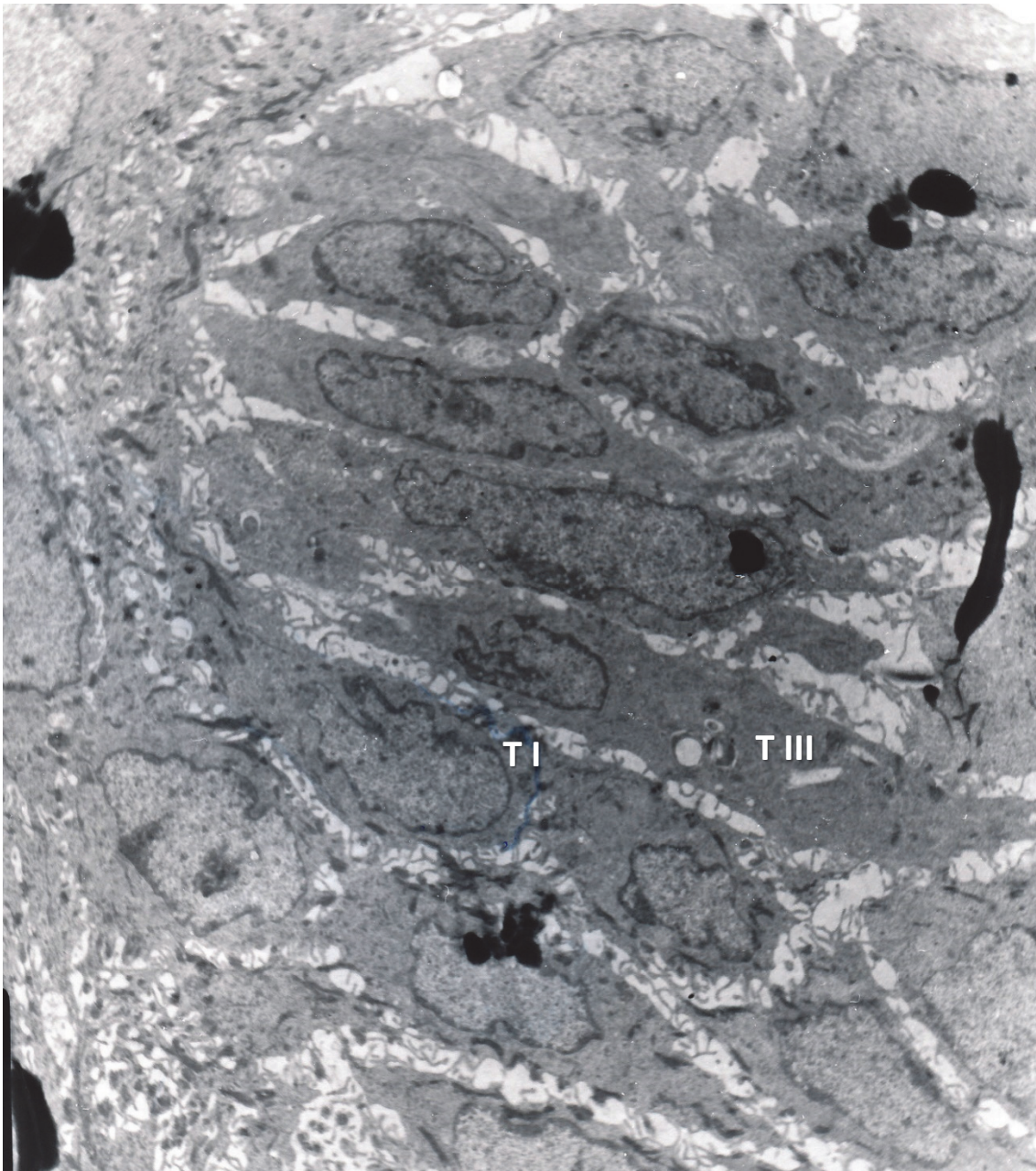


Figura 19.- Aspecto de yema gustativa fungiforme-sacarina, donde se aprecian diferentes tipos celulares. Células tipo I con escasos gránulos densos y en la periferia alguna célula tipo III. 2.610X.

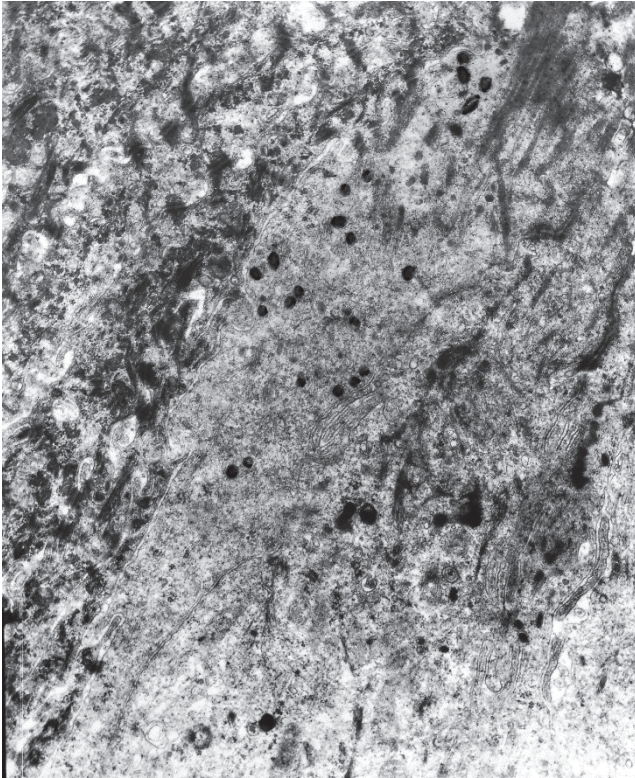


Figura 20.- Gránulos densos (flecha) en la región apical de una papila fungiforme-control, se aprecian escasas microvellosidades que no llegan al poro gustativo. 5.910X

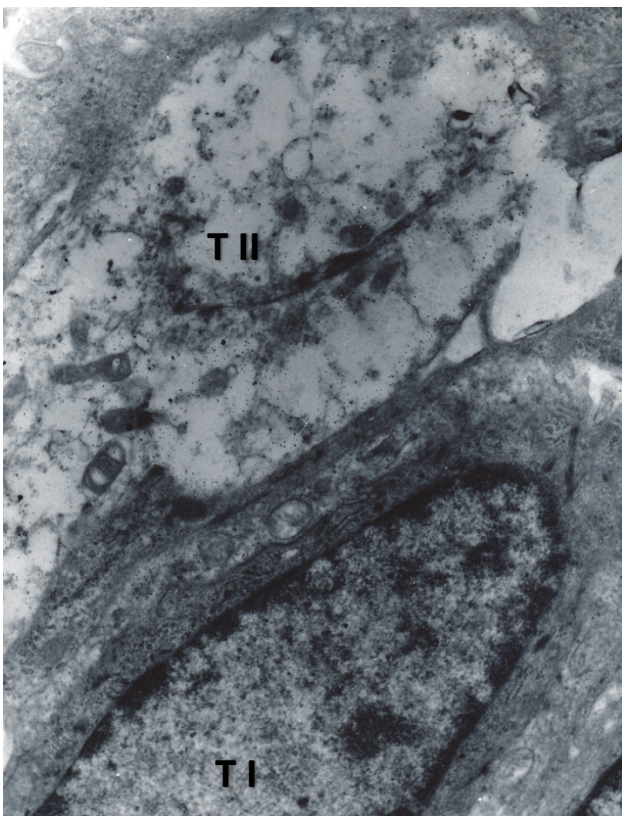


Figura 21.- Nivel 2. Región infranuclear de una célula tipo I de papila fungiforme-sacarina en contacto con citoplasma de célula tipo II. Se aprecia notablemente la electrodensidad de la célula tipo I y el citoplasma electroclaro de la célula tipo II. 5.818X.

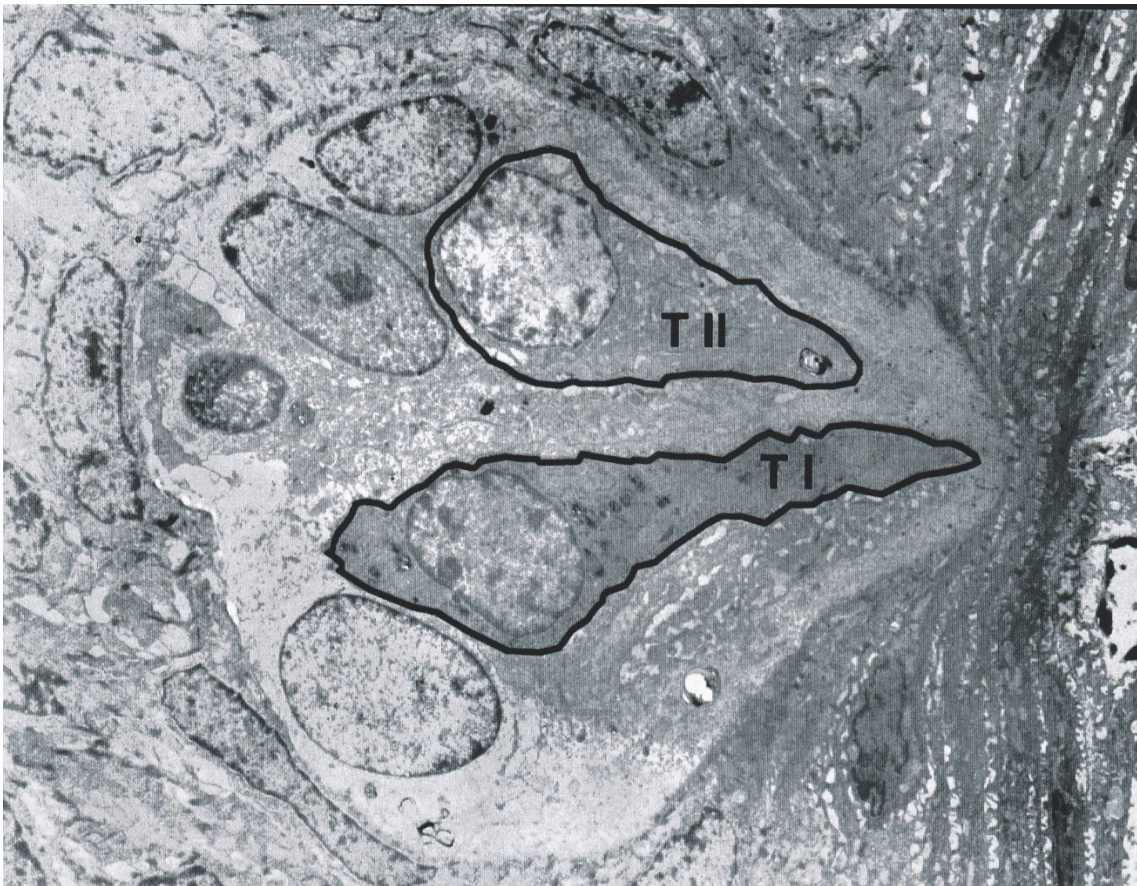


Figura 22.- Aspecto general de una yema de una papila vallada-control en la que se diferencian dos tipos celulares: tipo I (TI) y tipo II (TII). 1.610X.

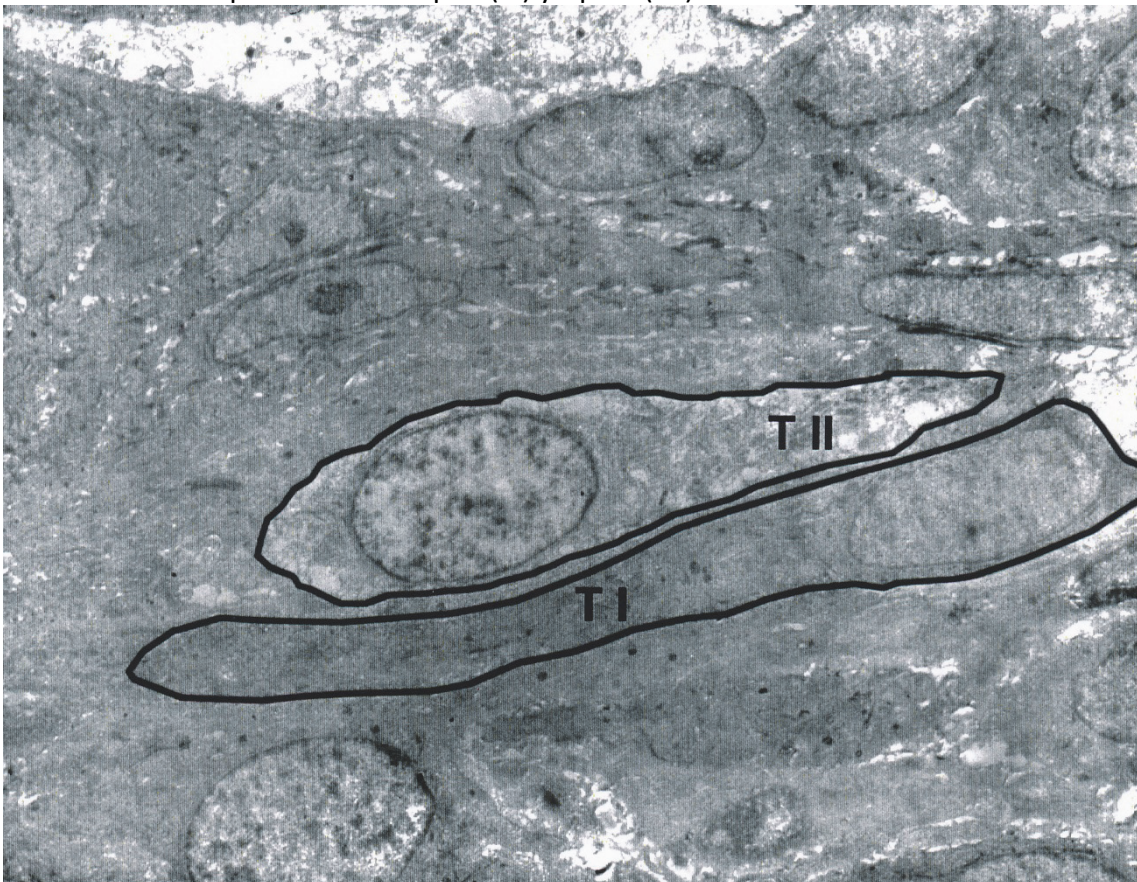


Figura 23.-Aspecto de una yema de papila vallada-sacarina en la que se observan contorneadas una célula tipo I (TI) y una célula tipo II (T II) 2.182X

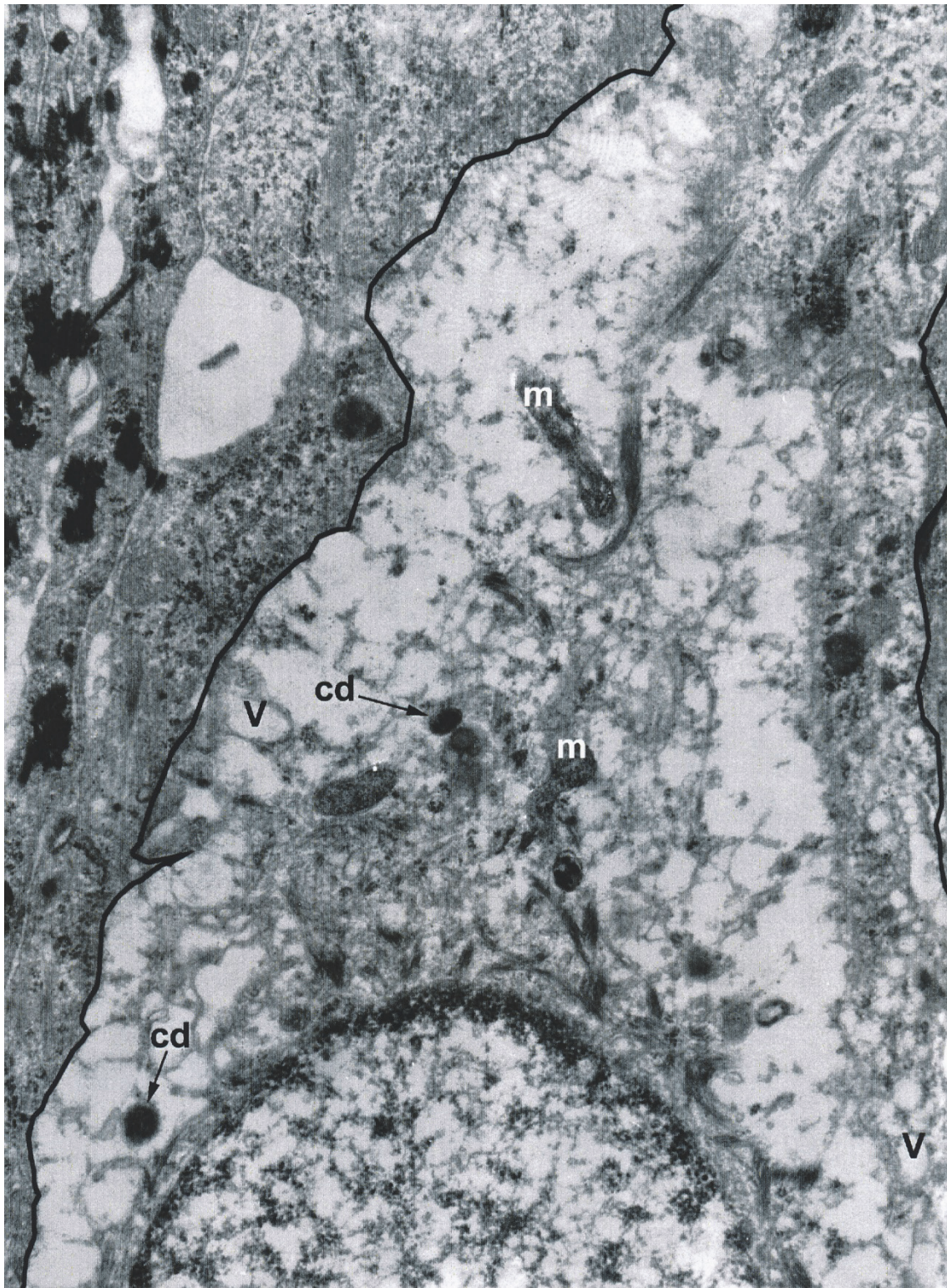


Figura 24. -Nivel 2. Célula tipo II de una papila foliada-sacarina en la que se aprecia parte del núcleo, mitocondrias (m), cuerpos densos (cd) y numerosas vacuolas (v). 8000X.

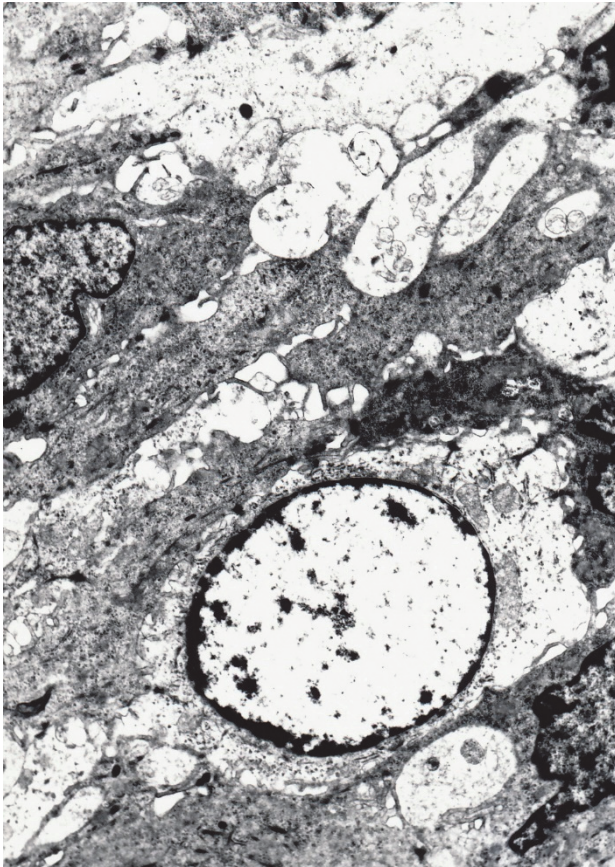


Figura 25.-Nivel 1. Célula tipo II de papila fungiforme control, donde apreciamos las características de este tipo celular, electroclaras, redondeadas y el núcleo con similares características. En las proximidades hay abundantes terminales nerviosos. 4000X.

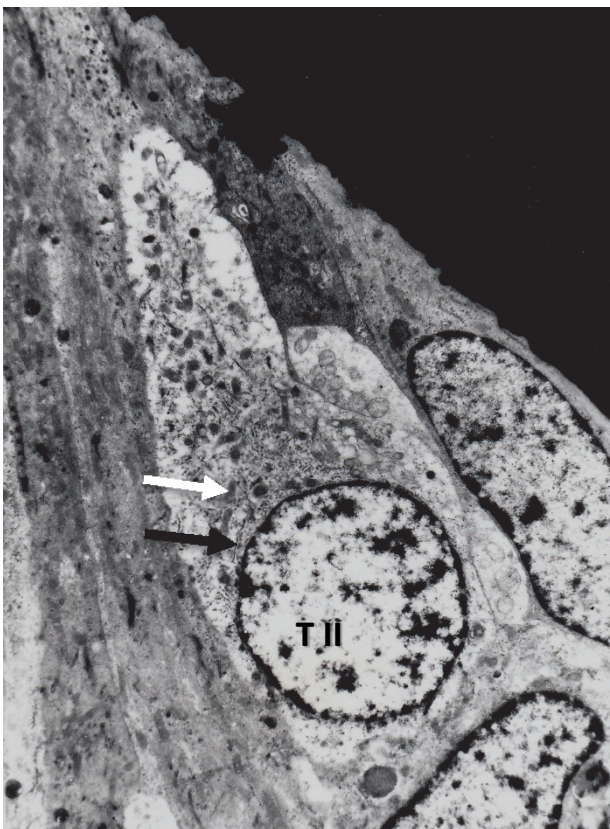


Figura 26.- Aspecto de una célula tipo II (T II) de papila fungiforme-control, donde observamos abundantes mitocondrias (flecha blanca) y RER (flecha negra). 3.000X.

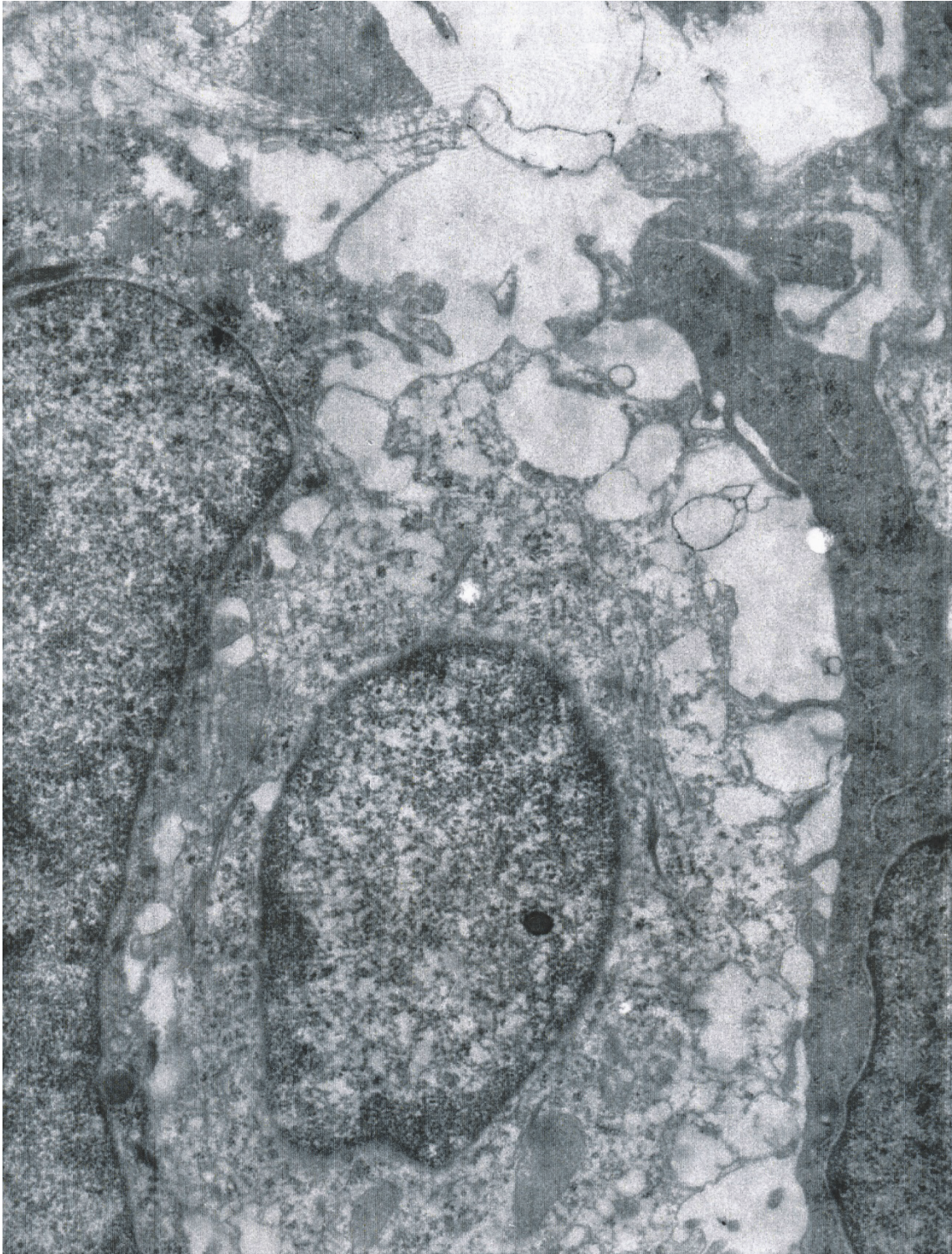


Figura 27.- Célula tipo II de una papila fungiforme sacarina en la que se aprecia una abundancia de vacuolas. 8000X.



Figura 28.- Aspecto de una célula tipo II (perfilada) vallada-sacarina localizada en la periferia de la yema. 2.435X.

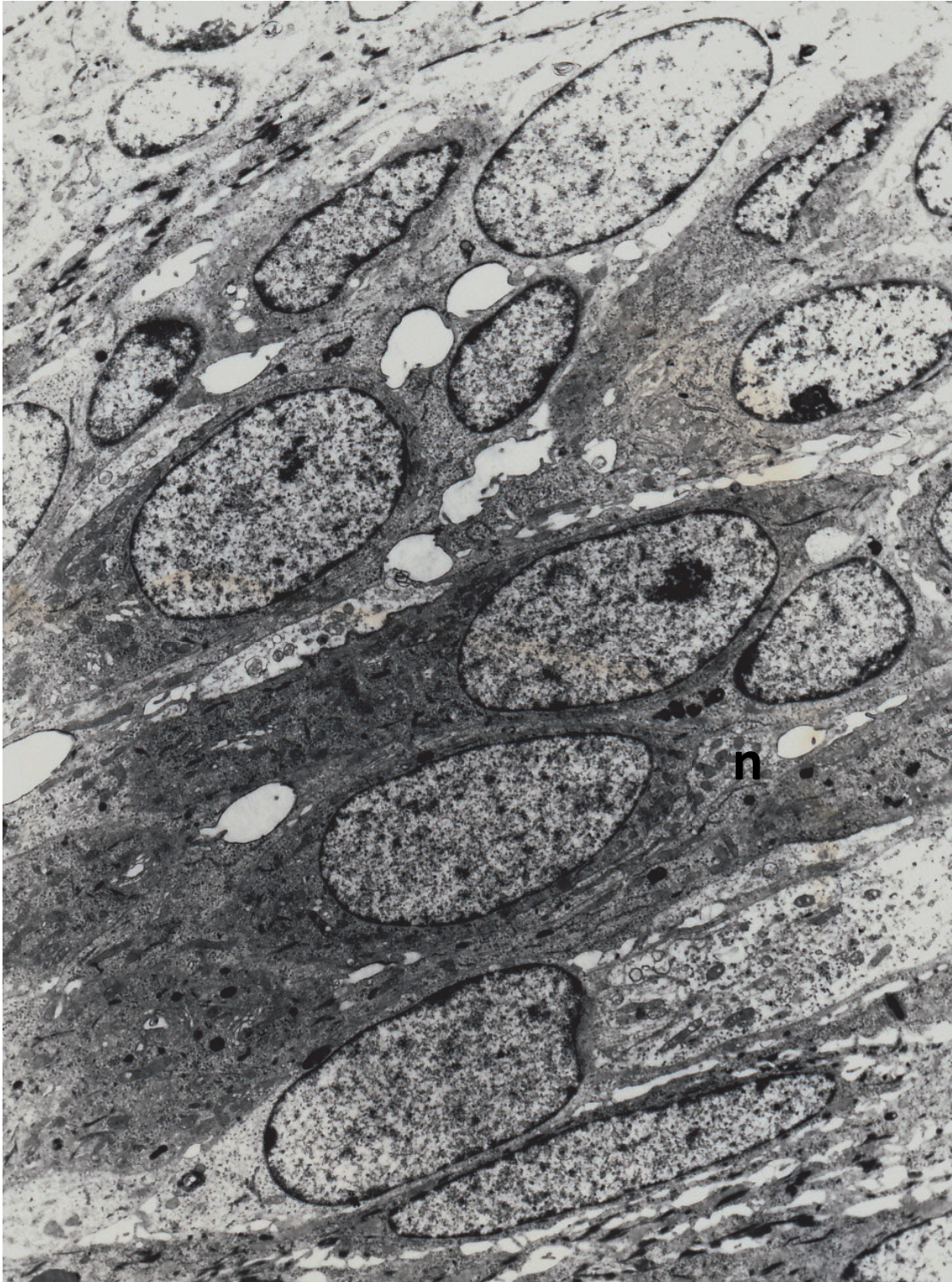


Figura 29. Nivel 1. Células tipo III en una papila fungiforme-control con terminaciones nerviosas en sus cercanías (n). 3.750X.

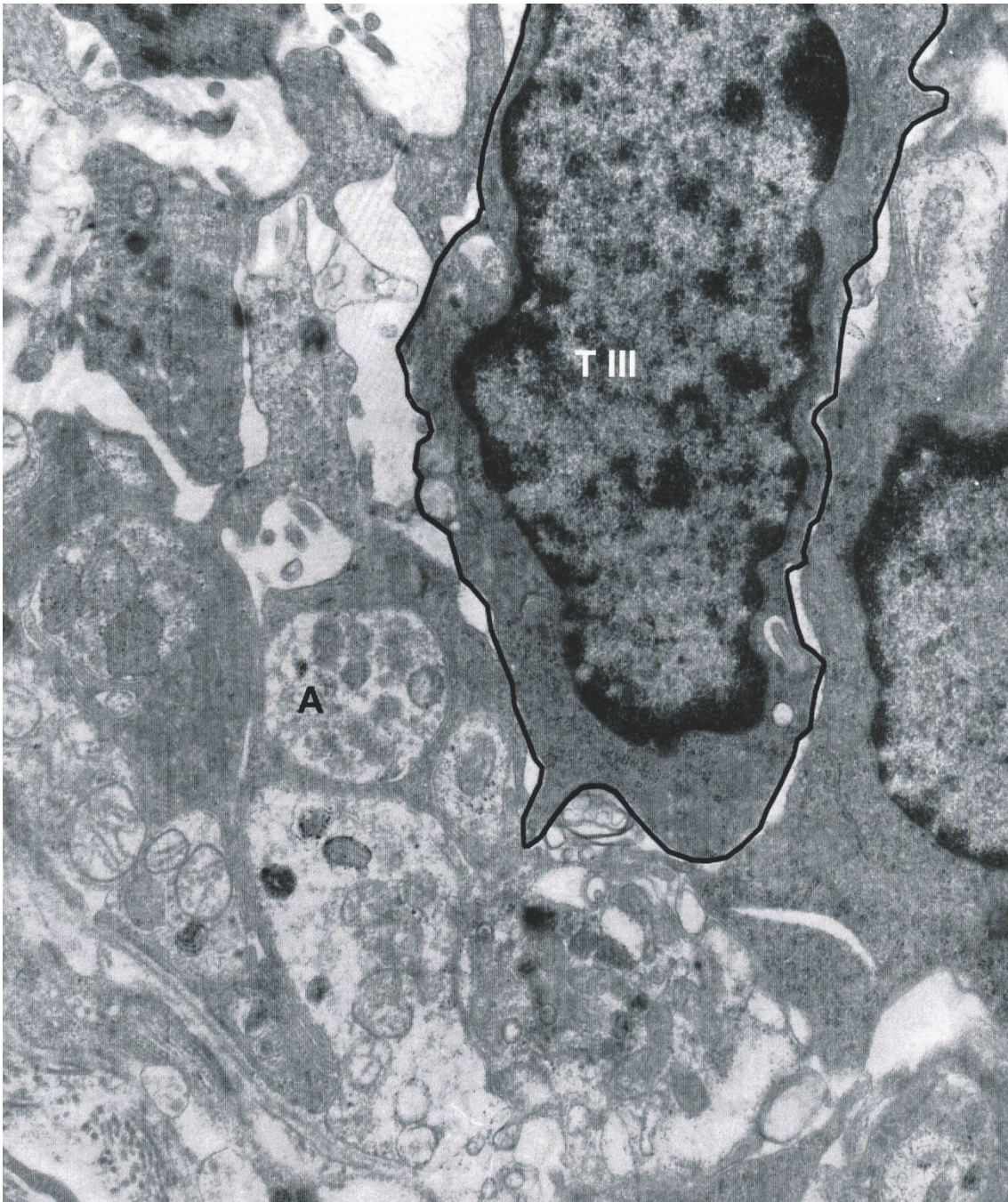


Figura 30.-Núcleo y citoplasma perinuclear de una célula tipo III (T III) en una papila foliada tratada con sacarina. Se pueden apreciar varios axones en su periferia (A). 8.000X.

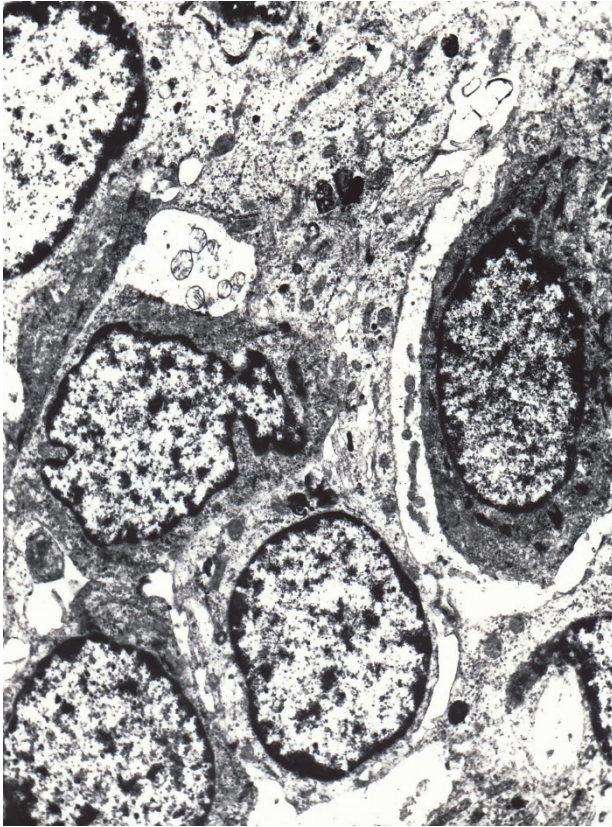


Figura 31.- Células tipo III en una papila fungiforme tratada con sacarina. Según nuestros resultados su densidad de volumen es menor y el coeficiente de forma mayor que las tipo III control, es decir, ocuparían un menor volumen en la yema y serían de aspecto más redondeado. 4.000X.



Figura 32.- Nivel2. Región infranuclear de célula tipo III de papila fungiforme control con un terminal nervioso en su periferia (n). 8000X



Figura 33.-Nivel 2. Región perinuclear de célula tipo III en papila vallada-control. Las vesículas nucleodensas y claras presentan una densidad numérica menor que en las tratadas con sacarina. 10.434X.

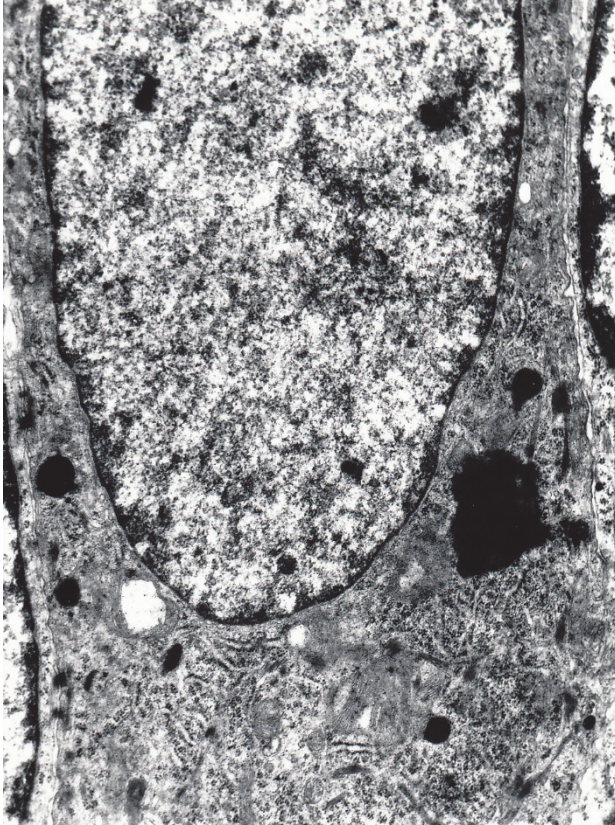


Figura 34.- Región infranuclear de una célula tipo III tratada con sacarina. 8.000X

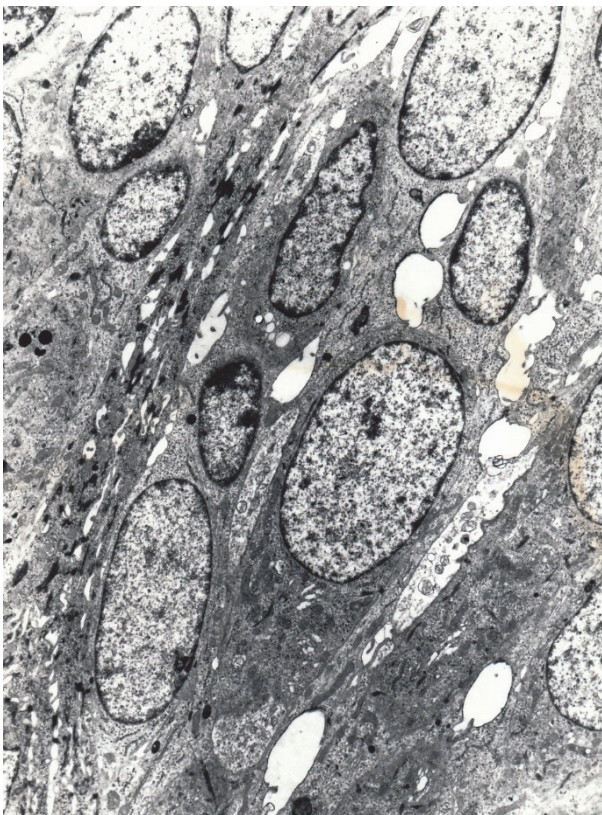


Figura 35.- Célula tipo III de papila vallada tratada con sacarina vallada. 2.500X.

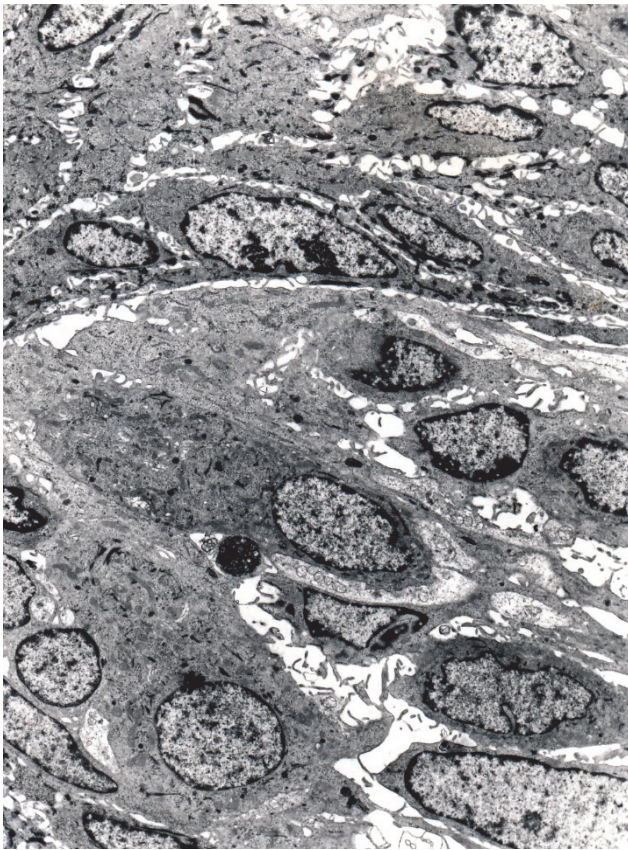


Figura 36.- Papila vallada control.
2.000X.

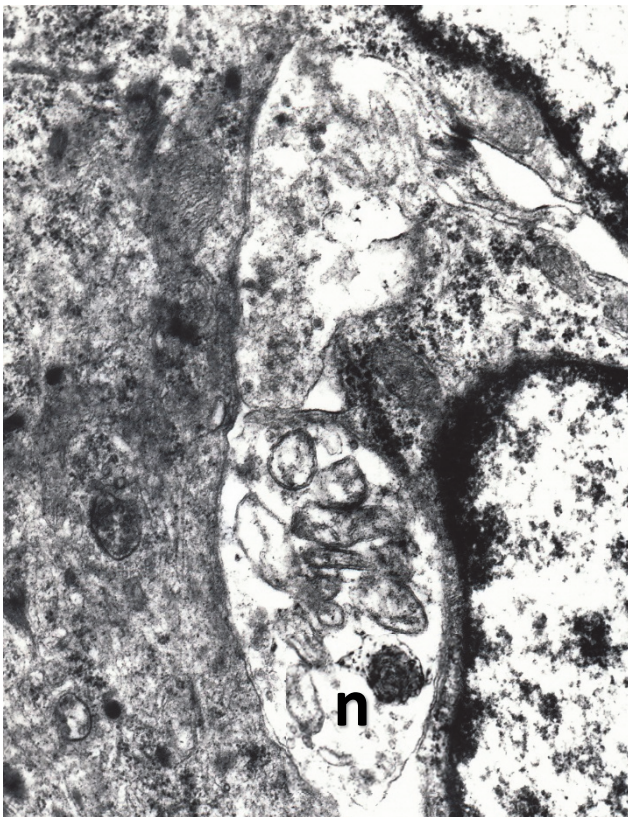


Figura 37.- Célula Tipo III de una
vallada tratada con sacarina en la
que se aprecia una unión sináptica
con el axón (n). 2.500X.

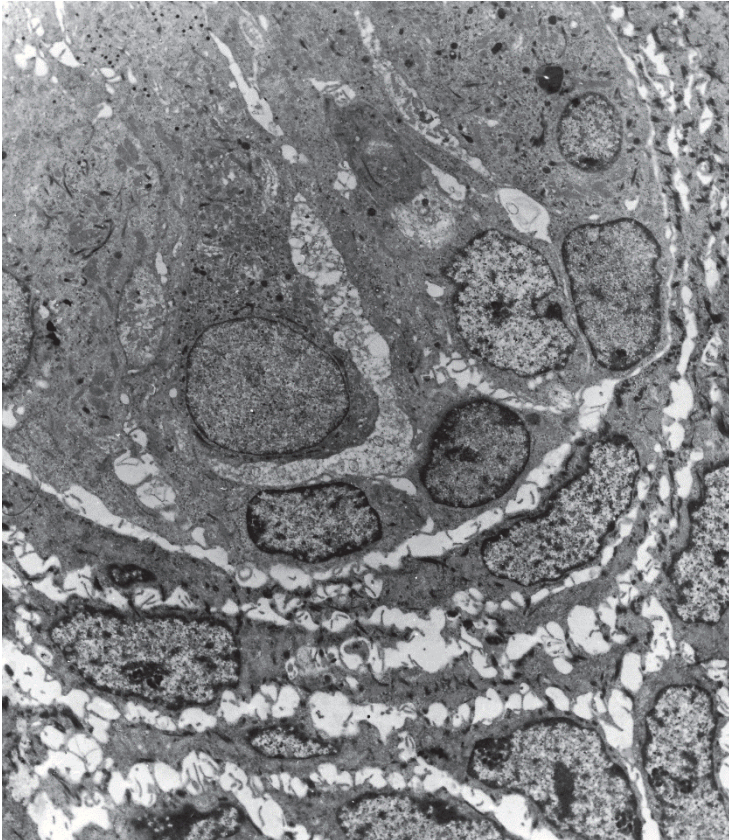


Figura 38.- Células tipo I y III de una papila foliada control. 1.800X

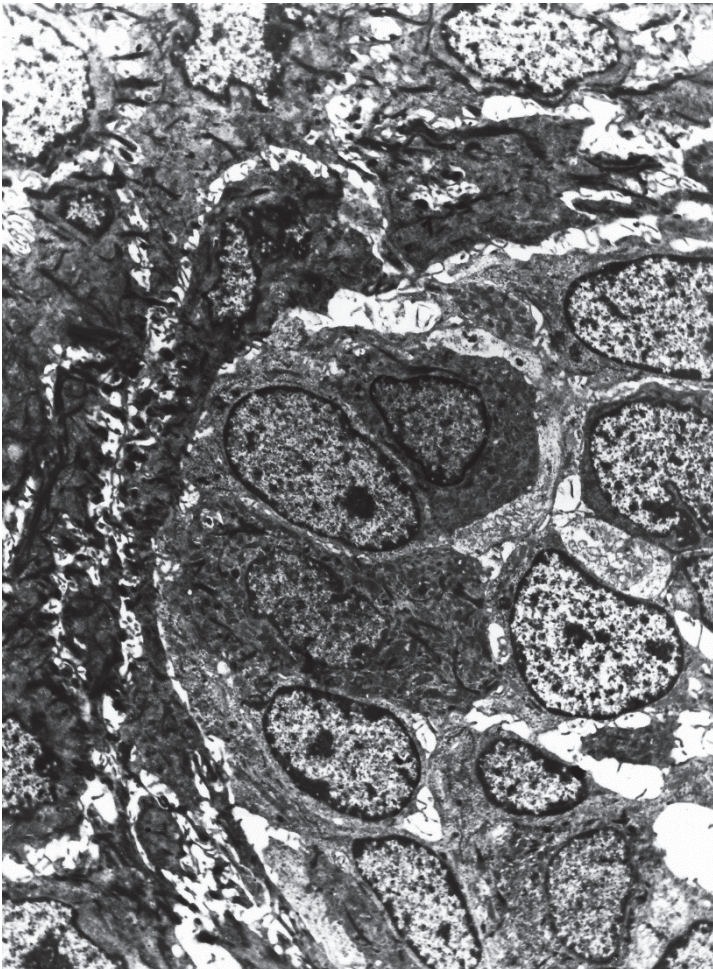


Figura 39.- Zona basal de una célula tipo II de yema foliada tratada con sacarina.

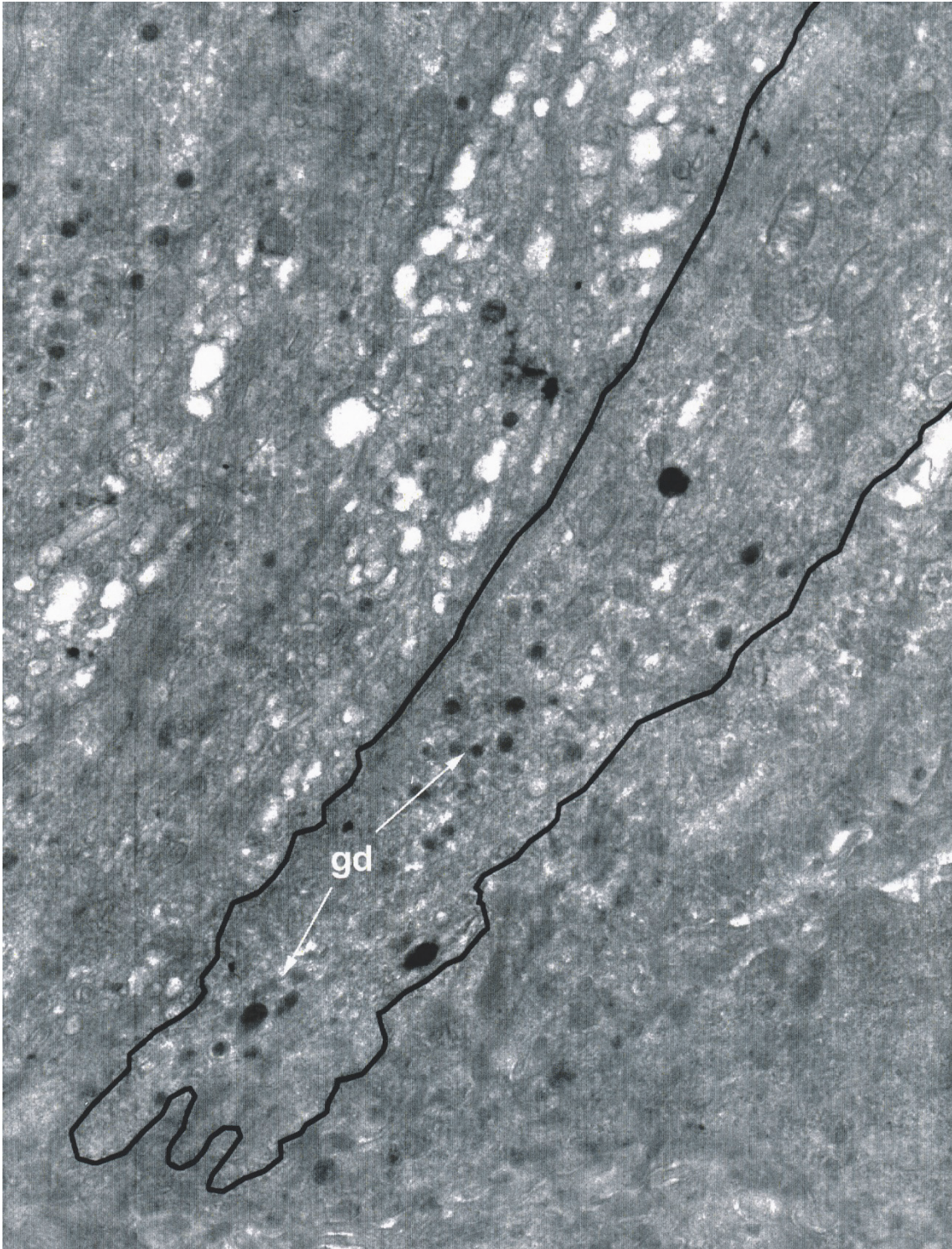


Figura 40.- Célula tipo I de papila vallada tratada con sacarina en la que se aprecian gránulos densos (gd). 8.000X.

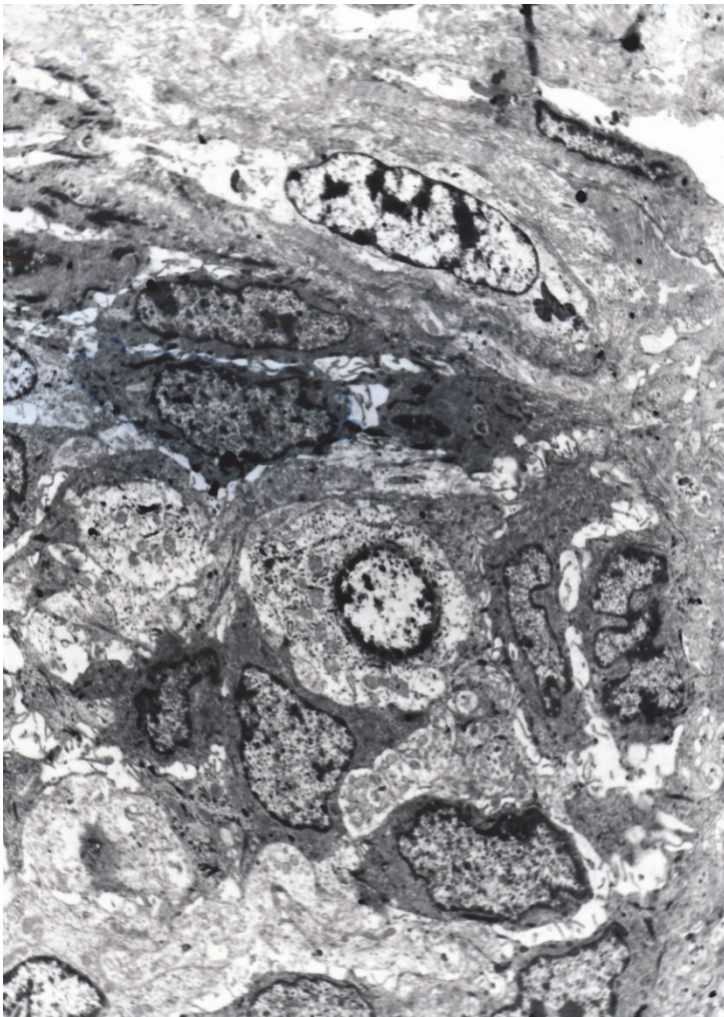


Figura 41.- Células tipo II y III de una papila fungiforme tratada con sacarina. 2.000X.

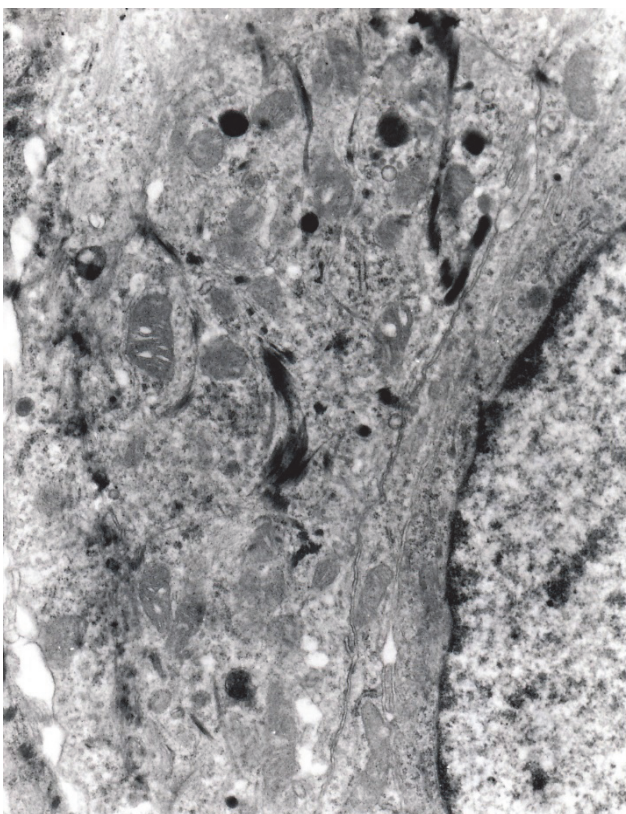


Figura 42.- Célula tipo II de una papila vallada control. 8.000X

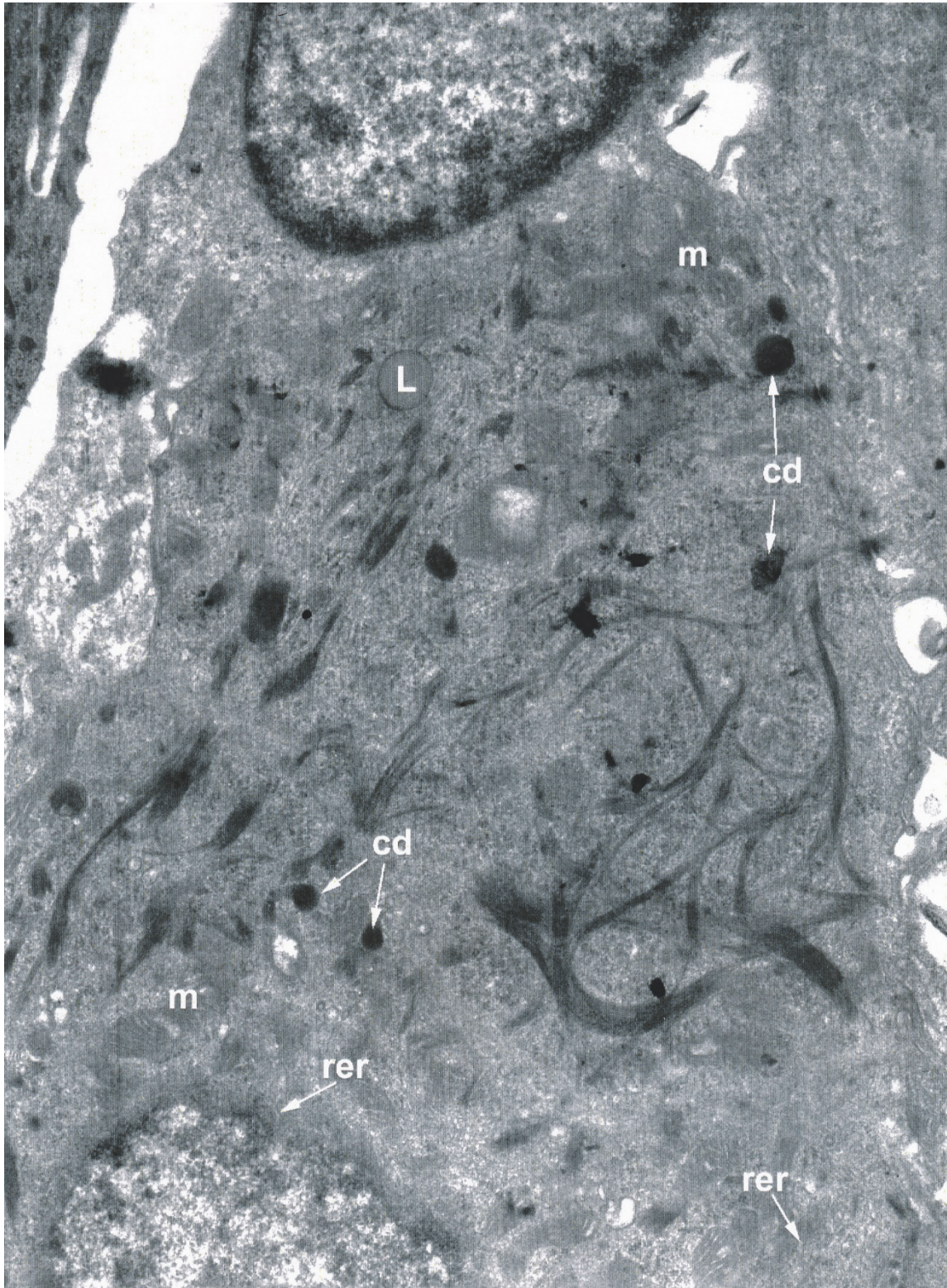


Figura 43.- Célula tipo II de una papila vallada tratada con sacarina en la que se aprecian cuerpos densos (cd), lipídicos (L), mitocondrias (m) y retículo endoplásmico rugoso (rer). 2.000X.

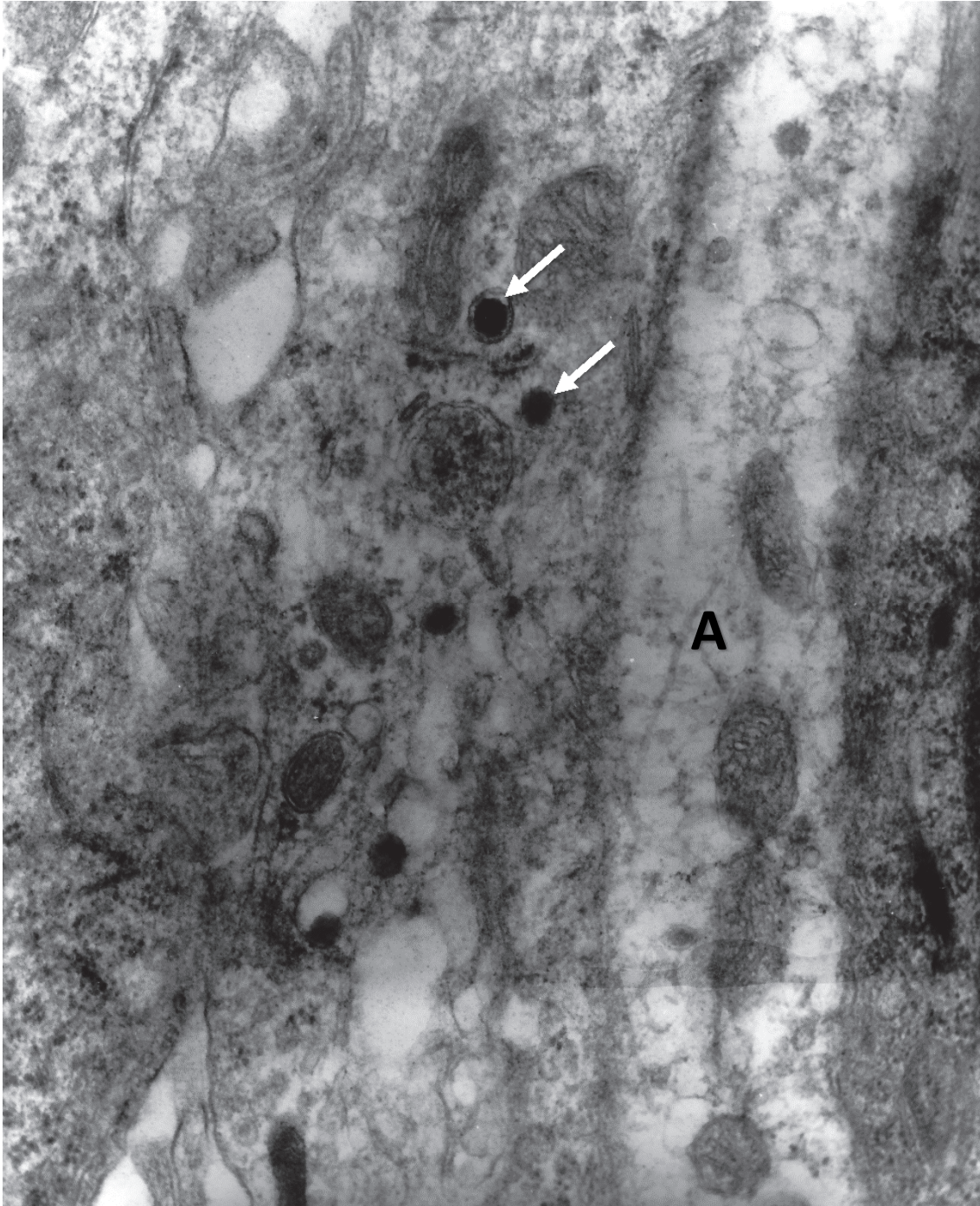


Figura 44.- Vesículas nucleodensas (flechas) y axón (A) en una célula tipo III de papila vallada tratada con sacarina. 26.090X.

9.2. – Tablas y Gráficos

Tablas 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11 y 12:

Parámetros de cada tipo celular (T1, T2, T3) de cada papila, tanto en control como en tratamiento con sacarina.

Letras del mismo tipo distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

a, b, c, Letras minúsculas comparan el mismo tipo celular de distintas papilas con el mismo tratamiento.

A, B, C Letras mayúsculas comparan los tipos celulares de la misma papila y con el mismo tratamiento.

α , β , δ Letras griegas comparan cada tipo celular de la misma papila control y sacarina.

Tablas 5, 6, 13, 14, 15 y 16:

Parámetros de cada tipo celular indicado (T1 y/o T2 y/o T3) de cada papila, tanto en control como en tratamiento con sacarina.

Letras del mismo tipo distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

a, b, c, Letras minúsculas comparan el mismo tipo celular de distintas papilas con el mismo tratamiento.

α , β , δ Letras griegas comparan cada tipo celular de la misma papila control y sacarina.

Tablas y Gráficos 17 a 21:

En estas tablas y gráficos se representan sobre una base numérica decimal o porcentual (respectivamente) la distribución de cada uno de los orgánulos reseñados según el tercio Infranuclear (In), Perinuclear (Pn) y Supranuclear (Sn) de cada tipo celular.

Gráficas Boxplot:

Se incluyen todas las gráficas Boxplot para los diferentes parámetros analizados tanto del nivel 1 correspondiente a la célula y núcleo de cada tipo celular de cada papila, como del nivel 2, correspondiente a los parámetros antedichos, en ambos casos tanto para los controles como las yemas tratadas con sacarina. En dichas gráficas los puntos extremos se corresponden con el valor máximo y mínimo, la caja representa el rango intercuartílico, la media se representa como una cruz y la mediana como una línea horizontal que divide la caja; además, más allá de los límites superior e inferior, aparecen reflejados los datos “outliers” (fuera de rango).

Tabla 1.- Densidad de VOLUMEN de la CÉLULA

	Control			Sacarina		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
FOLIADA	0,084 ± 0,004 ^{a, A, α}	0,076 ± 0,006 ^{a, A, α}	0,045 ± 0,003 ^{a, B, α}	0,078 ± 0,005 ^{a, A, α}	0,056 ± 0,004 ^{a, B, β}	0,035 ± 0,002 ^{a, C, α}
FUNGIFORME	0,062 ± 0,004 ^{b, A, α}	0,064 ± 0,004 ^{a, A, α}	0,058 ± 0,003 ^{a, A, α}	0,049 ± 0,004 ^{b, A, α}	0,05 ± 0,005 ^{a, A, α}	0,036 ± 0,003 ^{a, A, β}
VALLADA	0,077 ± 0,004 ^{a, A, α}	0,072 ± 0,006 ^{a, AB, α}	0,053 ± 0,003 ^{b, B, α}	0,071 ± 0,005 ^{a, A, α}	0,061 ± 0,005 ^{a, A, α}	0,042 ± 0,003 ^{a, B, α}

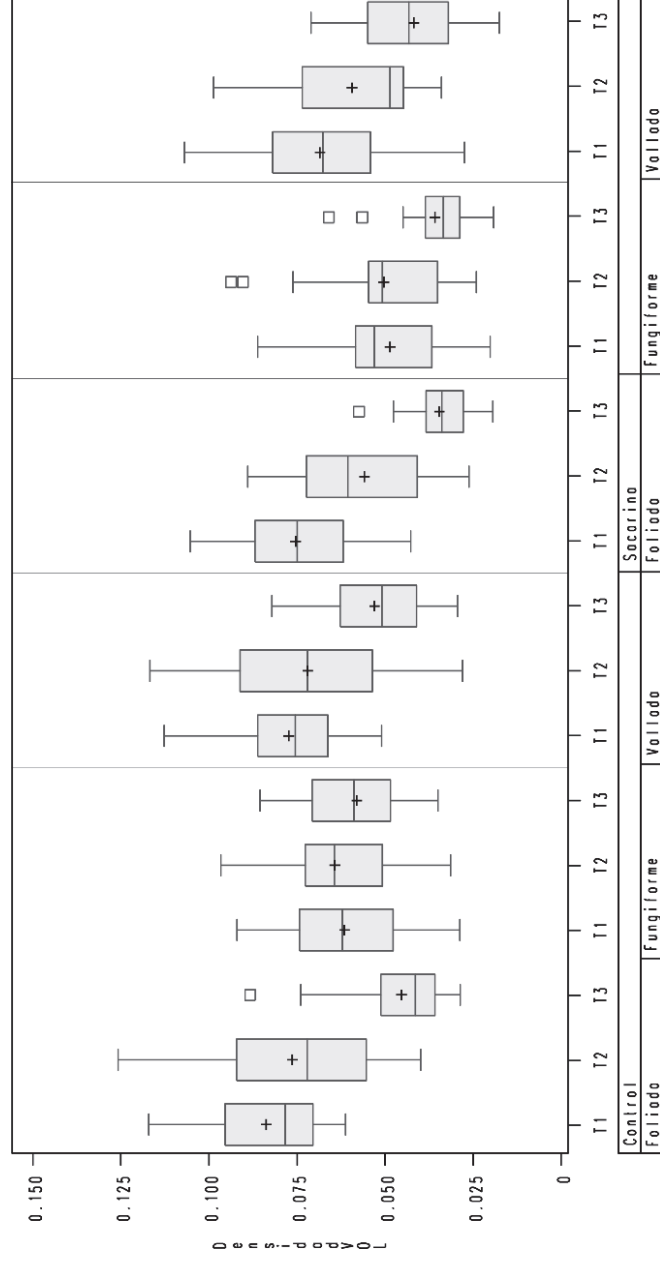


Gráfico 1.- Densidad de volumen de la célula.

Tabla 2.- COEFICIENTE DE FORMA DE LA CÉLULA

	Control			Sacarina		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
FOLIADA	0,251 ± 0,031 ^{a, A, α}	0,581 ± 0,037 ^{a, B, α}	0,476 ± 0,038 ^{a, B, α}	0,308 ± 0,024 ^{a, A, α}	0,627 ± 0,027 ^{a, B, α}	0,566 ± 0,039 ^{a, B, α}
FUNGIFORME	0,252 ± 0,018 ^{a, A, α}	0,559 ± 0,035 ^{a, B, α}	0,393 ± 0,022 ^{a, A, α}	0,430 ± 0,019 ^{a, A, β}	0,667 ± 0,038 ^{a, B, α}	0,590 ± 0,036 ^{a, AB, α}
VALLADA	0,374 ± 0,030 ^{a, A, α}	0,542 ± 0,048 ^{a, B, α}	0,429 ± 0,041 ^{a, AB, α}	0,283 ± 0,021 ^{a, A, α}	0,611 ± 0,031 ^{a, B, α}	0,484 ± 0,033 ^{a, B, α}

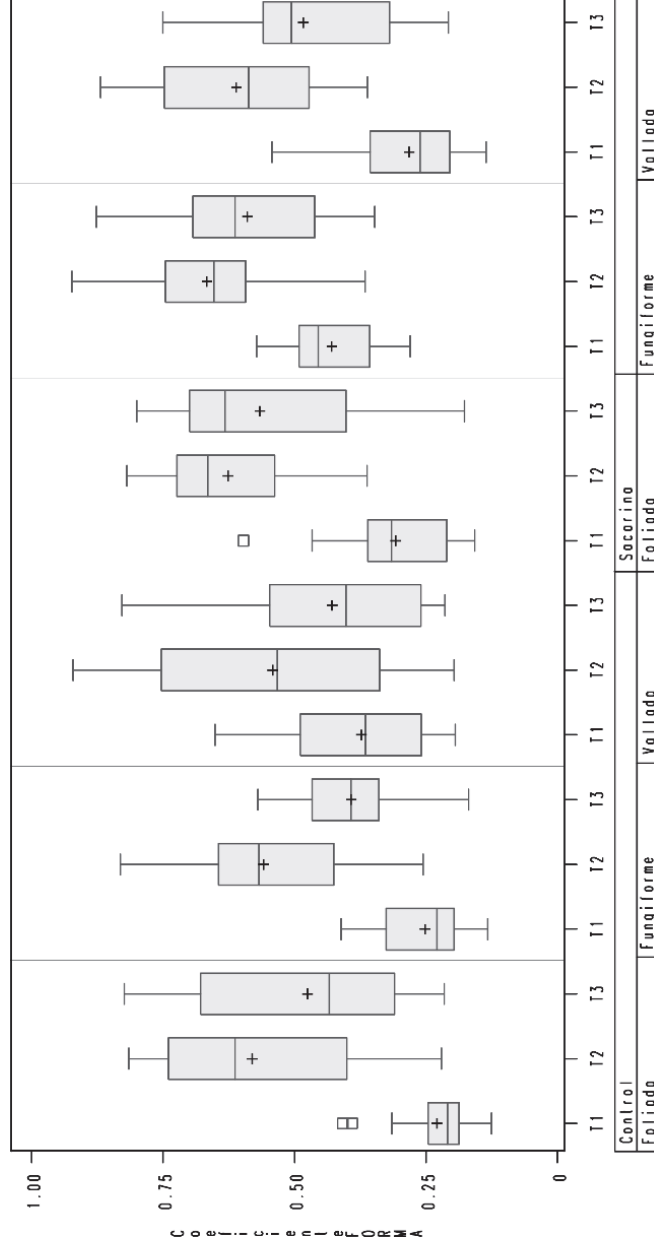


Gráfico 2.- Coeficiente de forma de la célula.

Tabla 3.- DENSIDAD DE VOLUMEN del NÚCLEO

	Control			Sacarina		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
FOLIADA	0,268 ± 0,014 ^{a, A, α}	0,351 ± 0,031 ^{a, AB, α}	0,435 ± 0,021 ^{a, B, α}	0,289 ± 0,022 ^{a, A, α}	0,438 ± 0,028 ^{a, B, α}	0,493 ± 0,019 ^{a, B, α}
FUNGIFORME	0,339 ± 0,026 ^{a, A, α}	0,384 ± 0,026 ^{a, A, α}	0,347 ± 0,018 ^{a, A, α}	0,429 ± 0,027 ^{b, A, α}	0,346 ± 0,034 ^{a, A, α}	0,467 ± 0,020 ^{a, A, α}
VALLADA	0,285 ± 0,026 ^{a, A, α}	0,354 ± 0,026 ^{a, A, α}	0,406 ± 0,021 ^{a, A, α}	0,274 ± 0,019 ^{a, A, α}	0,446 ± 0,032 ^{a, B, α}	0,463 ± 0,027 ^{a, B, α}

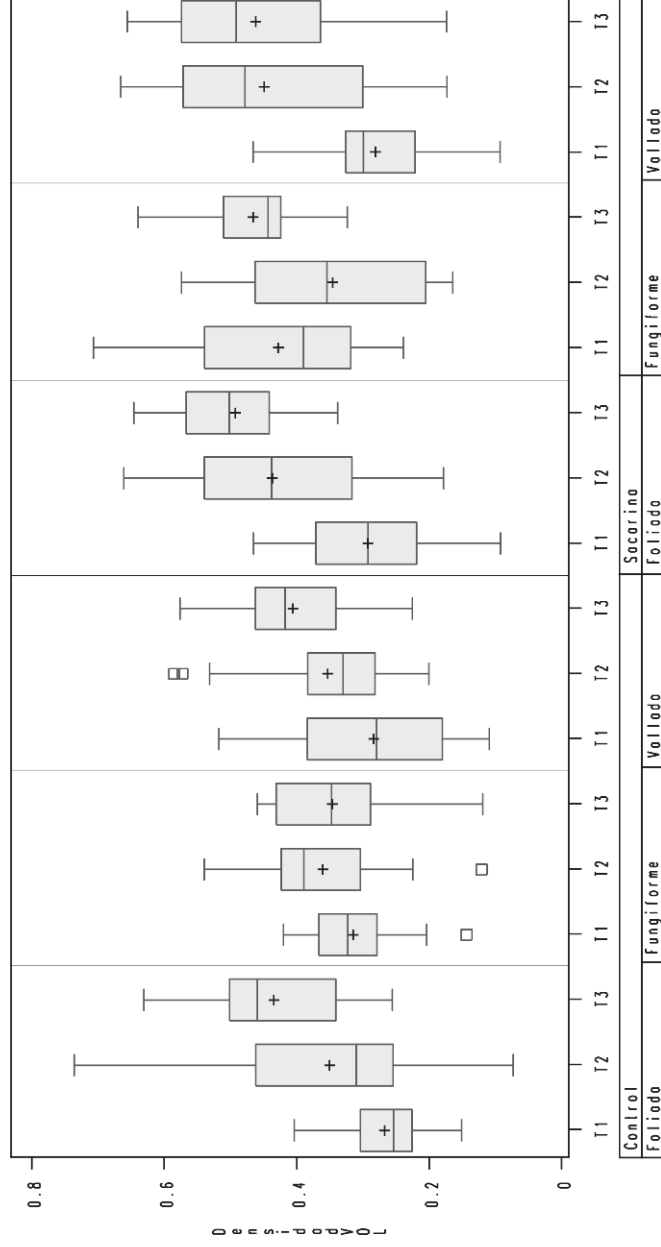


Gráfico 3.- Densidad de volumen del núcleo.

Tabla 4.- DENSIDAD DE SUPERFICIE del NÚCLEO

	Control			Sacarina		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
FOLIADA	0,249 ± 0,014 ^{a, A, α}	0,276 ± 0,019 ^{a, A, α}	0,418 ± 0,019 ^{a, B, α}	0,251 ± 0,016 ^{a, A, α}	0,360 ± 0,025 ^{a, B, α}	0,544 ± 0,028 ^{a, C, β}
FUNGIFORME	0,352 ± 0,013 ^{a, A, α}	0,317 ± 0,015 ^{a, A, α}	0,367 ± 0,018 ^{a, A, α}	0,428 ± 0,023 ^{b, AB, α}	0,368 ± 0,038 ^{a, A, α}	0,525 ± 0,027 ^{a, B, β}
VALLADA	0,246 ± 0,016 ^{a, A, α}	0,283 ± 0,025 ^{a, A, α}	0,399 ± 0,026 ^{a, B, α}	0,269 ± 0,017 ^{a, A, α}	0,339 ± 0,022 ^{a, A, α}	0,464 ± 0,024 ^{a, B, α}

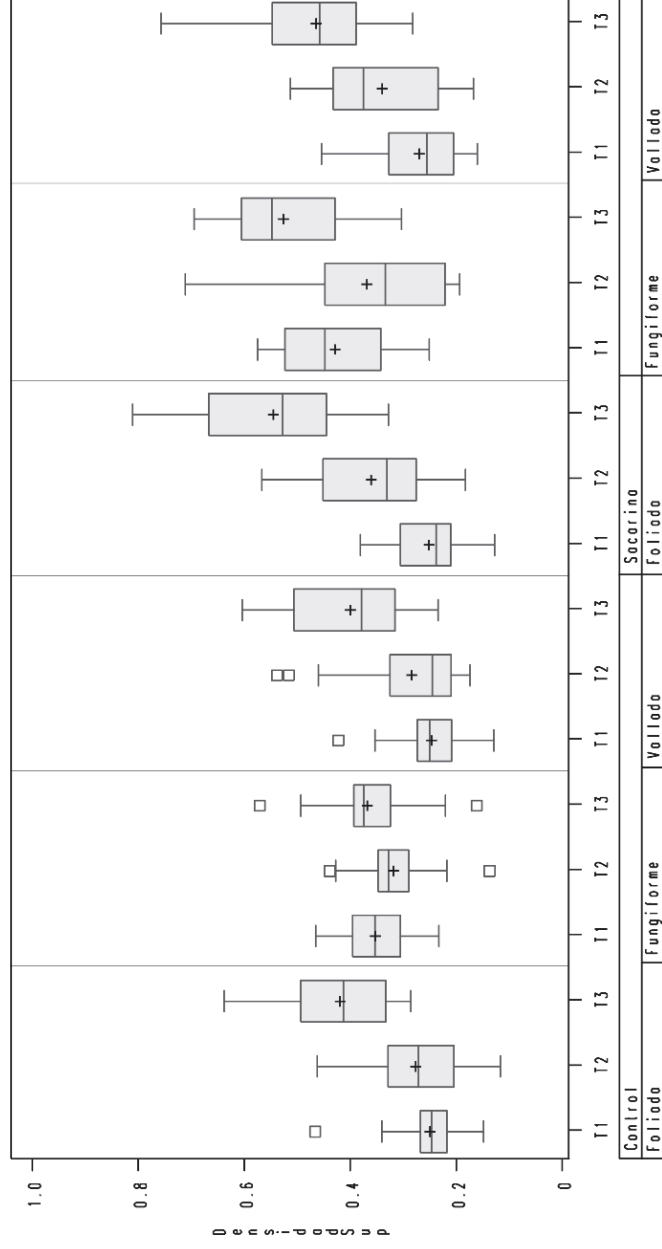


Gráfico 4.- Densidad de superficie del núcleo

Tabla 5.-Densidad NUMERICA de los GRÁNULOS DENSOS

	Control	Sacarina
	T1	T1
FOLIADA	0,05 ± 0,004 ^{a, α}	0,059 ± 0,01 ^{a, α}
FUNGIFORME	0,053 ± 0,013 ^{a, α}	0,039 ± 0,003 ^{a, α}
VALLADA	0,03 ± 0,002 ^{a, α}	0,062 ± 0,008 ^{a, α}

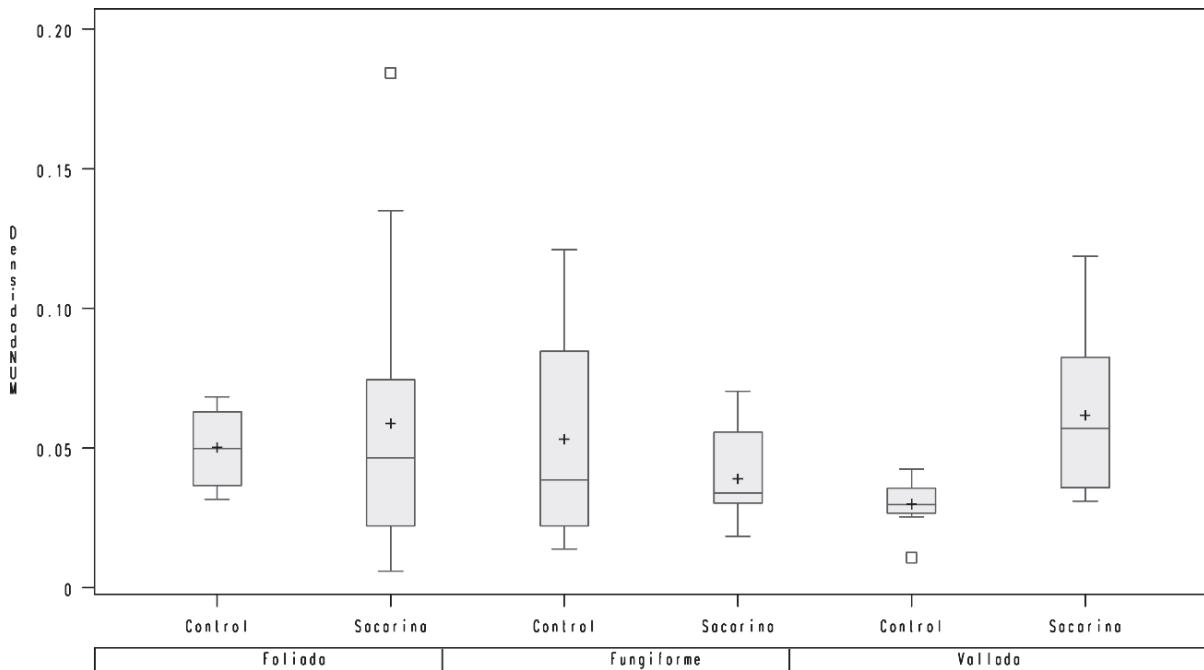


Gráfico 5.- Densidad numérica de los gránulos densos.

Tabla 6.- Densidad de VOLUMEN de los GRÁNULOS DENSOS

	Control	Sacarina
	T1	T1
FOLIADA	0,004 ± 0,001 ^{a, α}	0,006 ± 0,001 ^{a, α}
FUNGIFORME	0,003 ± 0,001 ^{a, α}	0,003 ± 0,001 ^{a, α}
VALLADA	0,002 ± 0,001 ^{a, α}	0,005 ± 0,001 ^{a, α}

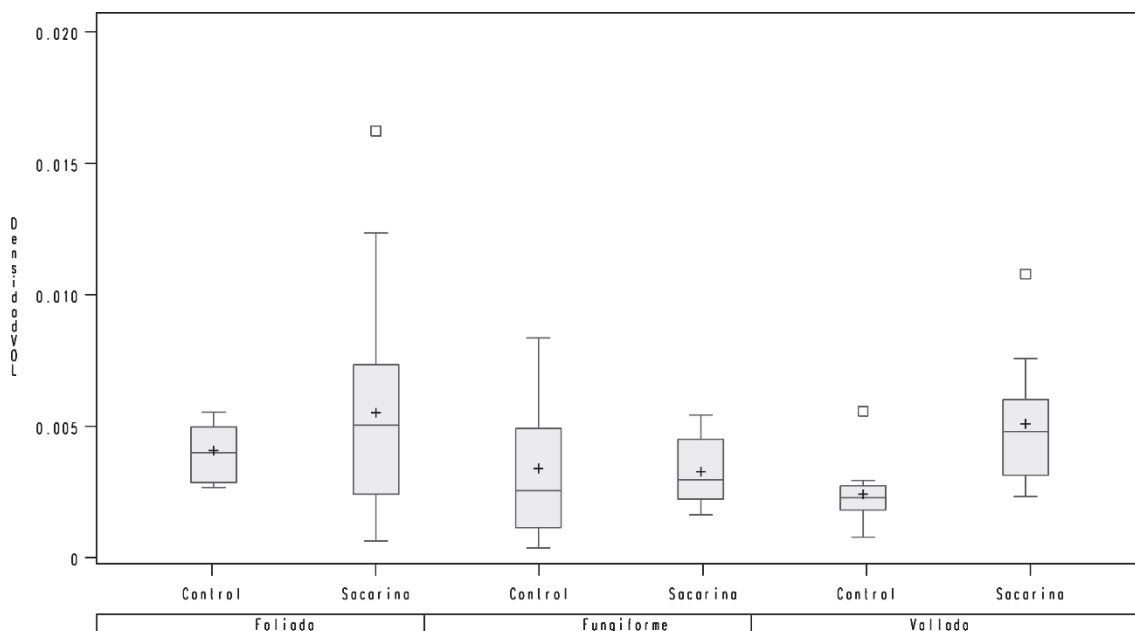


Gráfico 6.- Densidad de volumen de los gránulos densos.

Tabla 7.- Densidad de VOLUMEN del APARATO DE GOLGI

	Control			Sacarina		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
FOLIADA	0,038 ± 0,007 ^{a, A, α}	0,019 ± 0,003 ^{a, A, α}	0,018 ± 0,002 ^{a, A, α}	0,023 ± 0,004 ^{a, A, α}	0,028 ± 0,003 ^{a, A, α}	0,024 ± 0,003 ^{a, A, α}
FUNGIFORME	0,014 ± 0,006 ^{a, A, α}	0,024 ± 0,002 ^{a, A, α}	0,026 ± 0,004 ^{a, A, α}	0,016 ± 0,002 ^{a, A, α}	0,021 ± 0,006 ^{a, A, α}	0,022 ± 0,003 ^{a, A, α}
VALLADA	0,02 ± 0,005 ^{a, A, α}	0,017 ± 0,004 ^{a, A, α}	0,029 ± 0,018 ^{a, A, α}	0,024 ± 0,004 ^{a, A, α}	0,023 ± 0,003 ^{a, A, α}	0,026 ± 0,004 ^{a, A, α}

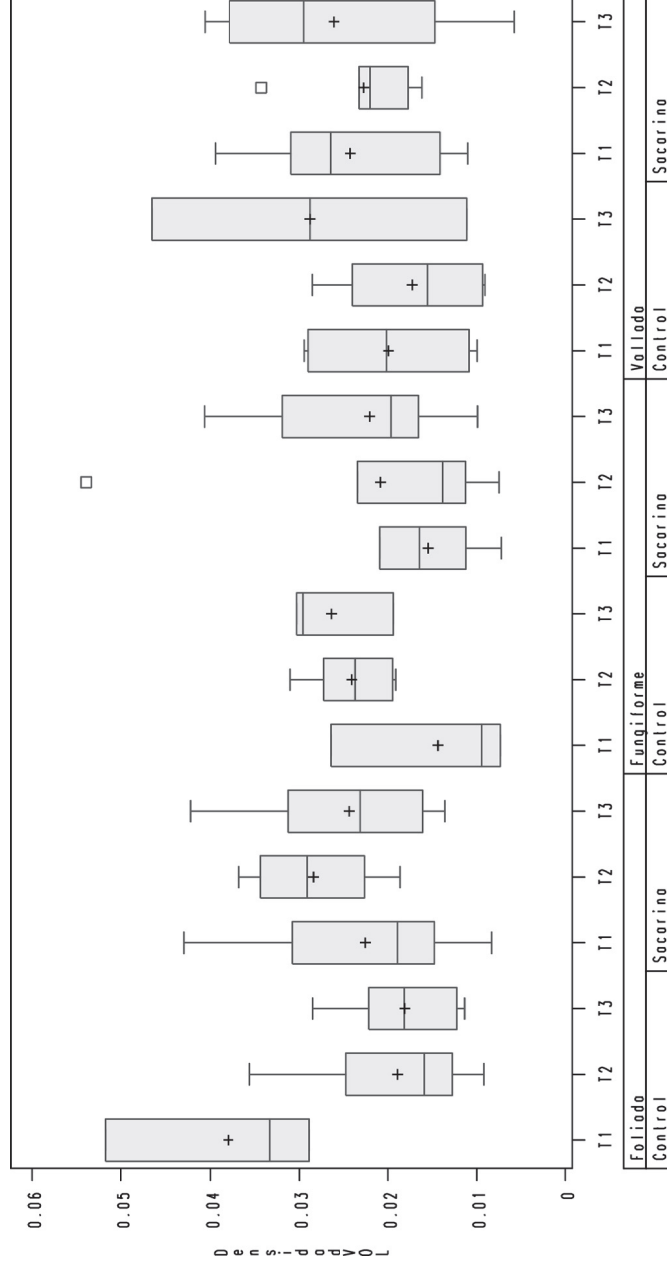


Gráfico 7.- Densidad de volumen del aparato de Golgi

Tabla 8.- Densidad de SUPERFICIE del APARATO DE GOLGI

	Control			Sacarina		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
FOLIADA	0,059 ± 0,012 ^{a, A, α}	0,024 ± 0,004 ^{b, B, α}	0,025 ± 0,004 ^{b, B, α}	0,03 ± 0,005 ^{a, A, α}	0,031 ± 0,004 ^{a, A, α}	0,029 ± 0,003 ^{a, A, α}
FUNGIFORME	0,027 ± 0,007 ^{ab, A, α}	0,03 ± 0,005 ^{a, A, α}	0,035 ± 0,007 ^{a, A, α}	0,023 ± 0,003 ^{a, A, α}	0,026 ± 0,007 ^{a, A, α}	0,028 ± 0,004 ^{a, A, α}
VALLADA	0,025 ± 0,006 ^{b, A, α}	0,019 ± 0,003 ^{a, A, α}	0,038 ± 0,009 ^{a, A, α}	0,035 ± 0,005 ^{a, A, α}	0,022 ± 0,003 ^{a, A, α}	0,033 ± 0,003 ^{a, A, α}

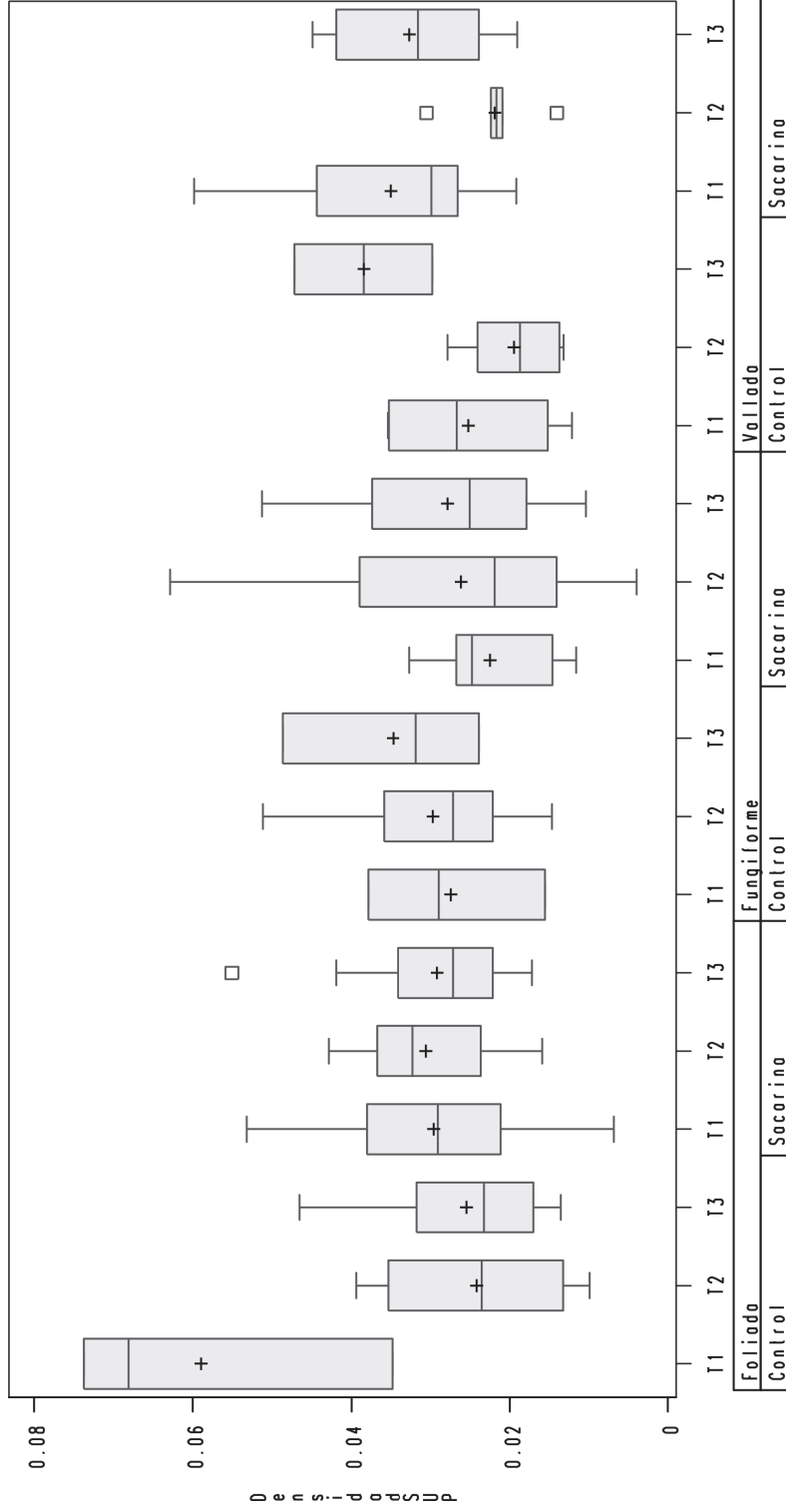


Gráfico 8.- Densidad de superficie del aparato de Golgi.

Tabla 9.- Densidad de VOLUMEN de las MITOCONDRIAS

	Control			Sacarina		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
FOLIADA	0,097 ± 0,008 ^{a,A,α}	0,1 ± 0,011 ^{a,A,α}	0,075 ± 0,011 ^{a,A,α}	0,126 ± 0,013 ^{a,A,α}	0,128 ± 0,012 ^{a,A,α}	0,151 ± 0,009 ^{a,A,β}
FUNGIFORME	0,107 ± 0,014 ^{a,A,α}	0,161 ± 0,013 ^{b,B,α}	0,131 ± 0,01 ^{b,AB,α}	0,093 ± 0,007 ^{a,AB,α}	0,108 ± 0,009 ^{a,A,β}	0,077 ± 0,011 ^{b,B,β}
VALLADA	0,125 ± 0,011 ^{a,A,α}	0,144 ± 0,013 ^{ab,A,α}	0,109 ± 0,009 ^{ab,A,α}	0,126 ± 0,009 ^{a,A,α}	0,113 ± 0,011 ^{a,A,α}	0,112 ± 0,011 ^{ab,A,α}

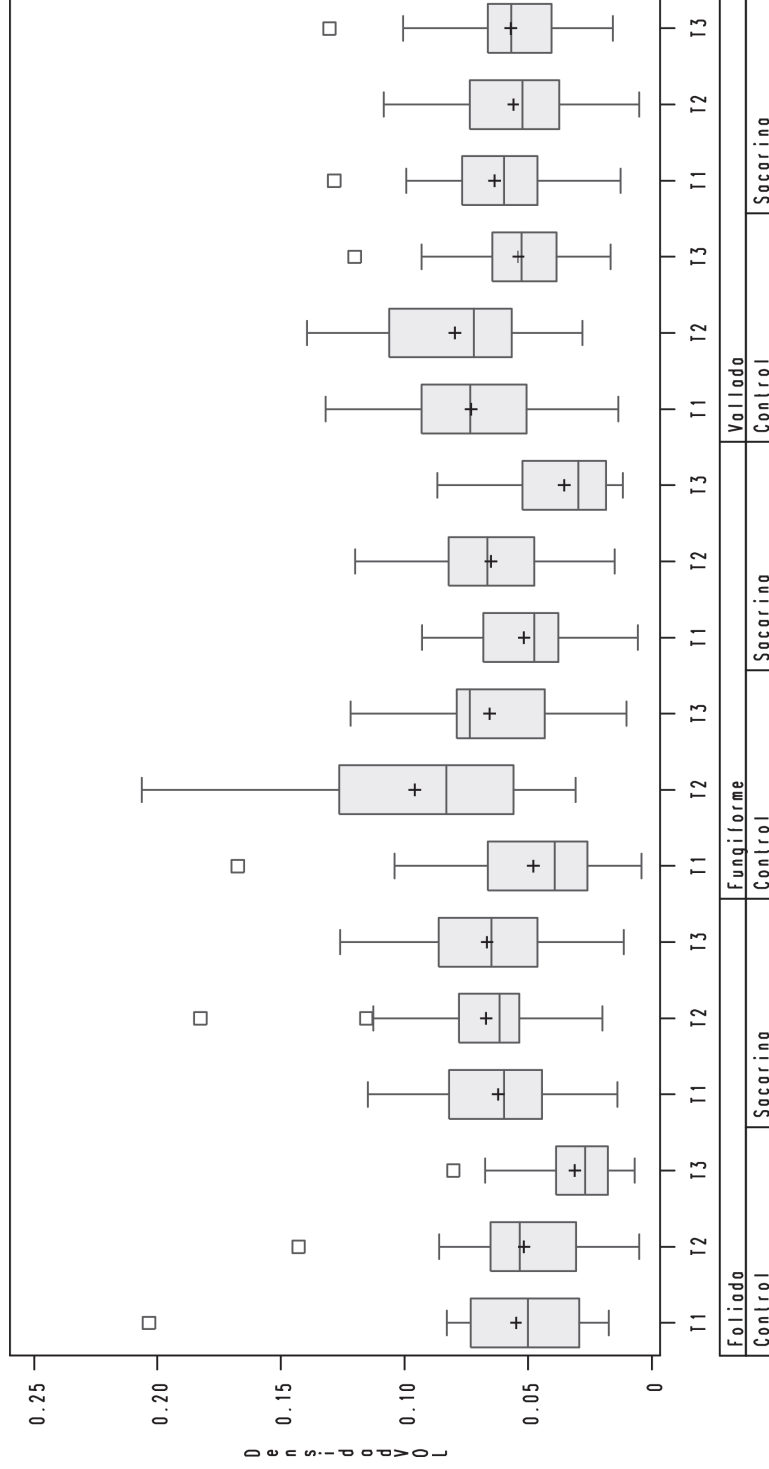


Gráfico 9.- Densidad de volumen de las mitocondrias

Tabla 10.- Densidad NUMÉRICA de las MITOCONDRIAS

	Control			Sacarina		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
FOLIADA	0,054 ± 0,007 ^{a, A, α}	0,051 ± 0,005 ^{a, A, α}	0,031 ± 0,004 ^{a, A, α}	0,062 ± 0,005 ^{a, A, α}	0,066 ± 0,006 ^{a, A, α}	0,066 ± 0,005 ^{a, A, β}
FUNGIFORME	0,047 ± 0,006 ^{a, A, α}	0,095 ± 0,009 ^{b, B, α}	0,065 ± 0,005 ^{c, A, α}	0,051 ± 0,004 ^{a, A, α}	0,065 ± 0,005 ^{a, A, β}	0,035 ± 0,004 ^{a, B, β}
VALLADA	0,073 ± 0,005 ^{a, A, α}	0,079 ± 0,006 ^{a, C, α}	0,053 ± 0,005 ^{a, A, α}	0,063 ± 0,004 ^{a, A, α}	0,055 ± 0,005 ^{a, A, α}	0,057 ± 0,006 ^{a, C, α}

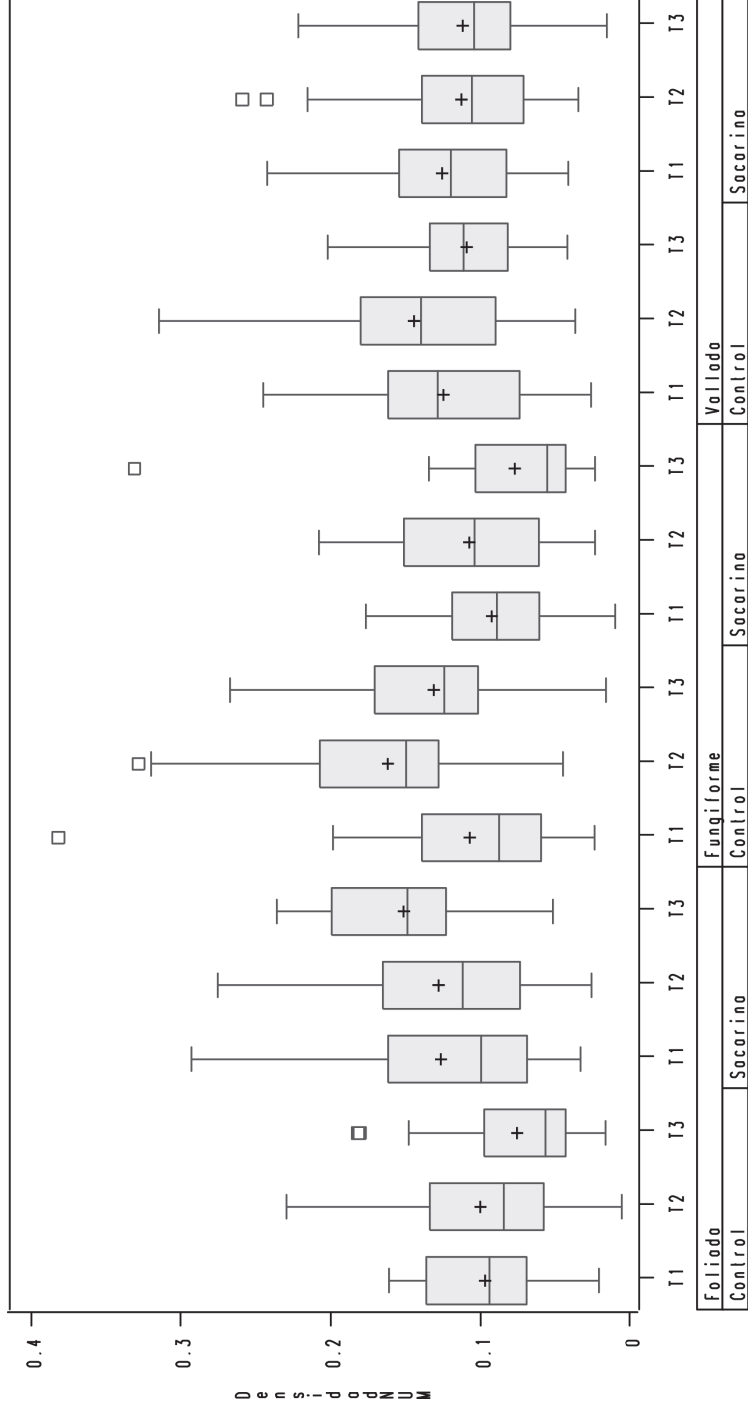


Gráfico 10.- Densidad numérica de las mitocondrias

Tabla 11.- Densidad NUMÉRICA del RETÍCULO ENDOPLÁSMICO RUGOSO

	Control			Sacarina		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
FOLIADA	0,131 ± 0,017 ^{a, A, α}	0,049 ± 0,007 ^{a, A, α}	0,086 ± 0,014 ^{a, A, α}	0,156 ± 0,016 ^{a, A, α}	0,164 ± 0,023 ^{a, A, β}	0,142 ± 0,013 ^{a, A, α}
FUNGIFORME	0,135 ± 0,015 ^{a, A, α}	0,099 ± 0,015 ^{b, A, α}	0,099 ± 0,011 ^{a, A, α}	0,108 ± 0,012 ^{a, A, α}	0,075 ± 0,009 ^{b, A, α}	0,118 ± 0,016 ^{a, A, α}
VALLADA	0,107 ± 0,011 ^{a, A, α}	0,073 ± 0,011 ^{a, A, α}	0,144 ± 0,019 ^{a, A, α}	0,107 ± 0,015 ^{a, A, α}	0,148 ± 0,025 ^{a, A, α}	0,156 ± 0,018 ^{a, A, α}

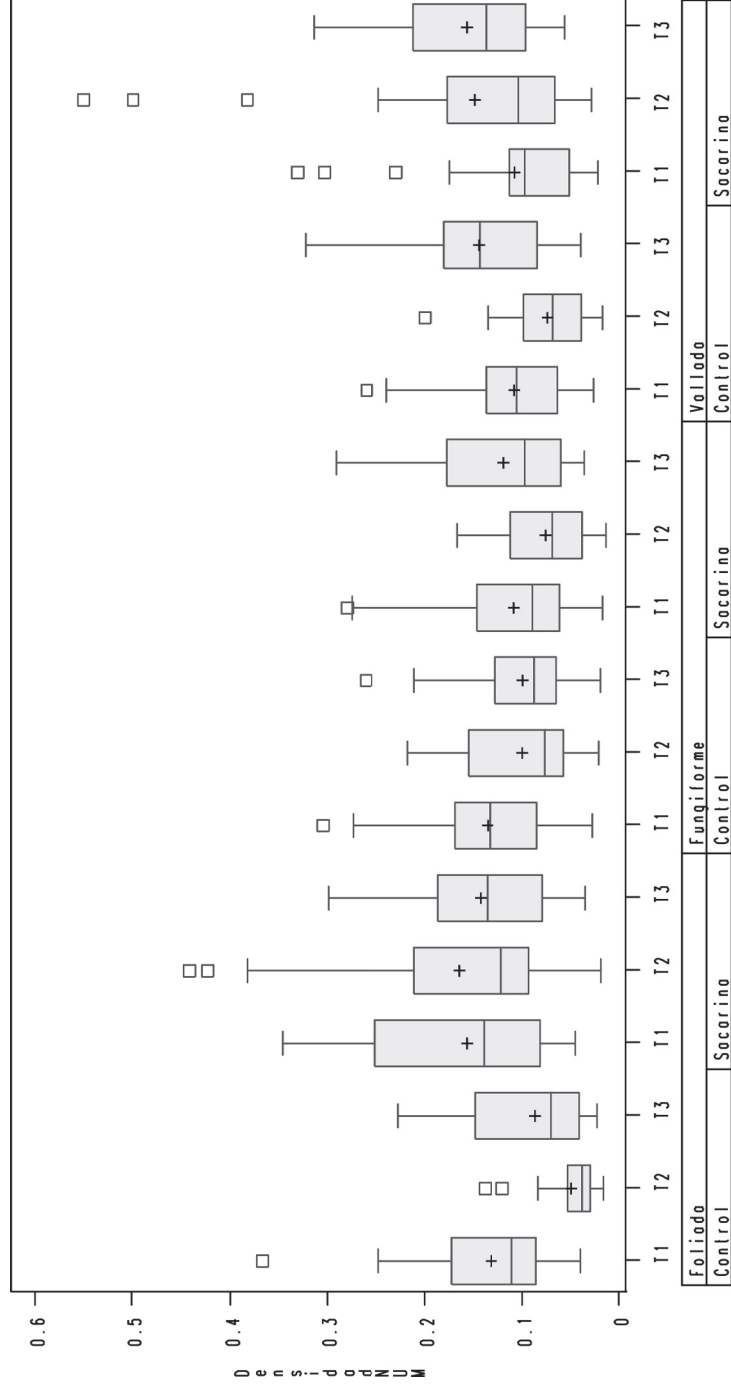


Gráfico 11.- Densidad numérica del retículo endoplásmico rugoso.

Tabla 12.- Densidad de SUPERFICIE del RETÍCULO ENDOPLÁSMICO RUGOSO

	Control			Sacarina		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
FOLIADA	0,128 ± 0,02 ^{a, A, α}	0,05 ± 0,007 ^{a, A, α}	0,105 ± 0,017 ^{a, A, α}	0,152 ± 0,016 ^{a, A, α}	0,217 ± 0,031 ^{a, A, β}	0,153 ± 0,013 ^{a, A, α}
FUNGIFORME	0,156 ± 0,016 ^{a, A, α}	0,13 ± 0,019 ^{a, A, α}	0,115 ± 0,012 ^{a, A, α}	0,117 ± 0,013 ^{a, A, α}	0,095 ± 0,01 ^{b, A, α}	0,14 ± 0,019 ^{a, A, α}
VALLADA	0,133 ± 0,014 ^{a, A, α}	0,101 ± 0,016 ^{a, A, α}	0,156 ± 0,019 ^{a, A, α}	0,116 ± 0,018 ^{a, A, α}	0,197 ± 0,032 ^{a, A, β}	0,183 ± 0,021 ^{a, A, α}

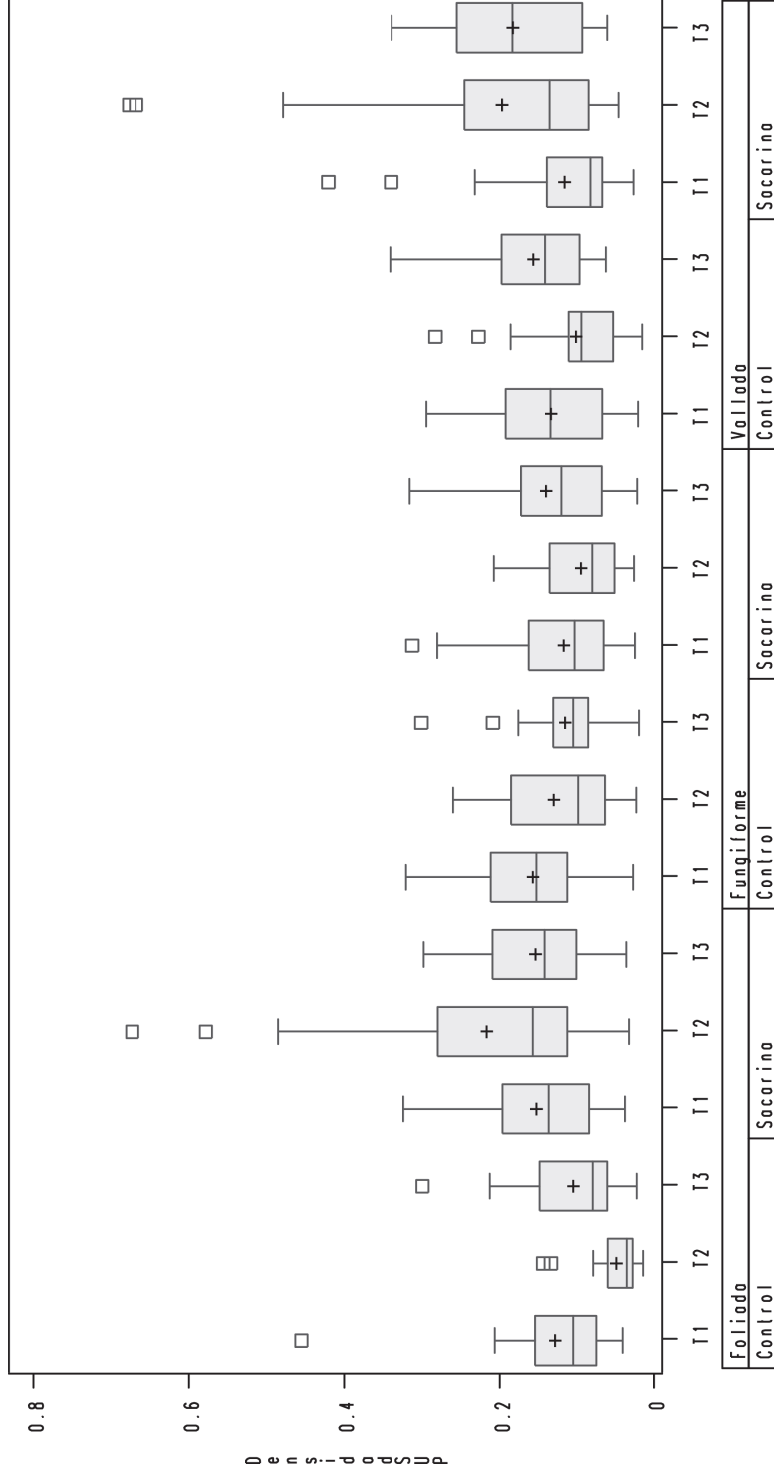


Gráfico 12.- Densidad de superficie del retículo endoplásmico rugoso.

Tabla 13.- Densidad NUMERICA de las VESÍCULAS CLARAS

	Control	Sacarina
	T3	T3
FOLIADA	0,049 ± 0,004 ^{a,α}	0,064 ± 0,006 ^{a,α}
FUNGIFORME	0,057 ± 0,009 ^{a,α}	0,069 ± 0,012 ^{a,α}
VALLADA	0,047 ± 0,008 ^{a,α}	0,051 ± 0,014 ^{a,α}

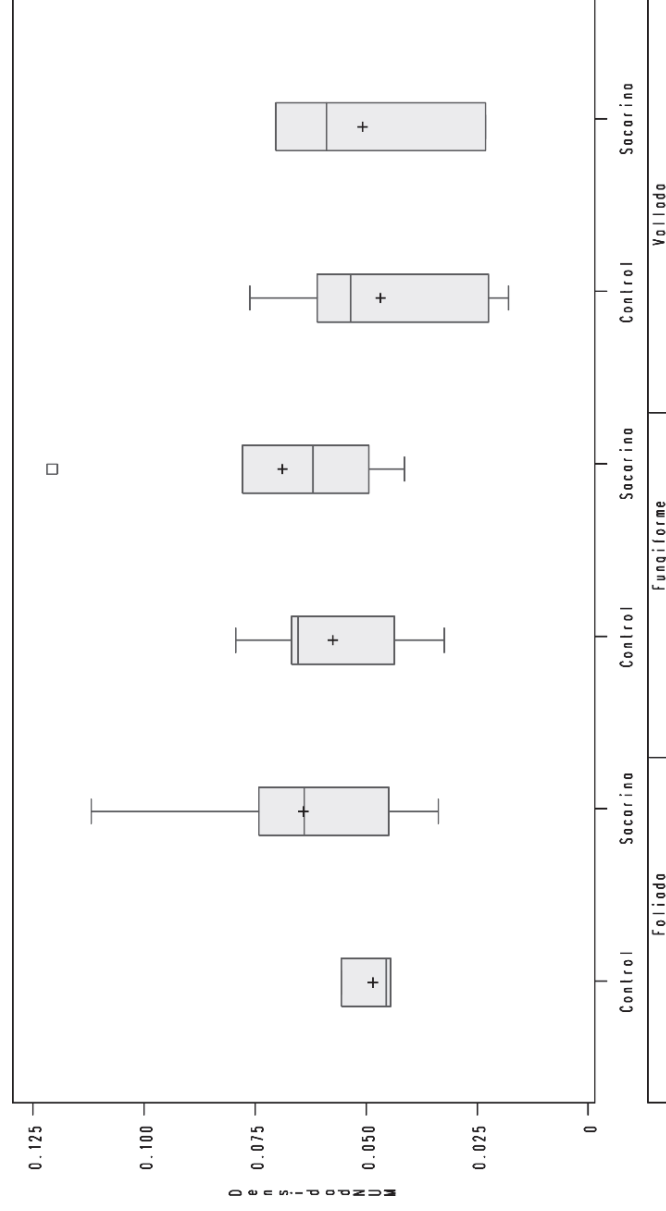


Gráfico 13.- Densidad numérica de las vesículas claras.

Tabla 14.- Densidad de VOLUMEN de las VESÍCULAS CLARAS

	Control	Sacarina
	T3	T3
FOLIADA	0,003 ± 0,001 ^{a, α}	0,003 ± 0,001 ^{a, α}
FUNGIFORME	0,002 ± 0,001 ^{a, α}	0,003 ± 0,001 ^{a, α}
VALLADA	0,002 ± 0,001 ^{a, α}	0,002 ± 0,001 ^{a, α}

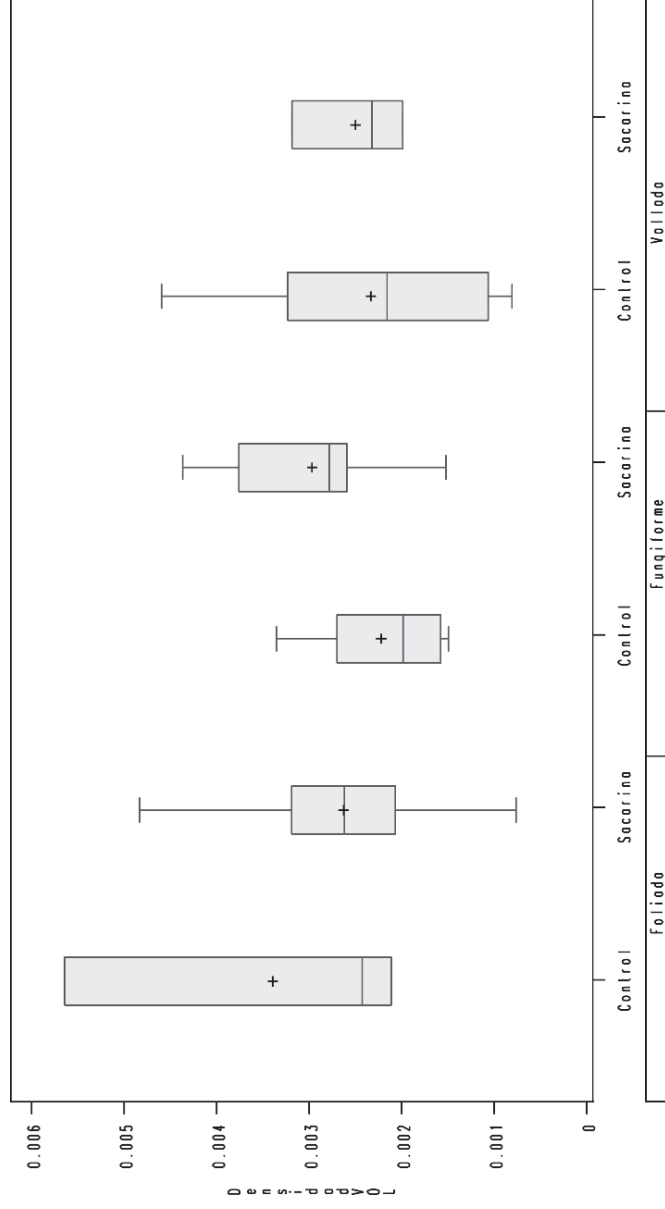


Gráfico 14.- Densidad de volumen de las vesículas claras.

Tabla 15.- Densidad NUMERICA de las VESÍCULAS NUCLEODENSAS

	Control	Sacarina
	T3	T3
FOLIADA	0,028 ± 0,007 ^{a, α}	0,046 ± 0,004 ^{a, α}
FUNGIFORME	0,08 ± 0,022 ^{b, α}	0,165 ± 0,033 ^{b, β}
VALLADA	0,053 ± 0,007 ^{ab, α}	0,069 ± 0,011 ^{a, α}

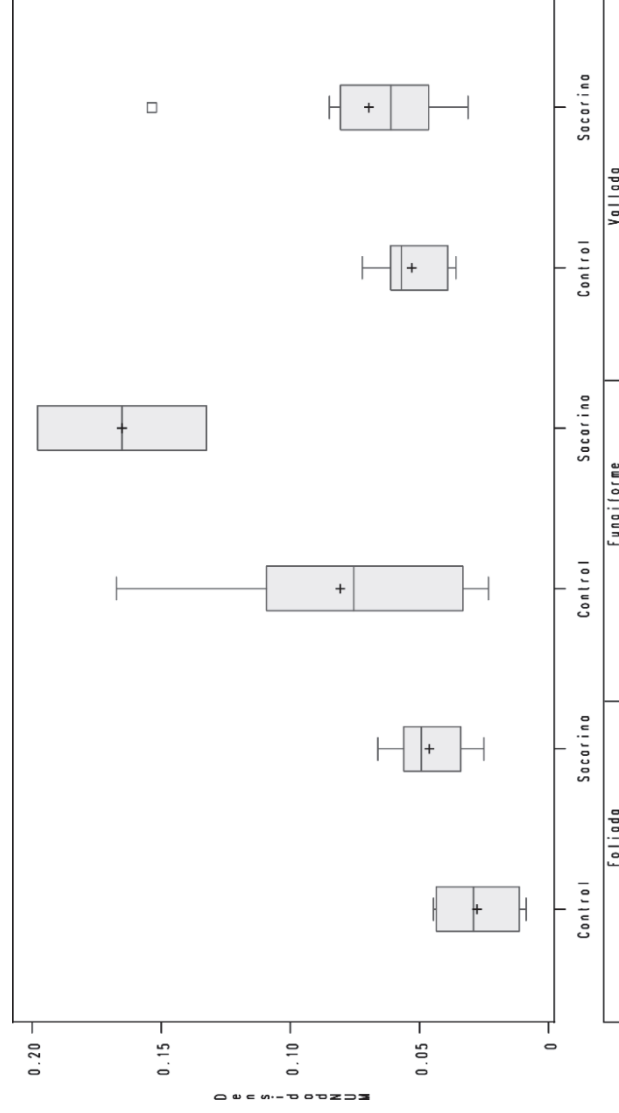


Gráfico 15.- Densidad numérica de las vesículas nucleodensas

Tabla 16.- Densidad de VOLUMEN de las VESÍCULAS NUCLEODENSAS

	Control	Sacarina
	T3	T3
FOLIADA	0,002 ± 0,001 ^{a, α}	0,004 ± 0,001 ^{a, α}
FUNGIFORME	0,004 ± 0,001 ^{a, α}	0,023 ± 0,009 ^{b, β}
VALLADA	0,003 ± 0 ^{a, α}	0,007 ± 0,001 ^{a, α}

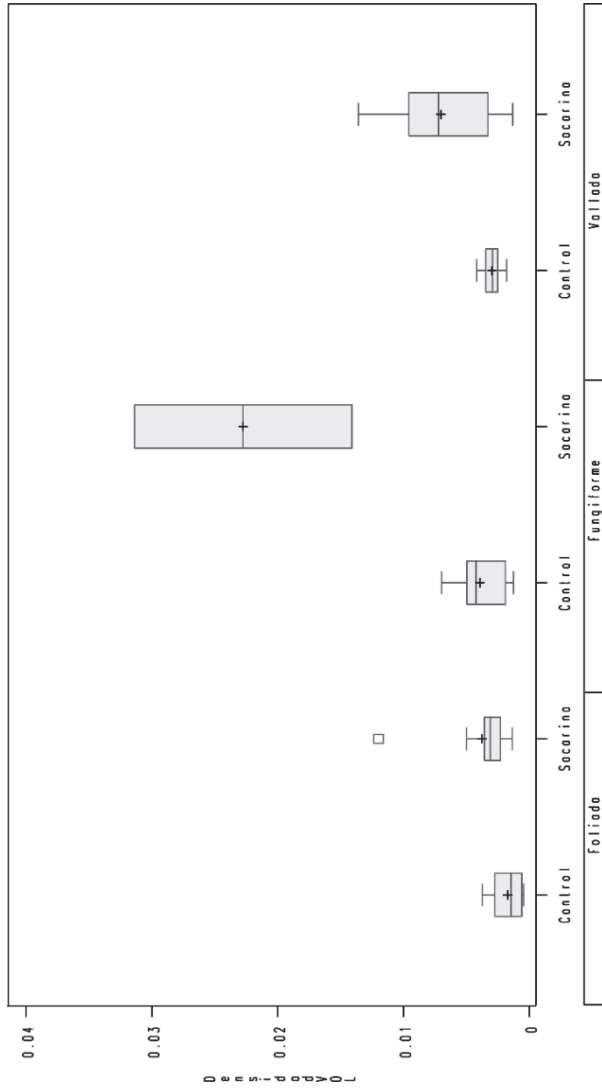


Gráfico 16.- Densidad de volumen de las vesículas nucleodensas

POLARIDAD de los GRÁNULOS DENSOS		T1		
		In	Pn	Sn
Foliada	Control		0,032	0,052
	Sacarina	0,029	0,036	0,077
Fungiforme	Control		0,022	0,057
	Sacarina	0,036	0,036	0,041
Vallada	Control	0,043	0,027	0,029
	Sacarina		0,038	0,067

Tabla 17

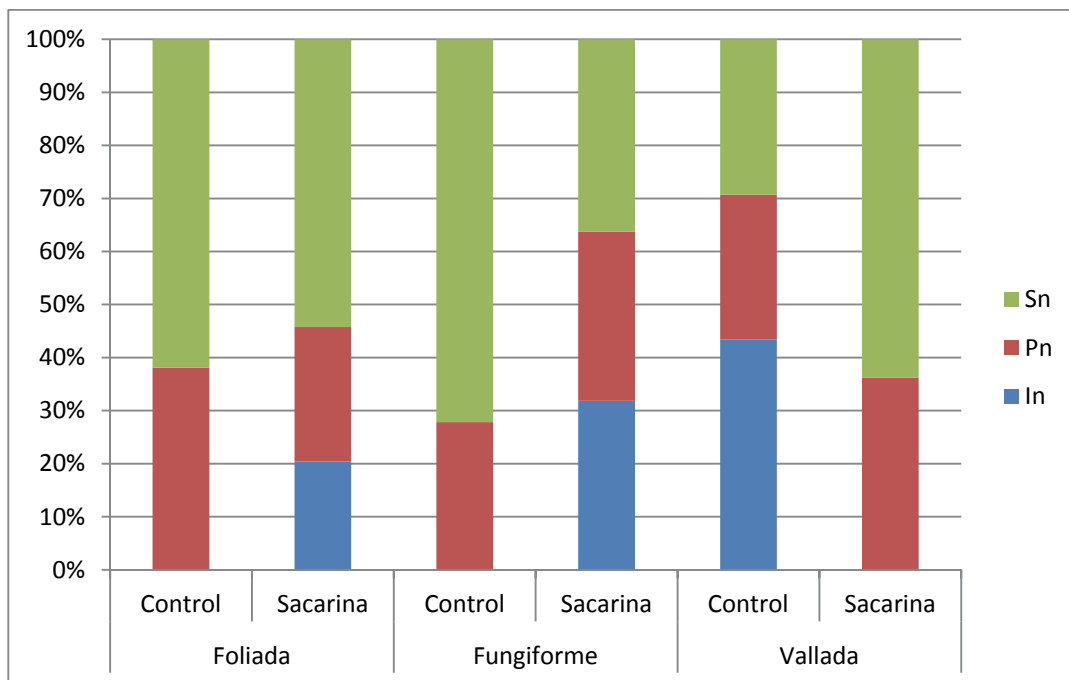


Gráfico 17.- Polaridad de los gránulos densos.

POLARIDAD de las MITOCONDRIAS		T1			T2			T3		
		In	Pn	Sn	In	Pn	Sn	In	Pn	Sn
Foliada	Control	0,112	0,081	0,099	0,080	0,091	0,132	0,106	0,052	0,073
	Sacarina	0,117	0,148	0,117	0,138	0,122	0,124	0,161	0,158	0,134
Fungiforme	Control	0,085	0,116	0,120	0,159	0,190	0,133	0,136	0,116	0,141
	Sacarina	0,081	0,088	0,107	0,091	0,100	0,135	0,071	0,070	0,088
Vallada	Control	0,115	0,130	0,130	0,136	0,178	0,128	0,103	0,115	0,110
	Sacarina	0,138	0,122	0,120	0,106	0,098	0,131	0,102	0,123	0,115

Tabla 18

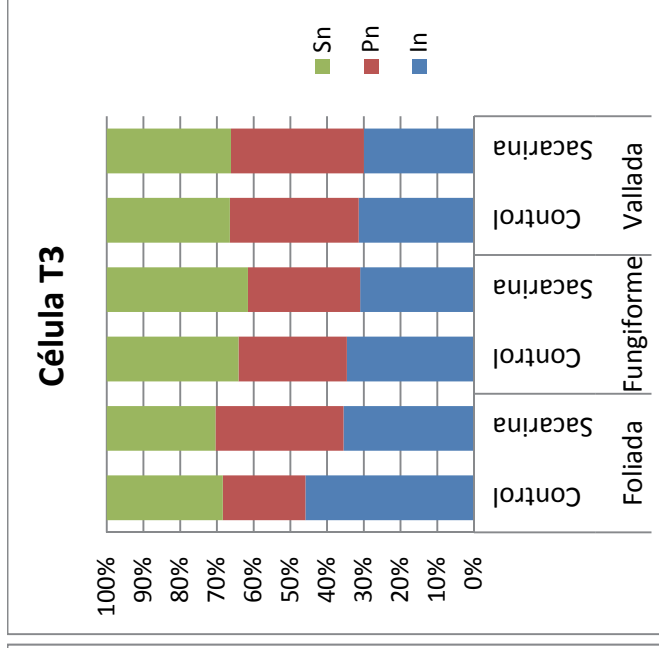
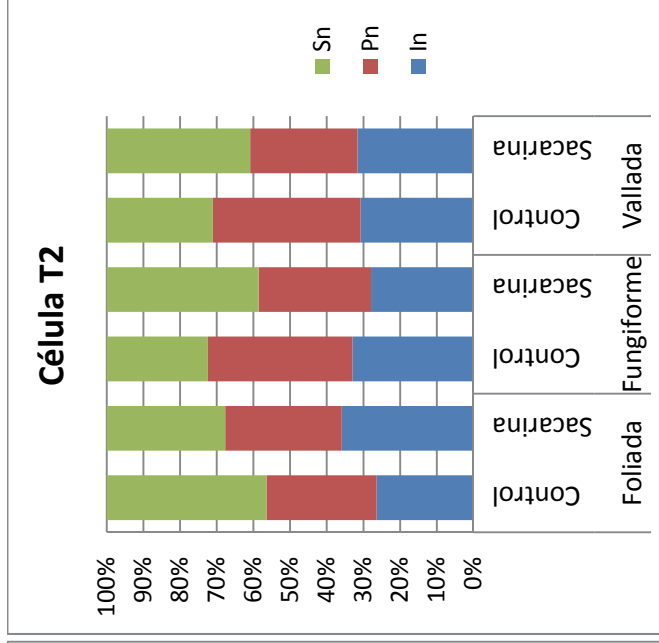
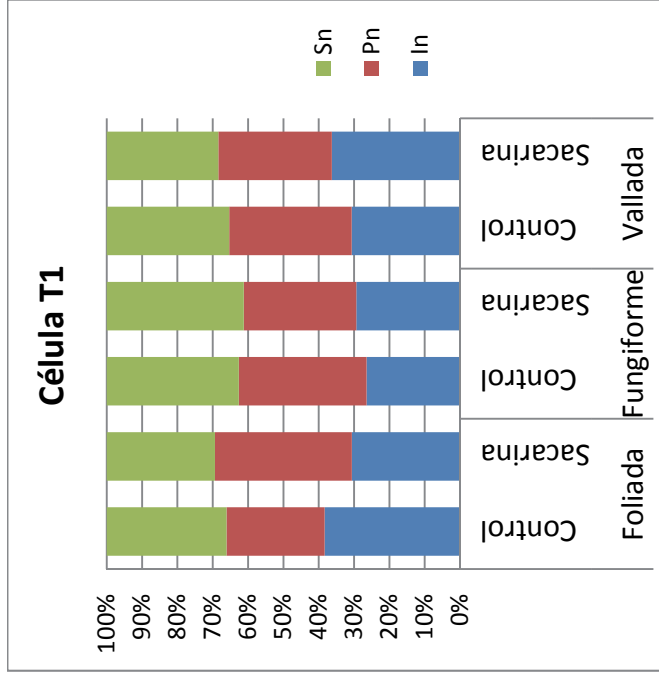


Gráfico 18.- Polaridad de las mitocondrias

POLARIDAD del RER		T1			T2			T3		
		In	Pn	Sn	In	Pn	Sn	In	Pn	Sn
Foliada	Control	0,130	0,135	0,100	0,064	0,039	0,048	0,130	0,067	0,073
	Sacarina	0,172	0,156	0,142	0,207	0,136	0,150	0,140	0,140	0,146
Fungiforme	Control	0,161	0,117	0,130	0,110	0,094	0,092	0,085	0,118	0,092
	Sacarina	0,082	0,121	0,115	0,076	0,075	0,075	0,116	0,122	0,119
Vallada	Control	0,143	0,091	0,075	0,085	0,070	0,064	0,127	0,157	0,140
	Sacarina	0,156	0,115	0,065	0,194	0,090	0,125	0,165	0,165	0,141

Tabla 19

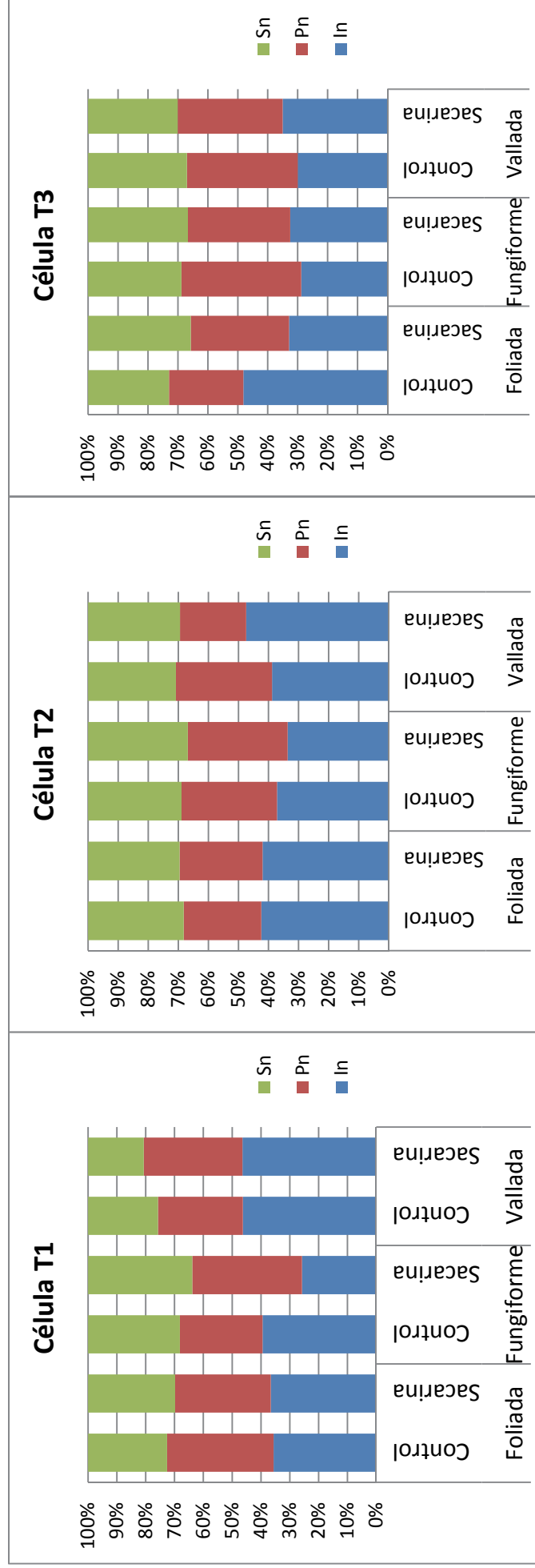


Gráfico 19.- Polaridad del RER

POLARIDAD de las VESÍCULAS CLARAS		T3		
		In	Pn	Sn
Foliada	Control	0,049		
	Sacarina	0,081	0,067	0,051
Fungiforme	Control	0,064	0,032	
	Sacarina	0,069	0,068	
Vallada	Control	0,063	0,035	
	Sacarina	0,065	0,023	

Tabla 20

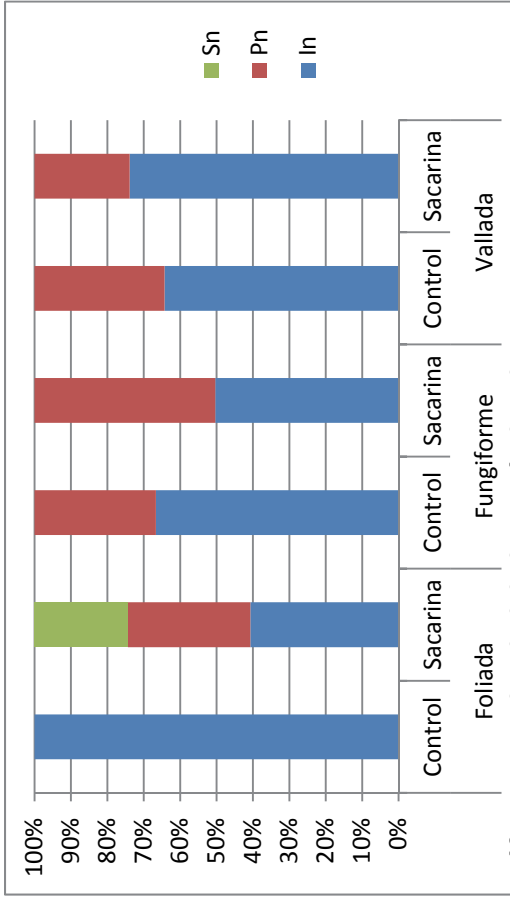


Gráfico 20.- Polaridad de las vesículas claras.

POLARIDAD de las VESÍCULAS NUCLEODENSAS		T3		
		In	Pn	Sn
Foliada	Control	0,042	0,021	0,030
	Sacarina	0,048	0,049	0,037
Fungiforme	Control	0,121	0,040	
	Sacarina	0,165		
Vallada	Control		0,063	0,037
	Sacarina	0,094	0,052	0,054

Tabla 21

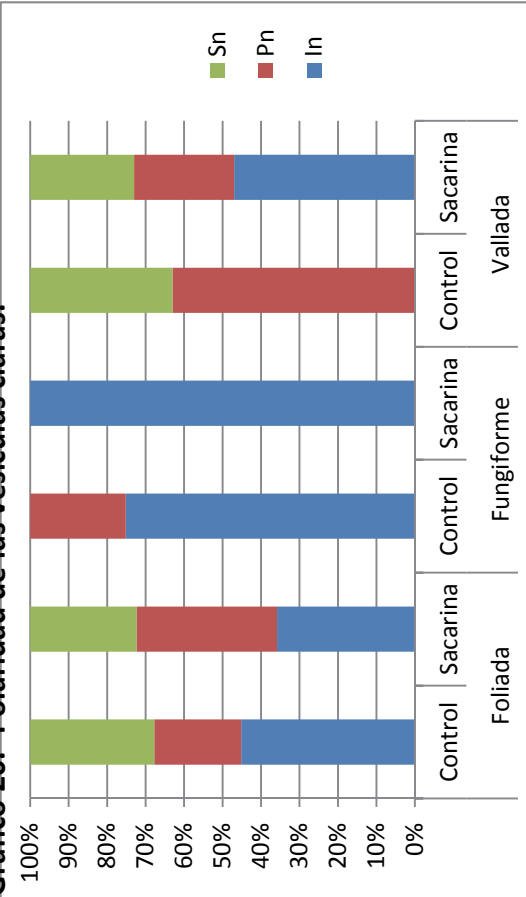


Gráfico 21.- Polaridad de las vesículas nucleodensas.

ABREVIATURAS Y GLOSARIO:

Tipo I: Tipo celular I de la yema gustativa.

Tipo II: Tipo celular II de la yema gustativa.

Tipo III: Tipo celular III de la yema gustativa.

CF: Coeficiente de forma.

DV: Densidad de Volumen (volumen relativo ocupado por una estructura respecto a otra -el total de referencia o la célula-). Se expresa como $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$ o sin especificar unidades.

DN: Densidad numérica (número de elementos de una estructura por unidad de volumen). Se expresa como $\text{N}/\mu\text{m}^3$ o sin especificar unidades.

DS: Densidad de superficie (superficie relativa ocupada por una estructura respecto al volumen de otra -el total de referencia o la célula-). Se expresa como $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ o sin especificar unidades.

In: Región infranuclear de la célula.

Pn: Región perinuclear de la célula.

Sn: Región supranuclear de la célula.

Boxplot: Tipo de gráficos en los que se presentan los resultados de forma que los puntos extremos se corresponden con el valor máximo y mínimo respectivamente, la caja representa el rango intercuartílico, la media se representa como una cruz y la mediana como una línea horizontal que divide la caja.