

IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Los receptores P2X nativos de neuronas mientéricas
del intestino de ratón y cobayo poseen propiedades
distintas**

Tesis que presenta

Raquel Guerrero Alba

Para obtener el grado de

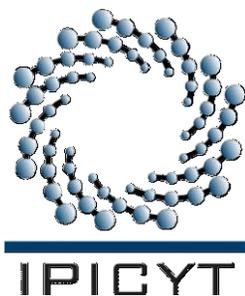
Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Carlos Barajas López

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

San Luis Potosí, S.L.P., 30 octubre 2009



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Dos sitios de unión a suramina están presentes en los receptores P2X nativos de neuronas mientéricas de cobayo pero solo un sitio en las de ratón**” presentada para obtener el Grado de de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Raquel Guerrero Alba** y aprobada el **30 de octubre de 2009** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

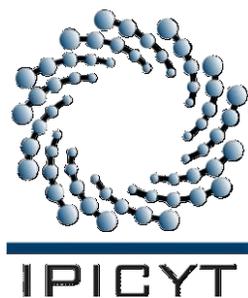
Dr. Carlos Barajas López
(Directo de la tesis)

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
(Codirector de la tesis)

Dr. Rubén H. López Revilla
(Asesor de la tesis)

Dr. Luis M. Montaña Ramírez
(Asesor de la tesis)

Dra. Elia B. Naranjo Rodríguez
(Asesor de la tesis)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Neurobiología de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Carlos Barajas López y Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-189188) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 024 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 30 días del mes de octubre del año 2009, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Presidente	IPICYT
Dr. Luis Manuel Montañó Ramírez	Secretario	UNAM
Dr. Carlos Barajas López	Sinodal	IPICYT
Dra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez	Sinodal externo	UNAM
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustenta la C.

Raquel Guerrero Alba

sobre la Tesis intitulada:

Los receptores P2X nativos de neuronas mientéricas del intestino de ratón y cobayo poseen propiedades distintas

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Carlos Barajas López
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dandose por terminado el acto a las 14:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 30 días del mes de octubre de 2009.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Benhía Marín
Secretario Académico



Página en Blanco que se va a utilizar para colocar la copia del acta de examen.

A mi esposo Eduardo

y

A mi hijo Víctor

Por todo su amor

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

Al IPICYT por brindarme todos los recursos para formarme como Doctora.

A CONACYT por la beca otorgada.

Al director y tutor de mi tesis Dr. Carlos Barajas López por depositar su confianza en mí y por apoyarme no sólo en sentido académico, sino humano. Admiro su calidad humana.

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, quién me enseñó, no solo la Bioquímica y la Biología Molecular, sino también su rigor experimental, su dedicación y su entusiasmo por la investigación.

Al Dr. Rubén López Revilla por enseñarme tantas cosas cuando empecé.

Al Dr. Rustum Karanjia por enseñarme la técnica de expresión de ARNm en ovocitos de *Xenopus*, así como registrar en ellos.

A la Dra. Marcela Miranda Morales por enseñarme la técnica de Patch Clamp, por transmitirme sus conocimientos y por los momentos compartidos en el laboratorio.

A Rosy Espinosa Luna por ayudarme en tantas ocasiones, aguantarme tanta otras, y por ser para mí una amiga y un ejemplo de valor y optimismo.

A mis compañeros de Laboratorio: *Andrómeda, Fernando, Lupita, Luz María, Paco Ramírez, Paco Bautista, Raúl y Telma* por sus consejos, enseñanzas y ayuda.

A mis compañeros del laboratorio 7 (Erika, Margarita, Eloisa, Claudia, Pablo, Azucena) por su ayuda y enseñanza incondicional

A mi familia, a mis padres Norberto y Raquel, a mis hermanas Gaby y Aly, y hermanos Tito, Agustín y Fernando por haberme respaldado en todo momento y porque sin ellos no habría llegado hasta aquí.

A mis amigas de toda la vida, Dinora y Verónica, por su amistad incondicional, por su confianza y por animarme cuando lo necesito.

A mis amigos biolechones, por ser quién son, por seguir unidos, por los momentos juntos y por brindarme su amistad.

Y muy especialmente a Eduardo, mi esposo y amigo, por tu soporte incondicional, por escucharme, por tu paciencia, por tu amor y por estar conmigo en todo momento.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Anexos	xi
Abreviaturas	xii
Glosario	xiv
Resumen	xvi
Abstract	xvii
I. Introducción	1
II. Antecedentes	4
1.1 Anatomía y fisiología del sistema nervioso entérico	5
1.2 Tipos de neuronas entéricas	
1.2.1 Neuronas motoras	8
1.2.2 Neuronas sensoriales	9
1.2.3 Interneuronas	10
1.3 Transmisión sináptica en el SNE	12
1.3.1 Receptores metabotrópicos	13
1.3.2 Receptores ionotrópicos	14
1.3.2a Receptores purinérgicos en el SNE	15
Receptores P2X	17
III. Planteamiento del Problema	29
IV. Justificación	30
V. Hipótesis	31
VI. Objetivos	31
VII. Material y Métodos	32
VIII. Resultados	
a. Las cinéticas de las I_{ATP} de las neuronas mientéricas de ratón no son diferentes a las de cobayo	38
b. Orden de potencia de agonistas	42
c. Efectos inhibitorios del PPADS sobre las I_{ATP} en neuronas mientéricas de ratón y cobayo	44
d. Efectos de suramina sobre las I_{ATP} en neuronas mientéricas de ratón	46
e. Efectos de suramina sobre las I_{ATP} en neuronas mientéricas de cobayo	48
IX. Discusión	57
X. Conclusión	61

XI.	Referencias	67
XII.	Apéndice	68
XIII.	Anexo	93

Lista de tablas

Tabla		Página
I.	Posibles co-ensamblados de las subunidades P2X	19
II.	Comparación de las propiedades farmacológicas de los receptores P2X homoméricos	22
III.	Comparación de las propiedades farmacológicas de los receptores P2X heteroméricos	23

Lista de figuras

Figura	Página
1. Localización de los plexos mientérico y submucoso entre las capas de la pared intestinal.	6
2. Vías aferentes y eferentes de los sistemas simpático y parasimpático.	7
3. Tipos de neuronas del intestino de cobayo.	11
4. Esquema representativo de la topología general de una subunidad P2X.	17
5. Cinética de las corrientes inducidas por ATP en distintos subtipos de receptores P2X de rata.	20
6. Patch Clamp en su configuración de célula completa.	33
7. Representación esquemática de cámara de registro y del sistema de tubos para aplicaciones rápidas de las soluciones experimentales	35
8. Los <i>onsets</i> de la I_{ATP} en neuronas mientéricas de ratón y cobayo no son diferentes.	38
9. La cinética de la caída de las I_{ATP} es similar en neuronas mientéricas de ratón y cobayo.	39
10. La cinética de desensibilización de las I_{ATP} en neuronas mientéricas de ratón y cobayo no son diferentes.	40
11. El orden de potencia de los agonistas para los receptores P2X de neuronas mientéricas de ratón es similar que para los de cobayo.	42
12. PPADS es más potente para inhibir las I_{ATP} en neuronas mientéricas de ratón que las de cobayo.	44
13. Suramina es un antagonista no competitivo de los receptores P2X mientéricos de ratón.	46
14. Suramina tiene efectos potenciatorios e inhibitorios sobre los receptores P2X de neuronas mientéricas de cobayo.	49
15. El efecto potenciador de Suramina es dependiente de la concentración de ATP.	50
16. Suramina incrementa la eficiencia del ATP sin cambiar su potencia en las neuronas mientéricas de cobayo.	51
17. El efecto potenciador e inhibidor de suramina sobre los receptores P2X coexiste en la misma neurona mientérica de cobayo.	54
18. La inhibición y potenciación son mediadas por diferentes sitios de unión a suramina en los P2XRs mientéricos de cobayo, como lo indican sus diferentes cinéticas.	55

Anexo

Guerrero-Alba, R., et al., Two suramin binding sites are present in guinea pig but only one in murine native P2X myenteric receptors, *Eur. J. Pharmacol.* (2009), doi:10.1016/j.ejphar.2009.09.063

Abreviaturas

5-HT	Serotonina
α,β-meATP	α,β -metilen ATP
ADP	Adenosina difosfato
ACh	Acetilcolina
nACh	Receptor nicotínico a acetilcolina
AHP	Hiperpolarización después de un potencial de acción
NH₂	Grupo amino
AMP	Adenosina monofosfato
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazole-4-propiónico
ATP	Adenosina-5-Trifosfato
BN	Péptido liberador de gastrina
Ca²⁺	Calcio (ión calcio)
CCK	Colecistoquinina
ChAT	Colina acetil-transferasa
CO	Monóxido de carbono
COOH	Grupo Carboxilo
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetil sulfóxido
DRG	Ganglio de la raíz dorsal
EPSPs	Potenciales postsinápticos excitatorios
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GDP	Guanosina difosfato
GlyR	Receptores activados por glicina
GPCRs	Receptores asociados a proteínas G
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
I_{ATP}	Corriente inducida por ATP
IBD	Enfermedad del colon irritable
IBS	Síndrome del colon irritable
IPANs	Neuronas intrínsecas aferentes primarias
KN-62	1-[N, O-bis (5-isoquinolinsulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenilpiperazina
LGIC	Canales iónicos activados por ligando
mV	milivoltios
MMC	Complejo motor migratorio
NKA	Neuroquinina A
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetasa
NPY	Neuropéptido Y
PACAP	Péptido activador de adenil-ciclasa pituitaria
PGE₂	Prostaglandina E2
PPADS	Ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2'.4'-disulfónico
pS	Picosiemens
S.E.M.	Error estándar del promedio
SNC	Sistema Nervioso Central
SNE	Sistema Nervioso Entérico

SNP	Sistema Nervioso Périferico
SOM	Somatostatina
UDP	Uracil difosfato
UTP	Uracil 5'-trifosfato
VIP	Péptido intestinal vasoactivo

Glosario

Agonista. Es toda molécula química capaz de activar su receptor

Antagonista. Molécula química que ocupan el receptor impidiendo que el agonista ejerza su acción

Antagonismo competitivo. La molécula del agonista y antagonista compiten por el mismo sitio de unión dentro del receptor.

Antagonismo no competitivo. El fármaco antagonista no actúa en el mismo sitio que el agonista, sino en una zona relacionada a él y necesaria para que el agonista pueda ejercer su efecto.

Complejo motor migratorio (MMC). Es un patrón de actividad motora cíclica que se da en los periodos de ayuno.

Desensibilización. Cuando el efecto de un agonista disminuye gradualmente si se administra continua o repetidamente en un periodo largo de tiempo (minutos a horas)

Estequiometría. Son las relaciones cuantitativas de las subunidades que conforman el canal.

Fibras posganglionares. Son neuronas cuyo cuerpo se localiza en el ganglio nervioso que se sitúa en el mismo órgano diana, y el axón que origina es muy corto porque actúa en ese órgano.

Fibras preganglionares. Son fibras nerviosas autonómicas provenientes del sistema nervioso central y que se dirigen al ganglio autonómico. Todas las fibras preganglionares, bien sea de la división simpática o parasimpática, son colinérgicas, es decir, usan como neurotransmisor a la molécula acetilcolina.

Ganglio. Son aquellas agrupaciones de los somas de las neuronas localizadas fuera del SNC.

Inmunoreactividad. Es la reacción que ocurre cuando un anticuerpo o anticuerpos se unen con su antígeno.

Nervio. Es un conjunto de fibras nerviosas o axones, asociadas en fascículos por medio de tejido conjuntivo.

Nervios craneales. Son los doce pares de nervios que parten de la base del cerebro o a nivel del tronco del encéfalo y emergen por los agujeros de la base del cráneo, distribuyéndose por la cabeza, el cuello, el tórax y el abdomen.

Neuronas intestinofugales. Tipo de neuronas sensitivas cuyo cuerpo celular se localiza a nivel del plexo mientérico; establecen sinapsis con neuronas simpáticas a nivel de los ganglios prevertebrales. Poseen mecanorreceptores y responden a estiramiento de la capa muscular circular.

Nervios raquídeos. También conocidos como nervios espinales son aquellos que se prolongan desde la médula espinal y atraviesan los orificios vertebrales para distribuirse a las zonas del cuerpo.

Neuronas Dogiel Tipo II. Son neuronas que poseen diversos axones que se pueden o no ramificar a poca distancia del cuerpo celular.

Receptores P2X. Son canales iónicos de membrana activados por ATP extracelular.

Reflejo. Es la respuesta inmediata de naturaleza nerviosa que se produce ante un estímulo determinado, externo o interno.

Reflejo peristáltico. Se refiere a la habilidad que posee el tubo digestivo para detectar aumentos de la presión intraluminal y responder con una onda propulsiva de contracción oral y relajación anal.

Sinergismo. Acción de coordinación de dos o más agonistas cuyo efecto es superior a la suma de efectos individuales.

Sensibilización. Incremento progresivo y persistente de los efectos de una droga.

Teniae coli (teniae coli). Son las tres cintas independientes longitudinal del músculo liso en la parte exterior del colon ascendente, transversal, descendente y sigmoide. Son visibles y se pueden ver justo debajo de la serosa

Resumen

Los receptores P2X nativos de neuronas mientéricas del intestino de ratón y cobayo poseen propiedades distintas

Las propiedades farmacológicas y fisiológicas de los receptores P2X en neuronas mientéricas del intestino delgado de ratón y cobayo fueron caracterizadas utilizando la técnica Patch Clamp en su configuración de célula completa. La aplicación rápida de ATP (1-3000 μM) indujo una corriente entrante rápida en el 95% de las neuronas mientéricas registradas en ambas especies cuando se fijo el voltaje a -60 mV. Curvas concentración-respuesta para ATP (1-3000 μM) produjo un valor de EC_{50} de 114 y 115 μM , con un coeficiente de Hill de 1.02 y 0.79, para las neuronas mientéricas de ratón y de cobayo, respectivamente. El α,β -metilen ATP (α,β -meATP) fue inactivo. Piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-acido disulfónico (PPADS) (0.01-30 μM) inhibió las corrientes inducidas por ATP (I_{ATP}) con diferente potencia, siendo los valores IC_{50} de 0.61 y 1.8 μM en neuronas mientéricas de ratón y de cobayo, respectivamente. En neuronas mientéricas de ratón, la respuesta a ATP fue inhibida por suramina, mientras que en neuronas mientéricas de cobayo observamos ambos efectos, potenciación e inhibición, de estas corrientes. En cobayo, ambos efectos de suramina tienen diferente dependencia de la concentración y cinética de recuperación, indicando que son mediados por al menos dos sitios de unión diferentes. Nuestros resultados indican que los receptores P2X mientéricos de ratón tienen diferentes propiedades farmacológicas que los presentes en cobayo.

PALABRAS CLAVE. Neuronas mientéricas, Receptores P2X, ATP, Suramina

Abstract

The native P2X receptors of myenteric neurons of the small intestine of mouse and guinea pig have different properties.

Whole-cell patch clamp recordings were used to characterize the physiological and pharmacological properties of P2X receptors (P2XRs) of mouse and guinea-pig myenteric neurons from the small intestine. ATP application induced a rapid inward current in 95% of recorded neurons of both species when were voltage clamped at -60 mV. Concentration-response curves for ATP (1-3000 μM) yielded EC_{50} values of 114 and 115 μM for mouse and guinea-pig myenteric neurons, respectively, with a Hill coefficient value of 1.02 and 0.79, respectively, which were not significantly different from unity. The α,β -methylene ATP (100 μM) was virtually inactive. Pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulphonic acid (PPADS; 0.01-30 μM) inhibited the ATP-induced currents (I_{ATP}) with a different potency; being the IC_{50} 0.61 and 1.8 μM in mouse and guinea-pig, respectively. In mouse myenteric neurons, I_{ATP} were inhibited by suramin whereas in guinea pig neurons we observed two effects, potentiation and inhibition of these currents. On guinea pig, both effects of suramin had different recovering kinetics and concentration dependency, indicating that they are mediated by at least two different binding sites. Our observations indicate that myenteric P2XRs in these two species have different pharmacological properties.

Keywords: Myenteric neurons, P2X Receptors, ATP, Suramin.

I. INTRODUCCIÓN

Los receptores P2X son una familia de canales catiónicos activados por ATP extracelular. Hasta la fecha, siete subunidades han sido clonadas (P2X₁₋₇), estas subunidades pueden ensamblarse como trímero para formar receptores P2X funcionales (Torres *et al.*, 1999). Todas las subunidades, excepto la P2X₆, forman receptores homoméricos funcionales y cada una de ellas puede combinarse con otras para formar receptores heteroméricos con estequiometría desconocida pero con propiedades biofísicas y farmacológicas específicas (Brake *et al.*, 1994; Valera *et al.*, 1994; Bo *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1995; Surprenant *et al.*, 1995). Estas propiedades, que se analizan en sistemas de expresión heterólogos, son útiles para proponer combinaciones de subunidades hipotéticas de receptores P2X nativos de un determinado tejido. Sin embargo, los perfiles farmacológicos de estos receptores recombinantes no siempre coinciden con los receptores endógenos, indicando que algunos receptores nativos son canales heteromultiméricos compuestos de diferentes subunidades P2X o diferentes subtipos de subunidades generadas por procesamiento post-transcripcional de *splicing* alternativo del ARN mensajero (ARNm) a partir del mismo gen (Evans *et al.*, 1995; North, 2002).

Existe evidencia de por lo menos tres diferentes subunidades P2X en las neuronas mientéricas de intestino delgado de cobayo. Así, se ha demostrado inmunoreactividad para P2X₂ (Castelucci *et al.*, 2002), P2X₃ (Poole *et al.*, 2002; Van Nassauw *et al.*, 2002) y P2X₇ (Hu *et al.*, 2001). En neuronas mientéricas de ratón, se ha demostrado inmunoreactividad para P2X₂ (Ren *et al.*, 2003), P2X₃ y

P2X₅ (Ruan & Burnstock, 2005). Por otro lado, se ha reportado la falta de inmunoreactividad para las subunidades P2X₁, P2X₄ y P2X₆ en neuronas mientéricas de ratón (Ruan & Burnstock, 2005) y de cobayo (Hu *et al.*, 2001).

Existen datos controversiales con respecto a las propiedades farmacológicas de los receptores P2X nativos de neuronas mientéricas, lo que podría estar reflejando subpoblaciones de receptores entre estas neuronas o diferencias entre especies. Por ejemplo, la suramina, un antagonista para muchos receptores P2X, ha sido reportado que potencia (Barajas-Lopez *et al.*, 1993; Barajas-Lopez *et al.*, 1996a), inhibe (Galligan & Bertrand, 1994), o no tiene efecto (Glushakow *et al.*, 1998) sobre las respuestas mediadas por receptores P2X mientéricos de intestino delgado de cobayo. Un estudio más reciente indica que la suramina puede potenciar e inhibir estos receptores en estas neuronas (Hu *et al.*, 2001). Sin embargo, en neuronas mientéricas de rata, sólo se ha descrito el efecto inhibitorio de suramina sobre las corrientes inducidas por ATP (I_{ATP}) (Ohta *et al.*, 2005). Por lo tanto, hemos realizado un estudio comparativo en neuronas mientéricas de ratón y cobayo para proporcionar datos farmacológicos de los receptores P2X mientéricos que podrían explicar esta controversia.

En este trabajo de tesis, encontramos que la cinética de las I_{ATP} y el orden de potencia de los agonistas de los receptores P2X mientéricos de ambas especies son indistinguibles. Sin embargo, los antagonistas PPADS y suramina distinguen estos receptores entre ambas especies; PPADS es más potente en inhibir las I_{ATP} en neuronas mientéricas de ratón que las de cobayo. Suramina inhibe las I_{ATP} mediadas por los receptores P2X mientéricos de ratón pero tiene

ambos efectos (inhibición y potenciación) sobre las I_{ATP} en neuronas mientéricas de cobayo. Además, se muestran evidencias que indican que estos dos efectos son mediados por al menos dos diferentes sitios de unión a la suramina y que ambos sitios están presentes en los receptores P2X de las neuronas mientéricas de cobayo, mientras que el sitio a suramina que produce potenciación está ausente en los receptores de neuronas mientéricas de ratón.

II. ANTECEDENTES

El sistema nervioso tiene dos componentes diferenciados anatómicamente: el sistema nervioso central (SNC), compuesto del encéfalo y la médula espinal, y el sistema nervioso periférico (SNP), compuesto de grupos especializados de neuronas, denominados ganglios y nervios periféricos. El SNP consta de las divisiones somática y autónoma. La *división somática* comprende las neuronas sensitivas que inervan la piel, los músculos y las articulaciones. La *división autónoma* (sistema nervioso autónomo), es la mediadora de la sensibilidad visceral, así como del control motor de las vísceras, músculos lisos y glándulas endocrinas. Consta de los sistemas simpático, parasimpático y entérico (Kandel, *et.al.*2000). Los sistemas nerviosos simpático y parasimpático inervan los músculos cardíacos, y liso y tejidos glandulares, y son mediadores de diversos reflejos viscerales. Estas dos divisiones comprenden las neuronas sensitivas asociadas a los nervios raquídeos y craneales, las neuronas motoras preganglionares y posganglionares, y los circuitos del SNC que conectan con las neuronas motoras y sensitivas y las regulan. El *sistema nervioso entérico* (SNE) tiene mayor autonomía que las otras dos divisiones, con un sistema en gran medida independiente, cuyas conexiones con el resto del SNC son mínimas. Consta de las neuronas motoras y sensitivas del tubo digestivo que median los reflejos digestivos (Kandel, *et.al.*2000).

1.1 Anatomía y fisiología del sistema nervioso entérico

Las funciones gastrointestinales requieren del funcionamiento coordinado e integrado de varios componentes del tubo digestivo como son: el epitelio mucoso, submucoso, la musculatura lisa, vasos sanguíneos, ganglios linfáticos y glándulas anexas como son: glándulas salivales, páncreas o la vesícula biliar (Furness & Costa, 1980). El SNE integra motilidad, secreciones, flujo sanguíneo y respuestas inmunes a través de una red neural cuyos cuerpos celulares se encuentran en la pared del tubo digestivo (*inervación intrínseca*) y que está comunicado con el SNC (*inervación extrínseca*) (Hansen, 2003). Otros subcomponentes importantes del tubo digestivo como son el sistema endocrino (Furness, 2000) y el sistema inmunológico (Hansen, 2003) también tienen relaciones estructurales y funcionales con el sistema neural, modulándose mutuamente entre sí.

Los nervios entéricos llevan a cabo sus funciones utilizando múltiples mecanismos de neurotransmisión que aumentan o disminuyen la excitabilidad neuronal. Los cuerpos celulares de las neuronas del SNE se encuentran aglutinadas en estructuras ganglionares las que, a su vez, se interconectan entre sí formando dos grandes plexos nerviosos: el ***plexo mientérico***, situado entre la capa muscular lisa longitudinal externa y circular interna, y se extiende a lo largo de todo el tubo digestivo, del esófago hasta el recto; y el ***plexo submucoso*** ubicado entre la capa muscular circular y la mucosa y se localiza solo en el intestino delgado y grueso (Figura 1). En general, el plexo mientérico controla la contracción y relajación del músculo liso intestinal, mientras que el plexo submucoso se ocupa del control de las funciones de absorción y secreción del

epitelio gastrointestinal, flujo sanguíneo local y respuestas. Los dos plexos están conectados entre sí y contienen neuronas motoras que inervan tanto al músculo liso como a las células secretoras de la mucosa, así como a las neuronas sensitivas que responden a la distensión, a la tonicidad y a señales químicas específicas. (Furness, 2000; Galligan, 2002; Wood, 2007).

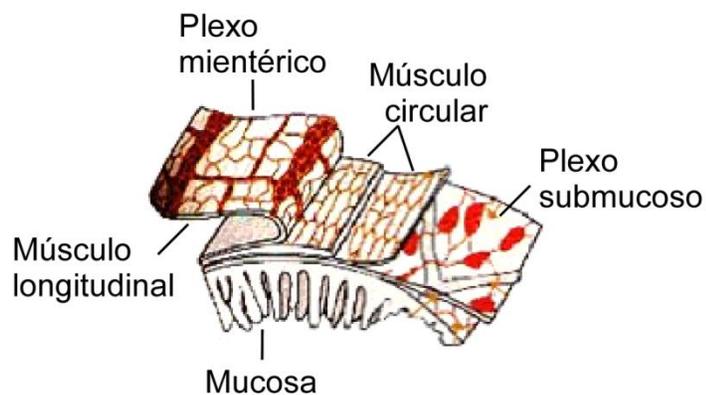


Figura 1. Localización de los plexos mientérico y submucoso entre las capas de la pared intestinal (Furness & Costa, 1980)

El SNE tiene tantas neuronas como las que tiene la médula espinal y controla varias funciones de la musculatura lisa, de la micro-circulación local y del transporte transepitelial, además de ser responsable de importantes reflejos como son el reflejo peristáltico y el complejo motor migratorio (MMC). Aunque es altamente autónomo, el SNE mantiene estrechas conexiones con el SNC. Posee una doble inervación extrínseca a través de los sistemas simpático y parasimpático. Ambos contienen fibras aferentes, sensoriales que transmiten información al SNC, y fibras eferentes motoras que inervan los órganos efectores.

Las fibras preganglionares parasimpáticas se proyectan hacia los ganglios entéricos del estómago, el colon y el recto a través de los nervios vagos, pélvicos y espláncnicos. Las fibras simpáticas se originan fundamentalmente en los ganglios paravertebrales, aunque algunas lo hacen en los ganglios prevertebrales, y se proyectan fundamentalmente a los plexos mientérico y submucoso (Figura 2) (Kandel, *et.al.*2000; Wood, 2007).

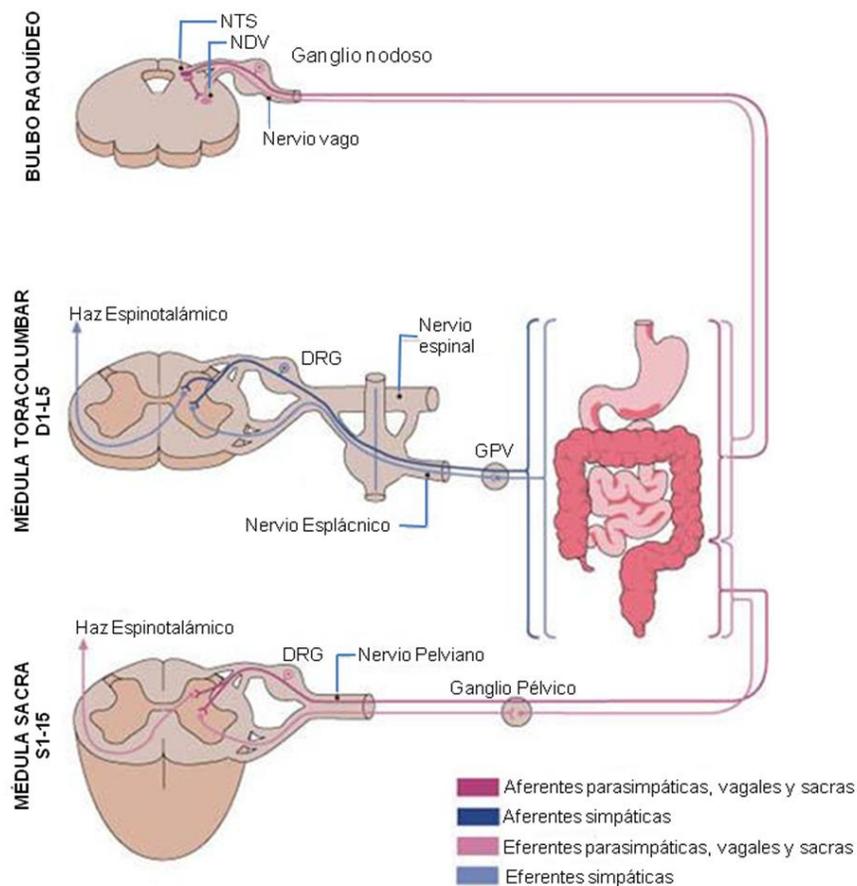


Figura 2. Vías aferentes y eferentes de los sistemas simpático y parasimpático. NTS: núcleo del tracto solitario. DRG: ganglio de la raíz dorsal. NDV: núcleo dorsal del vago. GPV: ganglios prevertebrales (celíaco, m. superior, m. inferior, pélvico) (Modificado de Kandel, *et.al.*2000)

1.2 Tipos de neuronas entéricas.

Al igual que el sistema nervioso central, el sistema nervioso entérico tiene tres clases de neuronas de acuerdo a su funcionalidad:

1.2.1 Neuronas motoras

Representan la conexión final motora con las células musculares lisas de las capas circular y longitudinal. Se pueden subclasificar en motoneuronas (excitatorias e inhibitorias), según los neurotransmisores que codifican (Furness, 2000), y también se pueden subclasificar según la capa muscular (Costa *et al.*, 2000). Se ha establecido que los neurotransmisores que codifican mayoritariamente las motoneuronas excitatorias son la acetilcolina (ACh), las taquininas, como son la neuroquinina A (NKA) y la Substancia P. Como principales neurotransmisores inhibitorios codificados por motoneuronas se han propuesto el óxido nítrico (NO), el ATP, el péptido intestinal vasoactivo (VIP), el péptido activador de adenil-ciclasa pituitaria (PACAP) y el monóxido de carbono (CO). Por sus características electrofisiológicas se les clasifica como neuronas 'S', que al ser estimuladas eléctricamente se generan potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs) rápidos. Dentro de las motoneuronas podemos encontrar un pequeño subgrupo, las neuronas secretomotoras y vasomotoras (Figura 3), que son neuronas que se proyectan a mucosa y a vasos sanguíneos locales (Furness, 2000).

1.2.2 Neuronas sensoriales

Llamadas también neuronas aferentes primarias intrínsecas (IPANs), tienen sus cuerpos celulares tanto en los ganglios del plexo mientérico como en los del plexo submucoso y proyectan sus terminales hacia la mucosa intestinal. Responden a estímulos químicos, deformación mecánica de la mucosa y otros estímulos como el estiramiento radial y la tensión muscular (Costa *et al.*, 2000). En el cobayo estas neuronas son Dogiel tipo II (poseen diversos axones que se pueden o no ramificar a poca distancia del cuerpo celular) y tienen propiedades electrofisiológicas tipo AH (*Afterhyperpolarization*) que se caracteriza por una hiperpolarización de larga duración seguida por un potencial de acción (AHP). Se piensa que esta AHP reduce grandemente la excitabilidad de los cuerpos neuronales de las células sensoriales (Costa *et al.*, 2000). Esta hiperpolarización se debe a la entrada de calcio (Ca^{2+}) durante el potencial de acción que abre canales de potasio activados por Ca^{2+} . Las IPANs reciben EPSPs lentos, la fuente de estos potenciales son otras neuronas sensoriales intrínsecas formando redes inervadas recíprocamente. Estos EPSPs lentos son principalmente mediados por sustancia P y taquininas actuando sobre receptores a neuroquinina como NK_3 y posiblemente NK_1 (Bertrand, 2003). Además presentan varios receptores unidos a proteínas G que cuando se activan también producen despolarizaciones similares a EPSPs lentos, en particular receptores activados por 5-HT, colecistoquinina (CCK), prostaglandina PGE_2 , histamina y ATP, éste último actuando a través de los receptores P_2Y inhibidores. Las IPANs están interconectadas formando redes y reciben entradas de otras IPANs, además se conectan con interneuronas y con

motoneuronas. Por lo general, no es frecuente que las neuronas sensoriales intrínsecas reciban entradas sinápticas rápidas pero se ha encontrado que poseen muchos de los receptores que median estas entradas como son los receptores nicotínicos a ACh, 5-HT₃, GABA_A y P2X. (Costa *et al.*, 2000).

1.2.3 Interneuronas

Se han identificado en todas las regiones del tracto gastrointestinal, posiblemente, son las neuronas que más varían entre regiones, más que los otros dos tipos de neuronas. Las interneuronas forman cadenas en dirección oral y aboral. Por lo tanto, se pueden diferenciar en interneuronas ascendentes y descendentes. En el intestino de cobayo hay un tipo de interneuronas ascendentes y tres tipos de interneuronas descendentes (Furness, 2000). También hay un pequeño número de neuronas intestinofugales que mandan sus proyecciones al ganglio prevertebral. Las interneuronas ascendentes son colinérgicas, formando cadenas que se extienden a lo largo del intestino. Al parecer estas interneuronas están implicadas en reflejos locales así como dos de los tipos de interneuronas descendentes. Los tres tipos de interneuronas descendentes tienen el siguiente código químico: ChAT/NOS/VIP-±BN±GABA±NPY, ChAT/SOM y ChAT/5-HT. Estudios de las conexiones de estas neuronas sostienen la hipótesis de que el primer tipo, las neuronas ChAT/NOS/VIP, están involucrados en los reflejos de motilidad local, que las neuronas ChAT/SOM están involucradas en la conducción de MMC en el intestino delgado y las neuronas ChAT/5-HT están involucradas en los reflejos secreto-motores, pero no directamente en los reflejos de motilidad

(Furness, 2000). Investigaciones farmacológicas de transmisión de neurona a neurona en el intestino delgado han revelado dos EPSPs rápidos no colinérgicos, uno mediado por ATP y el otro por 5-HT. La transmisión por ATP es en una vía descendente, sin embargo, ésta al parecer, no es una vía para el control de la motilidad a través de reflejos locales. Así pues, el ATP podría ser un neurotransmisor de las interneuronas ChAT/SOM o ChAT/5-HT. Otra posibilidad es que el ATP sería un neurotransmisor de un sub-grupo de neuronas aferentes primarias, las cuales tienen axones largos analmente dirigidos. Al igual que las motoneuronas, se clasifican como neuronas 'S' (Furness, 2000).

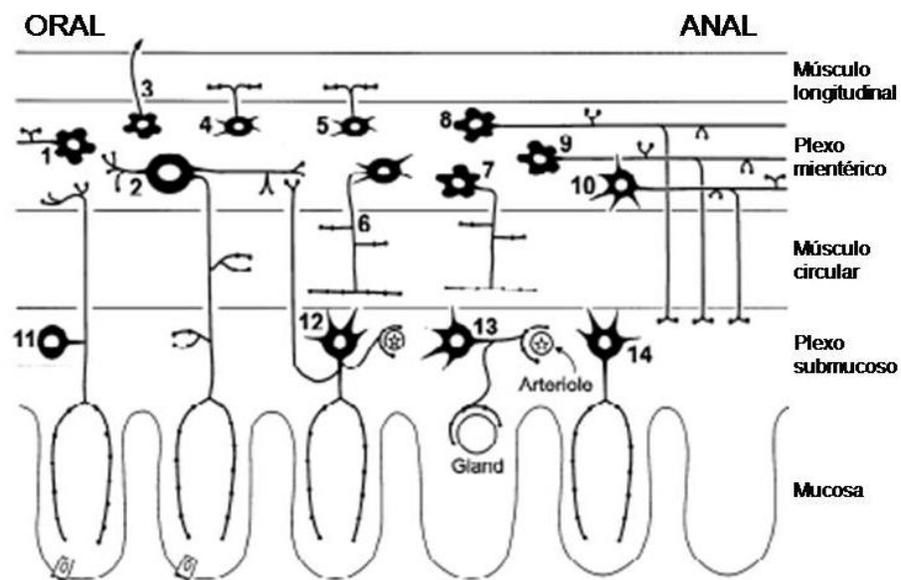


Figura3. Tipos de neuronas del intestino de cobayo: (1) interneuronas ascendentes; (2)IPAN mientérica; (3) neurona intestínofugal; (4) motoneurona longitudinal excitatoria; (5) motoneurona longitudinal inhibitoria; (6) motoneurona circular excitatoria; (7) motoneurona circular inhibitoria; (8) interneurona descendente (reflejo local); (9) interneurona descendente (reflejo secretomotor); (10) interneurona descendente (MMC); (11) IPAN submucosa; (12) neurona secretomotora y vasodilatadora no colinérgica; (13) neurona secretomotora y vasodilatadora colinérgica; (14) neurona secretomotora (no vasodilatadora) colinérgica (Furness, 2000).

Además de neuronas, en el SNE encontramos la glia entérica, que fue en un principio descrita por Dogiel. Actualmente se sabe que superan a las neuronas entéricas en un número de 4 a 1. En un principio se pensaba que la glia entérica tenía básicamente un papel de soporte y de aporte de nutrientes, pero recientemente se ha demostrado que la glia entérica puede tener varias funciones asociadas a la neurotransmisión, participando a su vez, en diversas funciones motoras y de barrera. Diversas evidencias experimentales apoyan dichas hipótesis (Ruhl *et al.*, 2004). Aunque en la actualidad, la función de la glia es aún muy desconocida a nivel del SNE.

1.3 Transmisión sináptica en el SNE

El sitio donde una neurona se comunica con otra célula se le conoce como *sinápsis*. Dos elementos pueden ser identificados en todas las sinápsis, el presináptico y el postsináptico. La transmisión sináptica puede ser de dos tipos: una *eléctrica* debido a que la comunicación se establece a través de canales intercelulares (uniones comunicantes) que se caracterizan por una baja resistencia eléctrica, y otra *química* debido a que utilizan sustancias llamadas neurotransmisores, las cuales son liberadas del elemento presináptico y activan proteínas receptoras en el postsináptico. En ambos tipos de comunicación sináptica se modula el potencial de membrana en reposo del elemento postsináptico. En la transmisión sináptica química, estos cambios de potencial suceden por la activación de receptores que modifican el flujo iónico a través de la membrana plásmatica (Kandel, 2000).

La transmisión sináptica en el SNE se realiza mediante receptores unidos a proteínas G (GPCRs) o receptores metabotrópicos y receptores directamente asociados a canales iónicos mejor conocidos como canales ionotrópicos o canales iónicos activados por ligando (LGIC) (Galligan, 2002).

1.3.1 Receptores metabotrópicos

Los GPCRs o receptores metabotrópicos son estructuralmente diferentes a los receptores ionotrópicos ya que el canal iónico no está localizado directamente dentro de la misma proteína receptora. Los efectos de los GPCRs son mediados por la activación de proteínas G a través de la conversión de GDP a GTP. Una vez activado, el GTP difunde a través de la célula para activar una o más vías de señalización intracelular cuyo blanco es la apertura de un canal iónico. Debido a que las respuestas mediadas por estos receptores involucra varios pasos hasta abrir el canal, el “*onset*” de la respuesta es lenta (>50 ms) y de larga duración (de segundos a minutos), por tal motivo se refieren como una neurotransmisión lenta (Galligan, 2002). Algunos ejemplos de GPCRs en el SNE incluyen a los receptores GABA_B una clase de receptor gabaérgico y los receptores P2Y una clase de receptor purinérgico. Se pueden distinguir los receptores metabotrópicos de los receptores ionotrópicos en al menos dos formas: 1) a través del uso de agonistas y antagonistas específicos para cada subgrupo de receptor y 2) las diferencias que hay en la entrada y duración de la transmisión neuronal.

1.3.2 Receptores ionotrópicos

Los receptores ionotrópicos o LGIC son la segunda clase más amplia de receptores en el SNE; estos receptores median respuestas sinápticas rápidas. Tienen el sitio de unión al ligando y el canal iónico como parte de un único complejo proteico. Por lo tanto, la unión de un neurotransmisor a su receptor puede causar la apertura del canal iónico. El movimiento iónico genera una corriente de una magnitud proporcional al número de canales abiertos y a la corriente unitaria de cada canal. La dirección de la corriente depende del tipo de iones y del sentido del flujo hacia el citoplasma o hacia el exterior de la membrana (Galligan, 2002). Por convención, el movimiento neto de cargas positivas hacia el interior se le llama corriente entrante y el movimiento neto de cargas positivas hacia el exterior se conoce como corriente saliente. Los LGIC pueden existir en tres estados principales, normalmente están cerrados en ausencia de ligando, y cuando éste se une a su sitio receptor le tomará ~ 0.02 ms para pasar al estado abierto, y cuando el ligando se disocia el canal pasará al estado cerrado otra vez. Estos canales también muestran desensibilización tras una exposición prolongada del agonista y, por tanto, tiene una duración más corta de acción que los receptores metabotrópicos (< 100 ms) (Connolly & Wafford, 2004). En el SNE se expresan una gran variedad de receptores ionotrópicos como son los nicotínicos activados por ACh (nACh), los activados por serotonina (5-HT₃), los activados por GABA (GABA_A), los activados por Glicina (GlyR), los activados por Glutamato (NMDA y AMPA) y los activados por ATP (P2X) (Galligan, 2002). Estos receptores

están dispersos en todo el plexo mientérico y submucoso, con diferentes neuronas expresando diferentes subunidades y diferentes perfiles.

1.3.2a Receptores purinérgicos en el SNE

En la época de 1970's fue propuesto el ATP como neurotransmisor y desde entonces muchos estudios han tratado de precisar el papel del ATP en la transmisión sináptica (Burnstock, 2006). Se ha demostrado su liberación por parte de las neuronas entéricas. En el plexo mientérico, el ATP es utilizado como un neurotransmisor o co-transmisor por las motoneuronas y al menos un tipo de interneuronas descendentes durante los reflejos locales. Sin embargo, hasta la fecha no hay evidencia de que las IPANs liberen ATP como neurotransmisor (Ren & Bertrand, 2008). Se ha reportado que el ATP y sus análogos activan receptores purinérgicos que son divididos en dos categorías: P1 y P2. Los receptores P1 son activados por adenosina, se han descrito cuatro subtipos los A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 . Todos ellos acoplados a proteínas G, actúan mediante la inhibición (A_1 y A_3) o la activación (A_{2A} y A_{2B}) de la adenilato ciclasa (Ren & Bertrand, 2008). En el SNE, no hay evidencia clara de que los potenciales sinápticos sean causados por la liberación de adenosina actuando en receptores postsinápticos. Al parecer, la función más importante de la adenosina en el SNE es la modulación de la transmisión sináptica a través de la inhibición de la liberación del neurotransmisor, ya que se ha visto que la inhibición de receptores A_1 puede potenciar la liberación de ACh o taquininas del ganglio mientérico. Igualmente, los EPSPs rápidos son reducidos en presencia de adenosina o AMP, un efecto bloqueado por

antagonistas de receptores A₁. Probablemente, esta modulación se deba a través de receptores A₁ ubicados en la membrana presináptica.

Los receptores del tipo P2 son activados principalmente por ATP, ADP, UDP y UTP. La categoría P2 es además subdividida en dos clases de receptores llamados P2X y P2Y (Abbracchio & Burnstock, 1994; Burnstock, 2006). La clase P2Y es metabotrópica, están unidos a proteínas G y se han descrito ocho subtipos: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄, actualmente, se han propuesto nuevos subtipos como los P2Y₁₅ (Ren & Bertrand, 2008). El ATP es el ligando de todos estos receptores pero UTP, UDP o ADP pueden ser más potentes y pueden utilizarse farmacológicamente para distinguir entre subtipos de estos receptores. En el SNE, se ha encontrado inmunoreactividad para los receptores P2Y₁ (Gao *et al.*, 2006), P2Y₂, P2Y₆ y P2Y₁₂ (Xiang & Burnstock, 2006). Se ha reportado que estos receptores median EPSPs lentos tanto en motoneurona e interneuronas del plexo mientérico y submucoso. Además, estudios electrofisiológicos en IPANs de íleo de cobayo mostraron que los receptores P2Y median una hiperpolarización de la membrana debido a la apertura de canales potasio (K⁺) activados por Ca²⁺, posiblemente a través de receptores P2Y₁ (Ren & Bertrand, 2008). La clase P2X es ionotrópica (Ralevic & Burnstock, 1998; Burnstock & Knight, 2004) y es la involucrada en los estudios descritos en esta tesis.

RECEPTORES P2X

Estructura

Los receptores P2X son canales iónicos de membrana activados por ATP extracelular. Su activación resulta en la apertura de un canal selectivo a cationes. A la fecha, han sido clonadas siete subunidades P2X (P2X₁₋₇) en diferentes tejidos de mamífero adulto, muestran menos del 50% de identidad y van desde una longitud de 379 (P2X₆) a 595 (P2X₇) amino ácidos. Cada subunidad muestra una estructura molecular similar consistiendo de dos dominios transmembranales (TM1 y TM2) unidos por una asa extracelular hidrofílica, mientras que sus grupos amino (NH₂) y carboxilo (COOH) terminales son intracelulares (Figura 4). El dominio TM1 es responsable de la compuerta del canal y el dominio TM2 forma el poro del canal. El asa extracelular se sugiere que está involucrada en la unión de dos moléculas de ATP, así como en la estructura terciaria de la proteína, ya que se encuentran conservados 10 residuos de cisteínas, que al ser oxidados forman puentes disulfuros (S-S). Todas las subunidades P2X tienen secuencias consenso para glicosilación (Asn-X-Ser/Thr), y algunas glicosilaciones son esenciales para el tráfico de los receptores a la superficie de la membrana celular (North, 2002).

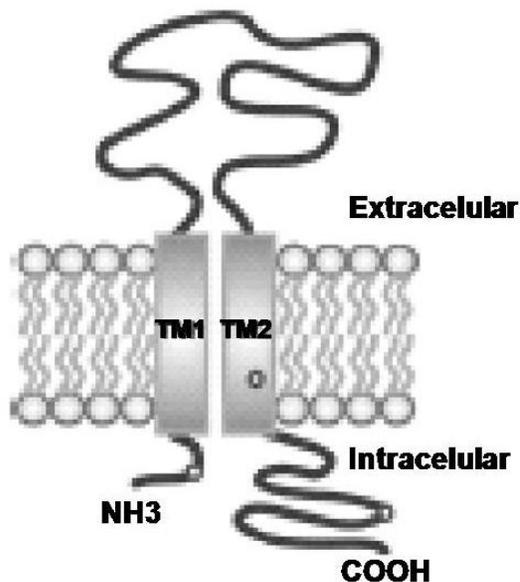


Figura 4. Esquema representativo de la topología general de una subunidad P2X (Li *et al.*, 2008).

La estructura molecular de un receptor P2X es probablemente como trímero. Dichos trímeros pueden estar compuestos de la misma o diferentes subunidades formando receptores homoméricos o heteroméricos, respectivamente.

El co-ensamblamiento de los receptores P2X se ha estudiado en modelos de expresión heteróloga, de tal forma que se ha podido obtener información acerca de cuáles son las subunidades que se co-ensamblan. Por ejemplo, en estos estudios, todas las subunidades pueden formar homómeros, excepto la P2X₆, la cual solo se combina con otras subunidades. También se ha determinado la existencia de receptores heteroméricos como son P2X_{1/2}, P2X_{1/4}, P2X_{1/5}, P2X_{2/3}, P2X_{2/6}, P2X_{4/6}, (North, 2002; Roberts *et al.*, 2006) y P2X_{4/7}; (Guo *et al.*, 2007). La combinación de algunas subunidades resulta en canales con propiedades fisiológicas y farmacológicas distintas a las observadas en cada canal expresado de manera individual. Por ejemplo, los receptores P2X₂ expresados de manera

individual no son activados por el análogo de ATP, α,β -meATP, y desensibilizan muy lento. Por su parte, los receptores P2X₃ si son activados por dicho análogo y desensibilizan rápidamente. La combinación de ambas subunidades resulta en corrientes activadas por α,β -meATP cuya desensibilización es lenta (Lewis *et al.*, 1995). Mediante ensayos de co-inmunoprecipitación se ha encontrado que la mayoría de las subunidades P2X son candidatos a formar heterómeros, a excepción de la subunidad P2X₇ (ver Tabla I).

Tabla I. Posibles co-ensamblados de las subunidades P2X (North, 2002)

	P2X ₁	P2X ₂	P2X ₃	P2X ₄	P2X ₅	P2X ₆	P2X ₇
P2X ₁	+	+	+	-	+	+	-
P2X ₂		+	+	-	+	+	-
P2X ₃			+	-	+	+	-
P2X ₄				+	+	+	-
P2X ₅					+	+	-
P2X ₆						-	-
P2X ₇							+

Las propiedades identificadas en los sistemas heterólogos pueden ser extrapoladas para identificar la posible combinación de las subunidades que componen a los receptores P2X en células nativas. Sin embargo, las propiedades farmacológicas de los receptores P2X recombinantes no siempre corresponde a los receptores endógenos, por lo tanto, es posible que algunos receptores nativos

sean canales hetero-multiméricos compuestos de diferentes subunidades (Evans *et al.*, 1995; North, 2002).

Propiedades biofísicas

Los receptores P2X abren rápidamente después de la unión del ATP. La posterior cinética de la respuesta es dependiente del receptor en cuestión y puede ser sujeta a regulación. En general, los receptores P2X₁ y P2X₃ muestran desensibilización rápida con respuestas a aplicaciones sostenidas de concentraciones máximas de agonista decayendo más del 90% en 1-2 s (North, 2002). El resto de los receptores homoméricos y el heteromérico P2X_{2/3} muestran desensibilización lenta, es decir son respuestas sostenidas a 1-2 s de aplicación del agonista (ver Figura 5).

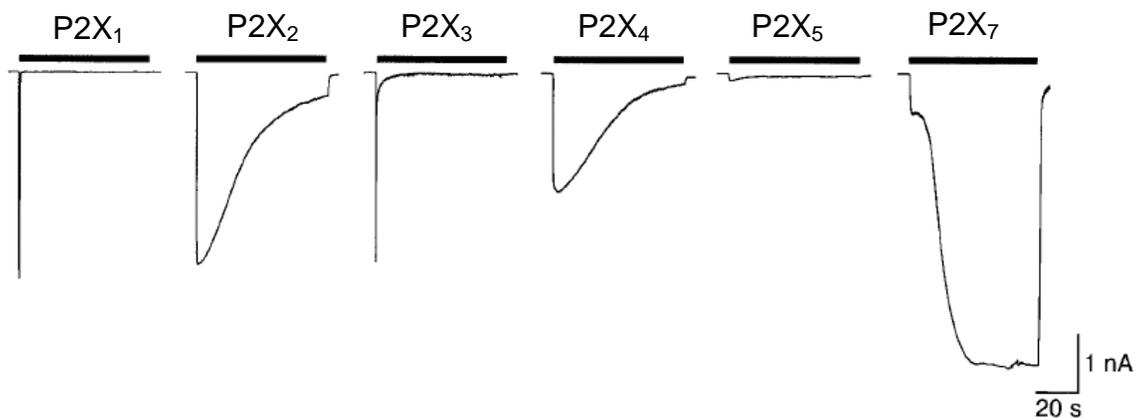


Figura 5. Cinética de las corrientes inducidas por ATP en distintos subtipos de receptores P2X de rata. Corrientes inducidas por aplicaciones largas de ATP (30 μ M, excepto 1 mM para P2X₇). La desensibilización de los receptores P2X es diversa: rápida para P2X₁ y P2X₃, lenta para P2X₂ y P2X₄ y nula para P2X₇. Los registros fueron obtenidos 48 horas después de la transfección de células HEK 293 con 1 μ g/ml de cDNA (North, 2002).

Existen algunas diferencias en las cinéticas de la respuesta entre los diversos estudios y sistemas de expresión, sugiriendo que tal vez este sujeto a regulación por el nivel de expresión, tipo celular o ambiente local. En varios trabajos se han estudiado las bases moleculares de la cinética de las respuestas de los receptores P2X. Por ejemplo, existen estudios con quimeras de las subunidades P2X, en donde sustituyen el dominio TM1 o el dominio TM2 de la subunidad P2X₁ o P2X₃ por el de las subunidad P2X₂ observando una desensibilización parecida a la del receptor P2X₂. Demostrando que los dos dominios transmembranales podrían contribuir a la cinética de la respuesta (Werner *et al.*, 1996). Posteriormente, análisis de variantes generadas por *splicing* alternativo del ARNm de la subunidad P2X₂ indican que el COOH terminal intracelular también regula la cinética de desensibilización (Brandle *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1999). La contribución de la región correspondiente al amino terminal intracelular se demostró a través de una mutación en un sitio de fosforilación, en el residuo Tre 18, el cual es fosforilado por la proteína cinasa C. Dicho residuo está presente en el amino terminal y conservado en todas las subunidades P2X. Esta mutación condujo a una reducción en la amplitud del pico de corriente y velocidad de la cinética de desensibilización de varios receptores P2X (Boue-Grabot *et al.*, 2000; Ennion & Evans, 2002). También, mutaciones en el dominio extracelular de receptores P2X₁ pueden cambiar significativamente la cinética de la respuesta así como la potencia del ATP (Ennion *et al.*, 2000). Tomando en conjunto estos estudios, se demuestra que la regulación de la cinética de la respuesta a ATP de

los receptores P2X es un proceso multicomponente que involucra interacciones de varias regiones del receptor.

Propiedades farmacológicas

En la actualidad se conoce que la farmacología de los receptores P2X es muy compleja. No existen a la fecha agonistas o antagonistas específicos para la mayoría de los receptores P2X. Inclusive la sensibilidad a agonistas o antagonistas depende no solo del subtipo de receptor P2X sino además de la especie de donde fue obtenido el receptor. Por ejemplo, mientras que los receptores P2X₄ de rata son poco sensibles al antagonista PPADS (IC₅₀ > 100 μM), el P2X₄ de humano es notablemente más sensible a este antagonista (IC₅₀ < 10 μM) (Jones *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha demostrado que los receptores P2X₇ de humano y rata son altamente sensibles al agonista BzATP mientras que el de cobayo es insensible o antagonizado por este mismo agonista (Fonfria *et al.*, 2008).

Los receptores P2X también pueden estar influenciados por moduladores alostéricos como son los cationes divalentes, por ejemplo el Zn²⁺ el cual potencia los receptores P2X₂ y P2X_{2/3}, mientras que inhibe a los receptores P2X₁ y P2X₇ (Roberts *et al.*, 2006). La ivermectina es un modulador positivo específico de los receptores P2X₄ y P2X_{4/6}, mientras que es inactivo sobre los receptores P2X₂, P2X₃, P2X_{2/3}, y P2X₇ (Khakh *et al.*, 1999). Estas moléculas pueden ser importantes herramientas farmacológicas para la caracterización de los receptores P2X expresados endógenamente en los tejidos nativos.

En las tablas II y III se enlistan los agonistas y antagonistas utilizados en esta tesis y sus valores de concentración que producen el 50% del efecto máximo (EC_{50} e IC_{50}) en los diferentes receptores P2X recombinantes (Gever *et al.*, 2006).

Tabla II. Comparación de las propiedades farmacológicas de los receptores P2X homoméricos (Gever *et al.*, 2006).

	P2X ₁	P2X ₂	P2X ₃	P2X ₄	P2X ₅	P2X ₆	P2X ₇
Desensibilización	Rápida	Lenta	Rápida	Lenta	Lenta	Lenta	Lenta
Agonista EC_{50} (μ M)							
ATP	1	1-30	1	10	10	12	>100
ATP-γ-S	3	1-30	0.5	10	10	9	>100
α,β-meATP	1	>300	1	>300	>300	>100	>300
Antagonista IC_{50} (μ M)							
PPADS	1	1	1	>500	≤ 1	>100	500
Suramina	1	10	3	>500	≤ 1	>100	≥ 50

Tabla III. Comparación de las propiedades farmacológicas de los receptores P2X heteroméricos (Gever *et al.*, 2006).

	P2X _{1/5}	P2X _{2/3}	P2X _{2/6}	P2X _{4/6}
Desensibilización	Lenta	Lenta	Lenta	Lenta
Agonista EC_{50} (μ M)				
ATP	1	1	30	5
ATP-γ-S	1	1	30	8
α,β-meATP	1-5	1-3	>100	12
Antagonista IC_{50} (μ M)				
PPADS	≤ 1	≤ 4	?	>10
Suramina	≤ 1	≤ 4	6	>10

Localización de los receptores P2X en el SNE

En el intestino de cobayo, el subtipo P2X₂ fue localizado por inmunohistoquímica en motoneuronas inhibitoras, neuronas secreto-motoras no-colinérgicas e IPANs de los plexos mientérico y submucoso (Castelucci *et al.*, 2002). Mientras que el subtipo P2X₃ se ha encontrado en diferentes neuronas mientéricas incluyendo algunas neuronas NOS positivas (motoneuronas inhibitoras e interneuronas descendentes), interneuronas ascendentes y motoneuronas del músculo longitudinal, pero no en neuronas sensoriales (Poole *et al.*, 2002; Van Nassauw *et al.*, 2002). Por otra parte, (Yiangou *et al.*, 2001) encontró abundante inmunoreactividad para el subtipo P2X₇ en la superficie de cuerpos celulares de ganglios en ambos plexos mientérico y submucoso de intestino delgado de cobayo. En el intestino de ratón, por inmunohistoquímica, se ha demostrado la presencia de los receptores P2X₂, P2X₃ y P2X₅ en muchas neuronas mientéricas y submucosas (Ruan & Burnstock, 2005). Aunque, se ha reportado que solo los receptores P2X₂ participan en la transmisión rápida (Ren *et al.*, 2003).

Los receptores P2X median la transmisión sináptica rápida en el SNE

En íleo de cobayo, registros electrofisiológicos indican que los EPSPs rápidos del 67% de neuronas S mientéricas son sensibles a antagonistas PPADS o suramina (Galligan & Bertrand, 1994). Sin embargo, los EPSPs rápidos purinérgicos no son uniformemente distribuidos a lo largo del tracto gastrointestinal. Registros de diferentes segmentos del intestino indican que los EPSPs rápidos purinérgicos son más comunes en el íleo que en el duodeno, yeyuno, taeniae coli y colon proximal y

distal, mientras que son ausentes en el cuerpo gástrico. También se han identificado EPSPs rápidos mediados por ATP en el plexo submucoso del cobayo (Ren & Bertrand, 2008).

Receptores P2X implicados en desórdenes gastrointestinales

(Yiangou *et al.*, 2001) demostró por inmunohistoquímica y Western blot un incremento significativo en la expresión del receptor P2X₃ en los plexos submucoso y mientérico de intestino delgado en pacientes con IBD (enfermedad del intestino inflamado), lo que sugiere que el receptor P2X₃ podría tener un papel primordial en el incremento de la dismotilidad (motilidad anormal del intestino) y dolor. Este punto de vista es apoyado en un modelo de colitis en ratas, donde se demostró que los receptores P2X₃ están inducidos en el Ganglio de la Raíz Dorsal (DRG) y que el ATP liberado por la distensión se incrementa, resaltando la contribución de los receptores P2X en la traducción mecano-sensorial (Wynn *et al.*, 2004). Además, en un ratón *knock-out* de la subunidad P2X₃, la peristalsis se ve afectada en el intestino delgado (Bian *et al.*, 2003). También, se tiene evidencia de que la sensibilización periférica de los receptores P2X₃ en neuronas aferentes vagales y espinales en el estómago podrían contribuir a la dispepsia y el desarrollo de hiperalgesia visceral (Dang *et al.*, 2005). Recientemente, los receptores P2X₇ también se han relacionado con la percepción del dolor. Ratones que carecen del receptor P2X₇ muestran una reducción marcada en el dolor de tipo neuropático y crónico de tipo inflamatorio (Chessell *et al.*, 2005) y antagonistas específicos de P2X₇ (A-438079 y A-740003) inhiben el dolor neuropático en ratas (Honore *et al.*,

2006; Donnelly-Roberts & Jarvis, 2007). Por tal motivo, la posibilidad de que los receptores P2X sean blancos potenciales para el tratamiento con fármacos del síndrome del colon irritable (IBS) ha ido en aumento (Galligan, 2004).

Propiedades electrofisiológicas y farmacológicas de los receptores P2X en el SNE

La técnica de Patch Clamp en sus modalidades de célula completa y “outside-out” se usaron para caracterizar las propiedades fisiológicas y farmacológicas de los receptores P2X en neuronas mientéricas de íleo de cobayo. ATP y análogos indujeron una corriente entrante rápida en más del 90% de las neuronas estudiadas; dichas corrientes mostraron rectificación entrante y un potencial de inversión de 0 mV dependiente de la concentración de sodio extracelular. Corrientes de canal único fueron observadas cuando los parches de membrana “outside-out” fueron expuestos a ATP. Estos canales tienen una conductancia de aproximadamente 17 picosiemens (pS) (Barajas-Lopez *et al.*, 1996a). Las I_{ATP} se desensibilizan en un 80% en 7 s (Zhou & Galligan, 1996). El PPADS antagonizó los efectos del ATP con un IC_{50} de 4 μ M. Cibacron Blue 3GA incremento las corrientes activadas por ATP mientras que el Basilen Blue E-3G tuvo un efecto antagónico muy débil ($IC_{50} \geq 3$ mM). El orden de potencia de los agonistas usados para inducir corrientes entrantes fue: ATP- γ -S = ATP = 2-Me-S-ATP >> α, β -meATP = β, γ -meATP; adenosina y UTP (a una concentración mayor de 1 mM) fueron inactivos (Barajas-Lopez *et al.*, 1996a).

En neuronas mientéricas de cobayo, el α,β -meATP fue un agonista débil y no antagonizó los efectos de ATP sobre los receptores P2X (Barajas-Lopez *et al.*, 1996a); sin embargo (Zhou & Galligan, 1996) encontró lo contrario, ya que este análogo de ATP, actuó como agonista parcial de las I_{ATP} . Únicamente los subtipos homoméricos P2X₁ y P2X₃ y subtipos heteroméricos P2X_{2/3}, P2X_{1/5} y P2X_{4/6} son sensibles a α,β -meATP (North & Surprenant, 2000); así, los receptores P2X presentes en las neuronas mientéricas de cobayo, pueden ser receptores homoméricos P2X₂. Todavía se desconoce si estos receptores en el intestino delgado de cobayo sean homoméricos o heteroméricos conteniendo otro subtipo de receptor. En ratón, se encontró que el ATP pero no el α,β -meATP depolariza las neuronas S en tejidos de intestino delgado en ratones silvestres, pero en ratones carentes de la subunidad P2X₂, el ATP o α,β -meATP no depolarizaron las neuronas S. Estos datos indican que en el intestino delgado de ratón el receptor P2X expresado en neuronas S es el subtipo P2X₂ (Ren *et al.*, 2003).

(Barajas-Lopez *et al.*, 1993) reportó que la suramina, un antagonista de los receptores P2X, potenció las I_{ATP} en neuronas mientéricas de cobayo, a través de un mecanismo que fue independiente de su efecto inhibitorio sobre la actividad ectonucleotidasa. Por el contrario, (Galligan & Bertrand, 1994) encontró que la suramina inhibió los EPSPs rápidos inducidos por ATP en 30 de 35 neuronas mientéricas de íleo de cobayo. Por otra parte, (Hu *et al.*, 2001) observó que la suramina potenció las corrientes activadas por ATP en el 70% de estas neuronas, mientras que en el otro 30% de las neuronas la corriente fue suprimida por este antagonista. Por otro lado, en neuronas mientéricas de rata, sólo el efecto

inhibidor de suramina sobre los receptores P2X se ha descrito (Ohta *et al.*, 2005). Estas controversias podrían ser el resultado de la expresión y combinación de subpoblaciones de receptores en estas neuronas y diferencia de especies.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Basados en lo anterior, en el presente trabajo planteamos realizar un estudio comparativo de los efectos de la suramina sobre los receptores P2X en las neuronas mientéricas de ratón y cobayo que pudieran explicar estos resultados controversiales. Además, en estos modelos se evaluarán las propiedades electrofisiológicas, como son el “*onset*”, “*decay*” y la cinética de desensibilización de los receptores P2X, así como el efecto de PPADS sobre las I_{ATP} , por medio de registros de célula completa. Estos resultados nos darán información sobre la existencia de posibles variaciones entre especies y la presencia de diferentes subpoblaciones de receptores P2X en neuronas mientéricas de ratón y cobayo.

IV. JUSTIFICACIÓN

Actualmente se ha propuesto a los receptores P2X como blancos terapéuticos para el tratamiento de pacientes con desordenes gastrointestinales en base a los resultados de expresión, distribución y función de estos receptores en el intestino. Sin embargo, falta más información acerca de las propiedades farmacológicas de estos receptores en neuronas entéricas, ya que la mayoría de los estudios previos se han realizado con fármacos poco selectivos, lo que imposibilita una caracterización completa de dichos receptores. Asimismo, uno de los animales de experimentación más estudiado ha sido el cobayo, puesto que constituye un modelo experimental único debido a la facilidad de acceso a los distintos plexos nerviosos. Sin embargo estudios previos demuestran que los receptores P2X de cobayo tienen diferentes propiedades comparado con aquellos presentes en otras especies, a pesar de que son los más parecidos a los receptores P2X humanos. Por lo que resulta interesante encontrar si las propiedades farmacológicas de los receptores P2X de neuronas entéricas de ratón son similares aquellas presentes en neuronas entéricas de cobayo.

V. HIPÓTESIS

Los receptores P2X de rata y ratón tienen propiedades farmacológicas similares y los receptores P2X de neuronas mientéricas de rata poseen propiedades farmacológicas diferentes con respecto a los P2X mientéricos de cobayo, por lo cual proponemos que estos últimos son diferentes a los de ratón.

VI. OBJETIVO

Caracterizar electrofisiológica y farmacológicamente los receptores P2X nativos en neuronas mientéricas de ratón y de cobayo usando la técnica de *Patch Clamp* en su configuración de célula completa para medir la actividad de estos canales.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del cultivo celular

Ratones C57/BL6 (19 – 25 g) y cobayos (100 – 200 g) de ambos sexos, fueron sacrificados por decapitación y se extrajo un segmento de 10-15 cm de yeyuno proximal. Se mantuvo abierto longitudinalmente en solución de Krebs modificada (en mM: NaCl, 126; NaH₂PO₄, 1.2; MgCl₂, 1.2; CaCl₂, 2.5; KCl, 5; NaHCO₃, 25; glucosa, 11; gasificada con 95% O₂ and 5% CO₂). En ambos animales, la capa mucosa y submucosa de este segmento de intestino fue disecada. En cobayo, se removió la mayoría del musculo circular, quedando el plexo mientérico embebido en el musculo longitudinal, mientras que en ratón la *muscularis externa* completa permanecieron con el plexo mientérico.

La preparación del plexo mientérico fue disociada usando un tratamiento secuencial con dos soluciones enzimáticas, descrito por (Barajas-Lopez *et al.*, 1996b). Se describe brevemente, la primera solución contiene papaína (0.01 mg/ml; activada con 0.4 mg/ml de L-cisteína) y la segunda contiene colagenasa (1 mg/ml) y dispasa (4 mg/ml). Las enzimas fueron lavadas con medio L-15 y después las células se sembraron en medio D-MEM sobre cubreobjetos redondos cubiertos con colagena estéril de cola de rata. El medio de cultivo D-MEM contenía 97.5% de medio mínimo esencial, 2.5% de suero de cobayo (excepto para los cultivos celulares de ratón, el cual contenía 2.5% de suero bovino fetal), L-glutamina 2 mM, penicilina 10 U/ml, estreptomycin 10 µg/ml, glucosa 15 mM, citosina-β-D-arabinofuranosida 10 µM, fluorodeoxiuridina 10 µM y uridina 10 µM.

Registros electrofisiológicos

Se conoce que el ATP modula canales de potasio en la membrana de neuronas entéricas vía receptores unidos a proteínas G (Christofi *et al.*, 1997; Barajas-Lopez *et al.*, 2000), para disminuir la participación de estos canales en las corrientes, los experimentos se realizaron en presencia de Cs^+ , el cual bloquea los canales de potasio. Además, las corrientes de membrana generadas tras la aplicación del agonista fueron registradas usando la técnica de Patch Clamp en su configuración de célula completa, lo que descartaría efectos mediados por segundos mensajeros (Gillis *et al.*, 1991). Esta configuración se logra después de obtener un gigasello entre la pipeta de cristal y los lípidos que componen la membrana celular (configuración de célula sellada), una vez que se alcanza esta configuración se aplica una succión para romper la membrana que separa al citoplasma del interior de la pipeta, logrando así continuidad entre los componentes (configuración de célula completa) (Figura 6). Esto nos ayuda a monitorear los cambios iónicos que nos generan las corrientes que registramos.

Las I_{ATP} fueron registradas en cultivos primarios de neuronas mientéricas de corto tiempo (2 – 48 h), para evitar problemas de fijación de voltaje, con los amplificadores Axopatch 1D o Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Las pipetas de registro se fabricaron utilizando capilares de borosilicato y el estirador de pipetas Narishigue. Posteriormente fueron pulidas utilizando el microscopio/pulidor Narishigue (MF-830) hasta que el diámetro externo de la pipeta fuera de 1.5 a 2.0 μm con una resistencia de entre 1-4 $\text{M}\Omega$. Estas pipetas de baja resistencia y una ligera succión en el interior de la pipeta ayudan a

mantener una baja resistencia de acceso (por lo general inferior a 5 M Ω), el error de voltaje debido a la resistencia en serie fue inferior a 10 mV, y por lo tanto, no se realizó ninguna compensación.

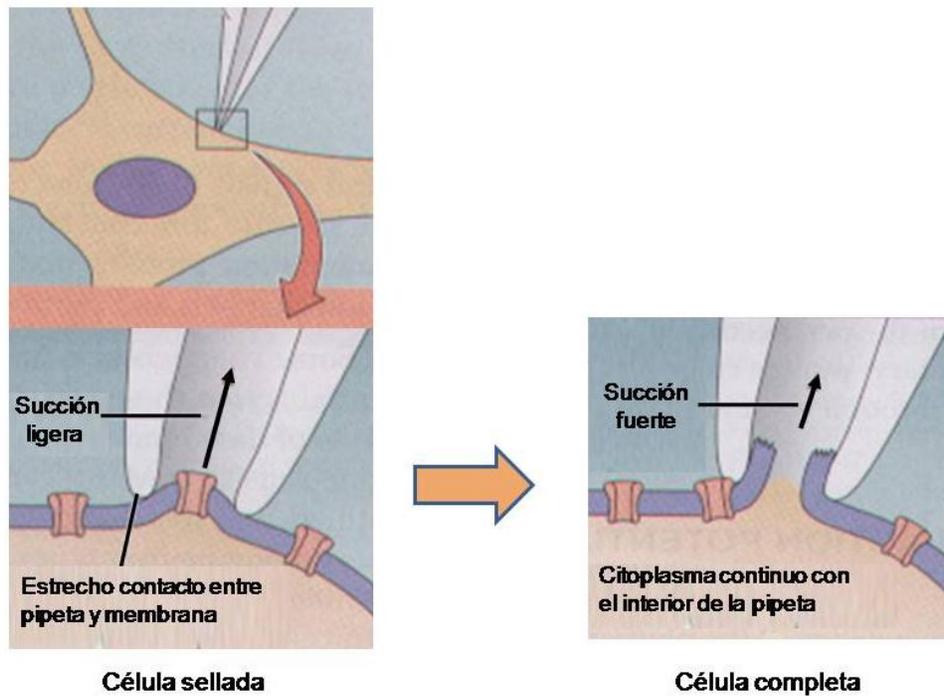


Figura 6. Patch Clamp en su configuración de célula completa. Patch clamp es una técnica electrofisiológica que se usa para estudiar la actividad de canales iónicos en la membrana celular. Se basa en la formación de un sello de alta resistencia entre la micropipeta y la membrana celular. El sello se logra aplicando una succión suave. Una vez logrado el sello se aplica otra succión de mayor intensidad para romper la membrana y obtener la configuración de célula completa.

El potencial de membrana se fija a -60 mV. La composición de las soluciones utilizadas fue la siguiente: dentro de la pipeta (en mM): CsCl, 150; EGTA, 10; HEPES, 5; NaCl, 10; ATPMg, 3 and GTPNa, 0.1; se ajustó el pH a 7.3 – 7.4 con CsOH. La solución externa (en mM): NaCl, 160; CaCl₂, 2; glucose, 11; HEPES, 5

and CsCl, 3; el pH fue ajustado a 7.3 – 7.4 con NaOH. Con estas soluciones, la resistencia de acceso de las neuronas fue $\geq 1 \text{ G}\Omega$. Cuando las concentraciones de ATP usadas para estimular las células eran más altas que $100 \mu\text{M}$, se reajusto el pH con NaOH. Las corrientes de célula completa fueron registradas en una PC usando los softwares AXOTAPE y AxoScope 9 (Axon Instruments) y analizadas con los software Clampfit 10.0 y Axograph X1.1 (Axon Instruments). La cámara de registro fue continuamente perfundida con solución externa aproximadamente a una velocidad de 2 ml/min. Cambios rápidos en la solución externa fueron realizados utilizando un dispositivo de ocho-tubos, estos tubos estaban conectados a jeringas que contenían las soluciones control y experimental. El tubo que contenía la solución control fue colocado enfrente de la célula por registrar y una aplicación externa de la solución experimental fue realizada por el cambio rápido del tubo control por el tubo que liberaba esta misma solución más la substancia experimental, el cual ya drenaba la solución que contenía. Los tubos son movidos usando un micromanipulador (WR-88; Narishigue Scientific Instrument Lab, Tokyo Japan). Las substancias experimentales fueron removidas por el regreso a la solución control (Figura 7). La solución externa fue liberada por gravedad y el nivel de la jeringa fue continuamente ajustado para minimizar los cambios en la velocidad de flujo. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente ($\sim 23^\circ\text{C}$).

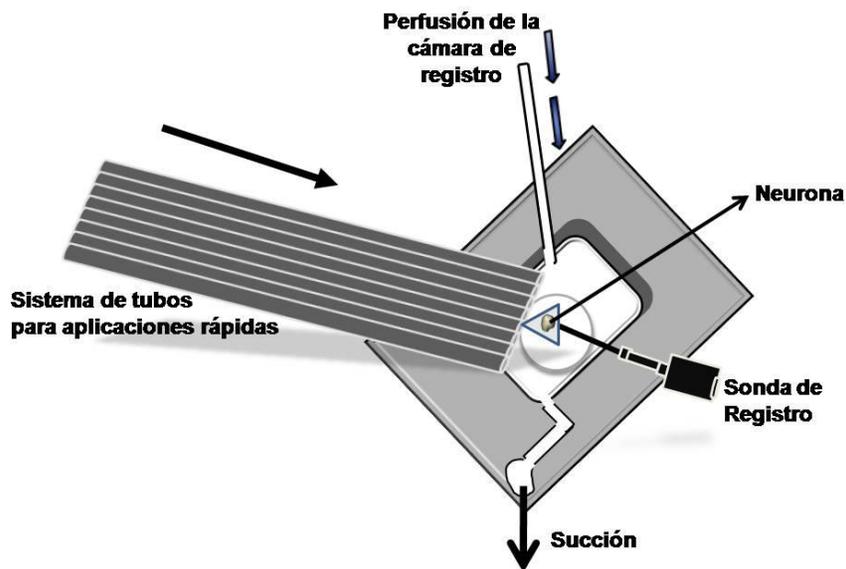


Figura 7. Representación esquemática de cámara de registro y del sistema de tubos para aplicaciones rápidas de las soluciones experimentales (esquema creado por Barajas-López C.)

Fármacos y soluciones utilizadas

Medio L15, MEM, Solución Hanks, penicilina-estreptomicina y L-glutamina fueron comprados en GIBCO, las enzimas colagenasa tipo I y la papaína fueron adquiridas de Worthington. La dispasa fue adquirida de Roche. Las siguientes sustancias fueron adquiridas en Sigma: L-cisteína, ATP, α,β -meATP, ATP- γ -S, suramina, PPADS, CsCl, EGTA, HEPES, NaCl, ATPMg, GTPNa, CaCl_2 , glucosa, CsOH, NaOH, NaH_2PO_4 , MgCl_2 , KCl, NaHCO_3 .

Las soluciones stock (10 y 100 mM) de ATP y otros fármacos se prepararon usando agua destilada y se almacenaron a -20°C . Para la aplicación de todos los fármacos fueron diluidos en solución extracelular a la concentración requerida.

Análisis de datos

Para normalizar las I_{ATP} , la respuesta a ATP 1 mM fue considerada como el 100%, en cada célula. Los resultados fueron expresados en promedio \pm el error estándar del promedio (S.E.M.). Los datos fueron considerados estadísticamente diferentes cuando los valores de P a dos colas fueron menores a 0.05. Para probar diferencias entre dos conjuntos de datos del mismo grupo de neuronas usamos la prueba de t -Student pareada. Para datos obtenidos de grupos diferentes de neuronas usamos Análisis de varianza (ANOVA), para probar si las varianzas son homogéneas o no, y entonces usamos la adecuada prueba de t -Student no pareada para encontrar diferencias entre los valores promedio. La prueba de ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett se usaron cuando se hicieron comparaciones múltiples de promedios. El número de células usadas se representa como n y los datos de las curvas concentración-respuesta se ajustaron a una función logística. Los datos mostrados en las Figuras 12 y 15 se ajustaron a una función logística de dos parámetros y los datos de las Figuras 11, 13A-B, 14D y 16 se ajustaron a una función logística de tres parámetros como lo describió (Kenakin, 1993).

El ajuste exponencial para el análisis del “*onset*”, de la caída de la corriente, así como para la desensibilización de la corriente se realizó utilizando el software Axograph X1.1 (Axon Instrumens). Dicho software utiliza la técnica de Chebyshev, la cuál es rápida, no iterativa y estable; fue desarrollada por George C. Malachowski y la licencia es de Axon Instrumens.

VIII. RESULTADOS

a. Las cinéticas de las I_{ATP} de las neuronas mientéricas de ratón no presentan diferencias a las de cobayo

La aplicación de 1 mM de ATP indujo una corriente entrante rápida en la gran mayoría de las neuronas mientéricas analizadas, específicamente en ratón fueron 125 de 127 neuronas y en cobayo fueron 80 de 83 neuronas. El pico de esta corriente fue alcanzado en un segundo y el promedio de amplitud del pico fue de 1.3 ± 0.8 (en el rango de 0.20 a 5.8 nA) para ratón y 1.5 ± 0.9 nA (en el rango de 0.20 a 5.5 nA) para cobayo. Los *onsets* de la I_{ATP} en neuronas mientéricas de ratón y cobayo no fueron significativamente diferentes. De esta manera, el tiempo requerido para alcanzar la corriente media máxima fue de 40 ± 4 (n=13) y 49 ± 7 (n=16) ms para ratón y cobayo, respectivamente (Figura 8A-B). Después de remover el ATP de la solución extracelular, la corriente disminuyó rápidamente y este decaimiento se ajustó de la mejor manera a una función exponencial y sus valores de τ fueron 106 ± 18 ms (11 neuronas de ratón) y 142 ± 17 ms (12 neuronas de cobayo) (Figura 9A-B). Después de alcanzar sus amplitudes máximas las I_{ATP} disminuyeron a pesar de la presencia del agonista (desensibilización de la corriente). La cinética de este proceso de desensibilización fue similar en ambas especies (Figura 10A-B). En cuatro neuronas de ratón y cinco neuronas de cobayo analizadas, expuestas a aplicaciones largas (90 s) de ATP 1 mM, la desensibilización del receptor fue mejor ajustada a la suma de dos

funciones exponenciales, siendo los valores de $\tau_1=5.4 \pm 1$ y $\tau_2=34 \pm 5$ s para ratón y $\tau_1=4.4 \pm 1$ y $\tau_2=55 \pm 11$ s para cobayo.

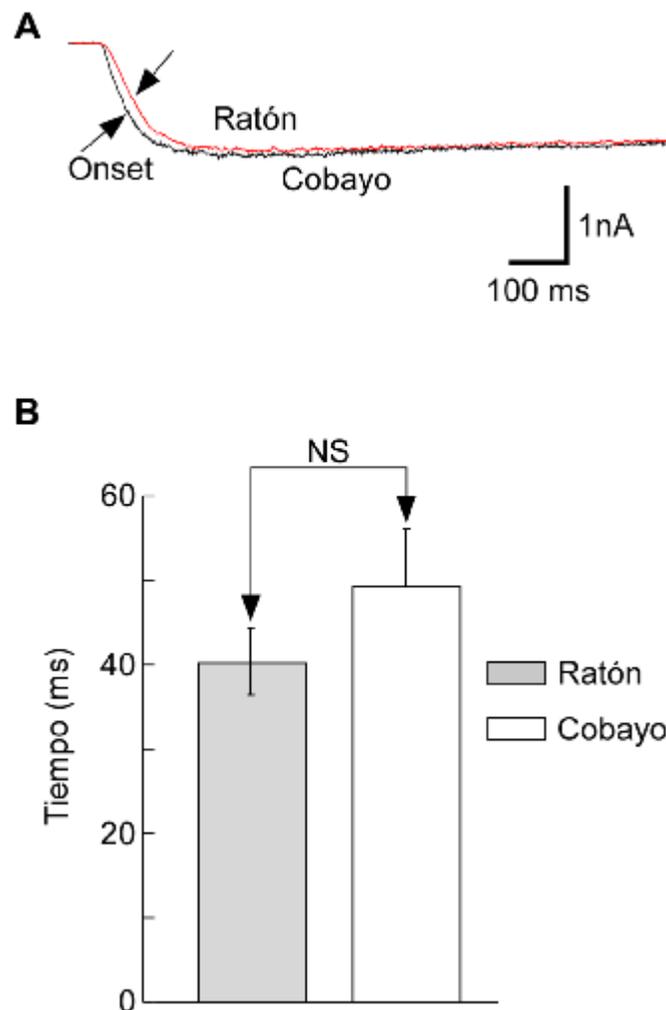


Figura 8. Los onsets de la I_{ATP} en neuronas mientéricas de ratón y cobayo no son diferentes. A: Registros representativos del *onset* de las I_{ATP} . Las flechas indican la mitad de la corriente máxima. Solamente la porción inicial de las corrientes (~ 1 s) es mostrada y estas fueron registradas a un potencial de -60 mV. B: Las barras y la línea en la parte superior de éstas representan el promedio y el S.E.M. del tiempo requerido para alcanzar la corriente media máxima inducida por 1 mM de ATP en neuronas mientéricas de ratón ($n=13$) y de cobayo ($n=16$), el cual no fue significativamente diferente (NS).

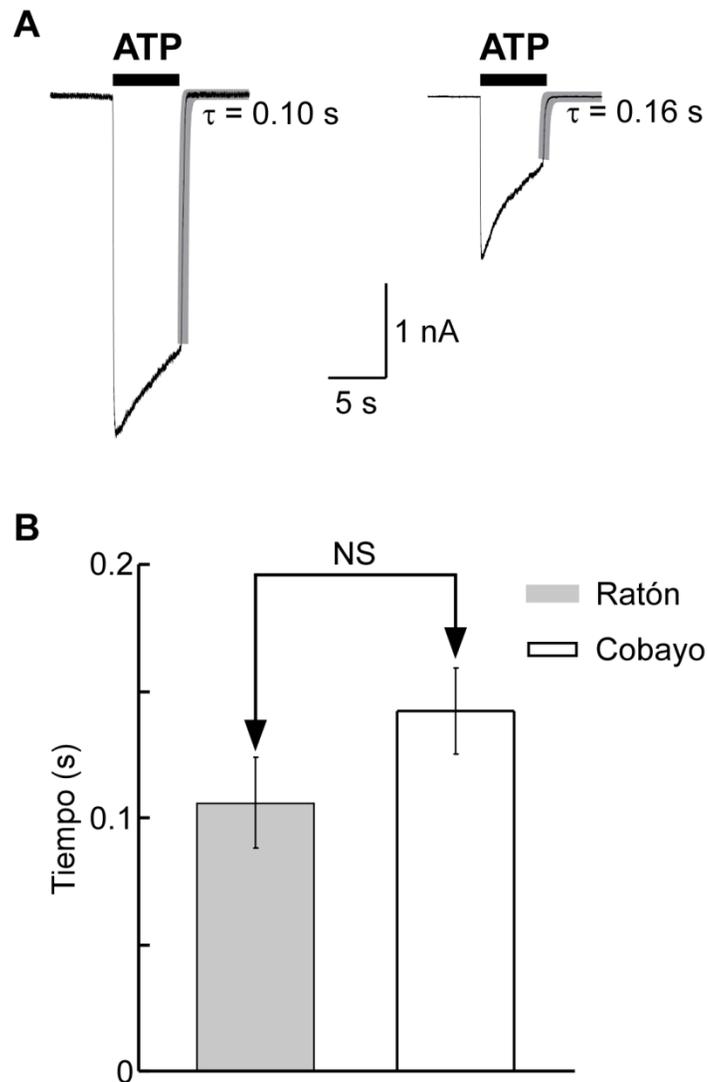


Figura 9. La cinética de la caída de las I_{ATP} es similar en neuronas mientéricas de ratón y cobayo. A: Registros representativos de las I_{ATP} 1mM de una neurona de ratón (registro izquierdo) y una de cobayo (registro derecho). La caída de la I_{ATP} se ajusto mejor a una sola función exponencial (línea gris sobrepuesta en los registros originales). B: las barras y las líneas sobre la parte superior de éstas representan el promedio y el S.E.M. de los valores τ de las exponenciales de 11 neuronas ratón y 13 neuronas de cobayo. La τ de la cinética de caída de la I_{ATP} de ratón no fue significativamente diferente (NS) de la τ de cobayo.

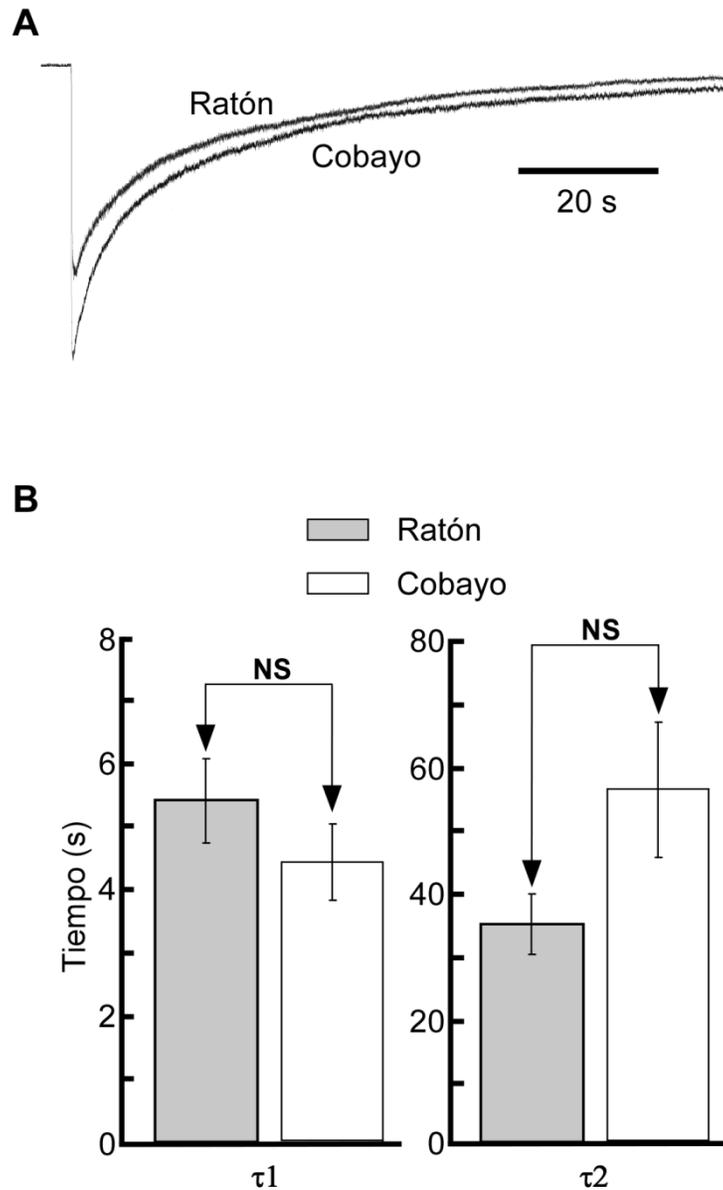


Figura 10. La cinética de desensibilización de las I_{ATP} en neuronas mientéricas de ratón y cobayo no son diferentes. A: Registros representativos de las corrientes inducidas por aplicaciones de larga duración (90 s) de ATP 1 mM de una neurona mientérica de ratón y cobayo. La cinética de desensibilización de las I_{ATP} para ambas especies se ajusto mejor a la suma de dos funciones exponenciales. El ajuste a las funciones exponenciales fue realizado usando los datos entre el pico y el estado cuasi estacionario de las corrientes. B: Las barras y la línea en la parte superior de éstas gráficas representan el promedio y el S.E.M. de los valores τ de las dos funciones exponenciales de 4 neuronas de ratón y 5 de cobayo. Los valores τ de las dos funciones exponenciales de las I_{ATP} en neuronas de ratón no fueron significativamente diferentes (NS) de los valores τ de las I_{ATP} en neuronas de cobayo.

b. Orden de potencia de agonistas

En la Figura 11 se muestran las curvas concentración-respuesta para ATP (10 – 3000 μM) en neuronas mientéricas. Los valores de EC_{50} fueron de $114 \pm 19 \mu\text{M}$ (coeficiente de Hill de 1.0 ± 0.1) en ratón y de $115 \pm 51 \mu\text{M}$ (coeficiente de Hill de 0.8 ± 0.2) en cobayo. La figura 11 también muestra las curvas concentración-respuesta para ATP- γ -S (3 – 1000 μM), la cual tiene similar potencia que la del ATP. Así, el valor de EC_{50} para ratón fue de 98 ± 35 (coeficiente de Hill 1.1 ± 0.3) y para cobayo fue de $114 \pm 45 \mu\text{M}$ (coeficiente de Hill 0.9 ± 0.2). Cien micro molar de α, β -meATP no indujo ninguna respuesta en cinco neuronas mientéricas de ratón e indujo una respuesta marginal en siete neuronas mientéricas de cobayo (Figura 11). Por lo tanto, el orden de potencia de los agonista es el mismo en ambas especies, siendo $\text{ATP} = \text{ATP-}\gamma\text{-S} \gg \alpha, \beta\text{-meATP}$.

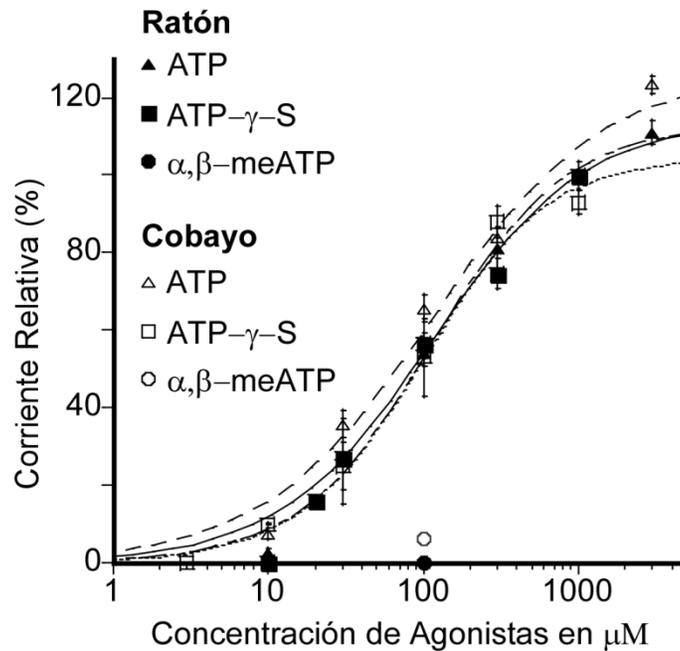


Figura 11. El orden de potencia de los agonistas para los P2XRs de neuronas mientéricas de ratón es similar que para los de cobayo. Curvas concentración-respuestas para ATP, ATP- γ -S y α,β -meATP. Los símbolos representan el valor promedio y las líneas verticales muestran los S.E.M. de datos obtenidos de 3-15 neuronas mientéricas de ratón y cobayo. Las líneas sigmoideas representan el mejor ajuste a una función logística de tres parámetros. Varias concentraciones de ATP y análogos de éste se aplicaron durante 5 s cada 5 min. Las respuestas se normalizaron respecto a 1 mM de ATP en la misma célula.

c. Efectos inhibitorios del PPADS sobre las I_{ATP} en neuronas mientéricas de ratón y cobayo

Las I_{ATP} 1 mM fueron inhibidas por PPADS (0.01 – 30 μ M) en una manera dependiente de la concentración en ambas especies (Figura 12A-B). Este efecto fue dependiente del tiempo, requiriendo 4 min para alcanzar su efecto máximo. PPADS fue más potente en ratón que en cobayo ($P < 0.05$), siendo los valores de IC_{50} de 0.6 ± 0.1 (coeficiente de Hill de 1.0 ± 0.2) y 1.8 ± 0.3 μ M (coeficiente de Hill de 1.1 ± 0.2), respectivamente.

Como se informó anteriormente en neuronas mientéricas de cobayo (Barajas-Lopez *et al.*, 1996a), el efecto inhibitorio del PPADS fue difícil de eliminar y la I_{ATP} se recuperó sólo el $24 \pm 4\%$ (3 neuronas de ratón) y $20 \pm 7\%$ (5 neuronas de cobayo) de la amplitud de la I_{ATP} control, diez minutos después de la eliminación de este antagonista. Por lo tanto, cambiamos el cubreobjetos que contenía las neuronas después de cada experimento con PPADS, incluso con los experimentos fallidos.

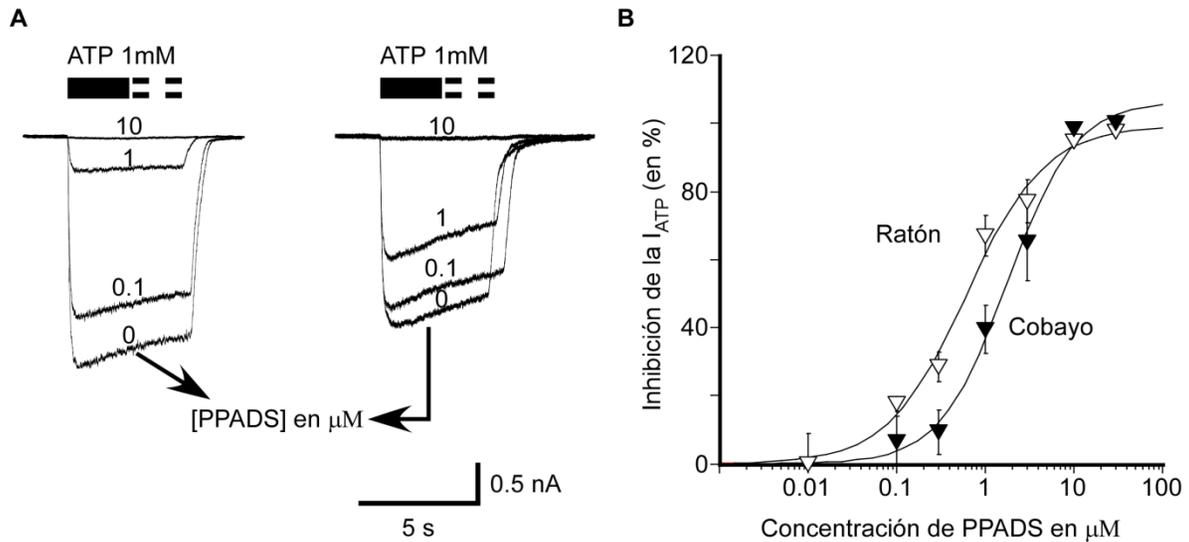


Figura 12. PPADS es más potente para inhibir las I_{ATP} en neuronas mientéricas de ratón que las de cobayo. A: Registros representativos de las I_{ATP} 1mM antes y durante la aplicación de diferentes concentraciones de PPADS en la misma neurona mientérica de ratón (registro izquierdo) y de cobayo (registro derecho). B: curva concentración-respuesta para el efecto de PPADS (0.01-30 μM) sobre las I_{ATP} . El porcentaje de la respuesta fue estimado comparando la amplitud de la I_{ATP} en presencia de PPADS con la de su ausencia. Los datos fueron ajustados a una función logística de dos parámetros (asumiendo el 100% de inhibición) como lo reportó Kenakin (1993) y obtuvimos un valor IC_{50} de $0.6 \pm 0.1 \mu\text{M}$ (Coeficiente de Hill de 1.0 ± 0.2) para neuronas mientéricas de ratón y 1.8 ± 0.3 (Coeficiente de Hill de 1.1 ± 0.2) para neuronas mientéricas de cobayo. Cada punto representa el promedio \pm S.E.M. de tres a cinco neuronas.

d. Efectos de la suramina sobre las I_{ATP} en neuronas mientéricas de ratón

En neuronas mientéricas de ratón, suramina (10 – 3000 μM) siempre inhibió las I_{ATP} , de manera reversible y dependiente de la concentración (Figura 13A). La curva concentración-respuesta para el efecto de la suramina reveló un efecto máximo del 76%, sugiriendo que hay una subpoblación de canales (24% del total) que son resistentes a suramina. En presencia de 30 μM de suramina, la curva concentración-respuesta de ATP fue desplazada a la derecha, dando un valor de EC_{50} $140 \pm 47 \mu\text{M}$ con un Coeficiente de Hill de 1.0 ± 0.3 (Figura 13B). Este efecto inhibitorio no fue superado por el aumento de la concentración de ATP, lo cual indica que la suramina no compite por el sitio del ATP. Este efecto inhibitorio se observó durante aplicaciones separadas (Figura 13C) y secuenciales de ATP y suramina (Figura 13D); no se observó potenciación en ninguno de los experimentos.

En aplicaciones secuenciales de ATP y suramina (ATP-ATP+Suramina-ATP), la corriente se recupero de la inhibición y esta recuperación se ajusto mejor a una función exponencial con una τ promedio de 0.2 ± 0.1 s y 0.4 ± 0.1 s para 30 μM y 3000 μM de suramina (n=5) (Figura 18A y E).

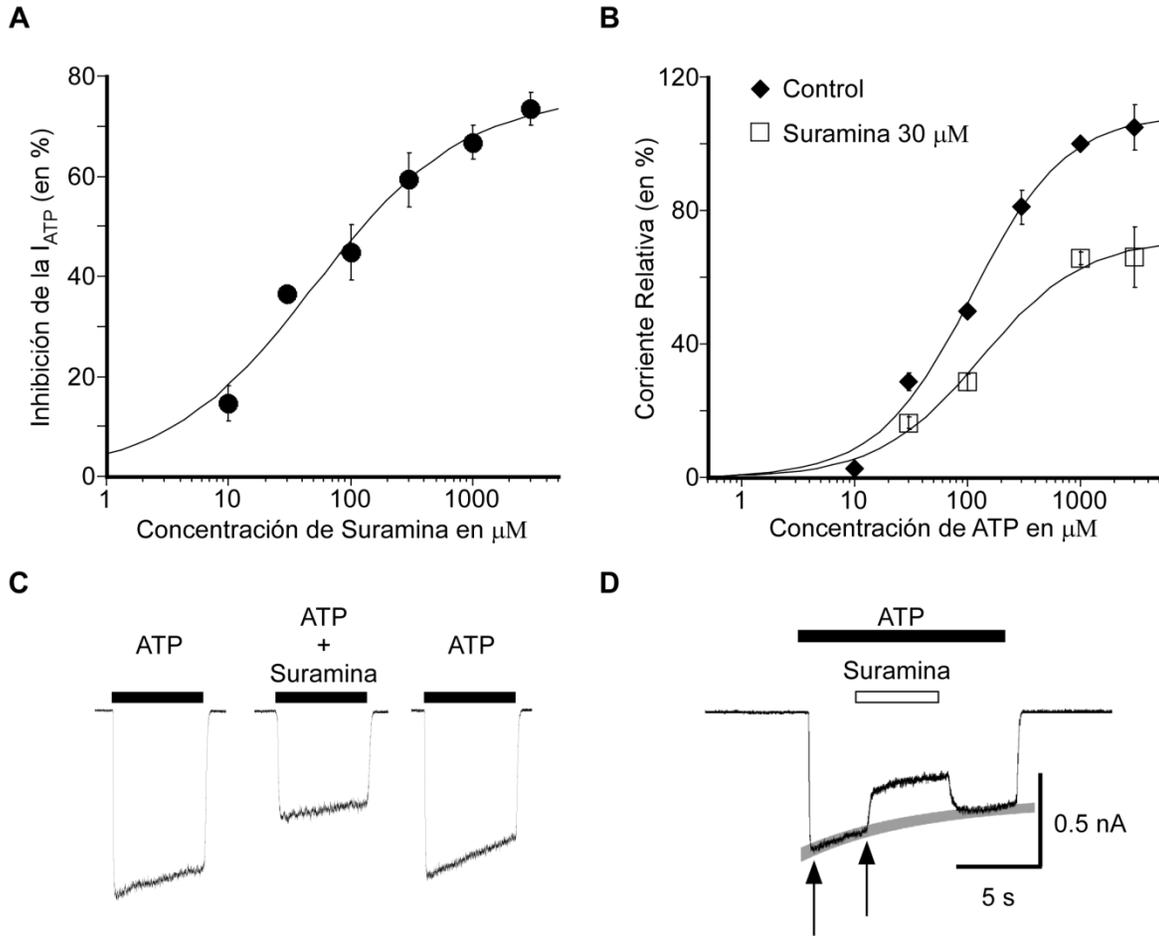


Figura 13. Suramina es un antagonista no competitivo de los receptores P2X mientéricos de ratón. A: curva concentración-respuesta del efecto de suramina sobre las I_{ATP} 1 mM. Las líneas sigmoideas representan el ajuste matemático a la ecuación de Hill produciendo un valor IC_{50} de $50 \pm 18 \mu M$ (Coeficiente de Hill de 0.7 ± 0.2) y un efecto máximo de $76 \pm 0.06\%$. Los símbolos representan el valor promedio y las líneas verticales los S.E.M. de los datos obtenidos en 3 a 17 neuronas. B: curva concentración-respuesta de ATP (1mM) en ausencia y presencia de suramina (30 μM). La respuesta fue normalizada con respecto a la obtenida con ATP 1 mM en cada célula, en ausencia de suramina. Los símbolos representan el valor promedio y las líneas verticales los S.E.M. de los datos obtenidos de 6-10 neuronas. C: registros representativos de las corrientes entrantes durante aplicaciones separadas de ATP 1 mM, antes, en presencia, y 5 min después de lavar suramina 30 μM . Las barras horizontales arriba del registro indican la duración de aplicación del agonista Suramina se aplicó 15 s antes de la aplicación de ATP. D: registro representativo de la aplicación secuencial de ATP (1 mM) y suramina (30 μM) en otra neurona. La línea gruesa gris representa la cinética de desensibilización, calculada por el mejor ajuste de los datos localizados entre ambas flechas. Note que después de remover suramina no se observa potenciación.

e. Efecto de la suramina sobre las I_{ATP} en neuronas mientéricas de cobayo

En neuronas mientéricas de cobayo, nuestro laboratorio observó que la suramina (1 – 30 μM) potenció las I_{ATP} en una forma dependiente de la concentración. Este efecto se produjo cuando se aplicó suramina antes (1 – 20 min) o durante la estimulación con ATP (Barajas-Lopez *et al.*, 1993). Sin embargo, también ha sido reportado que inhibe los receptores P2X (Galligan & Bertrand, 1994) o que tiene ambos efectos en estas neuronas (Hu *et al.*, 2001). En el presente estudio, encontramos que el efecto de la suramina sobre las I_{ATP} es diferente a concentraciones bajas y altas. De este modo, suramina a concentraciones $\leq 30 \mu\text{M}$ potencia las I_{ATP} en un 90% de las neuronas de cobayo (27 de 30 células; Figura 14A). A concentraciones de 100 – 1000 μM , la suramina potencia las I_{ATP} en el 50% de las neuronas (14 de 28 células; Figura 14A). Analizando todos los datos en una curva concentración-respuesta (3-1000 μM), encontramos que tiene forma de campana, demostrando claramente un efecto bifásico (Figura 14B). Cuando separamos las neuronas, de acuerdo al efecto predominante de suramina, la inhibición no fue dependiente de la concentración y por lo tanto, no se ajustó con una curva sigmoidea (Figura 14C). El efecto potenciador es dependiente de la concentración y se fija bien a una curva sigmoidea a concentraciones $\leq 30 \mu\text{M}$ pero no a concentraciones más altas (Figura 14D).

El efecto potenciador de la suramina también fue dependiente de la concentración de ATP, siendo sus valores de EC_{50} de 0.2 ± 0.04 y $34 \pm 12 \mu\text{M}$ para 10 y 100 μM de ATP, respectivamente (Figura 15, asumiendo un efecto

máximo del 70%), estos resultados sugiere que el ATP y la suramina compiten por el mismo sitio de unión. Además, la suramina incremento la eficiencia de ATP sin cambiar su potencia (Figura 16). Puesto que el valor de EC_{50} para ATP no fue diferente in presencia de 30 μM de suramina ($126 \pm 104 \mu\text{M}$) que en su ausencia ($115 \pm 50.5 \mu\text{M}$). Mientras, que el promedio de la amplitud de las corrientes inducidas por 3 mM de ATP aumentaron significativamente ($P < 0.05$) en presencia de suramina con respecto a su valor control, de -1591 ± 406 a -1840 ± 467 pA ($n=6$). Estas observaciones apoyan la hipótesis de que la suramina desplaza al ATP de su sitio de unión, el cual podría ser responsable de una cooperatividad negativa, lo que resultaría en una potenciación de I_{ATP} .

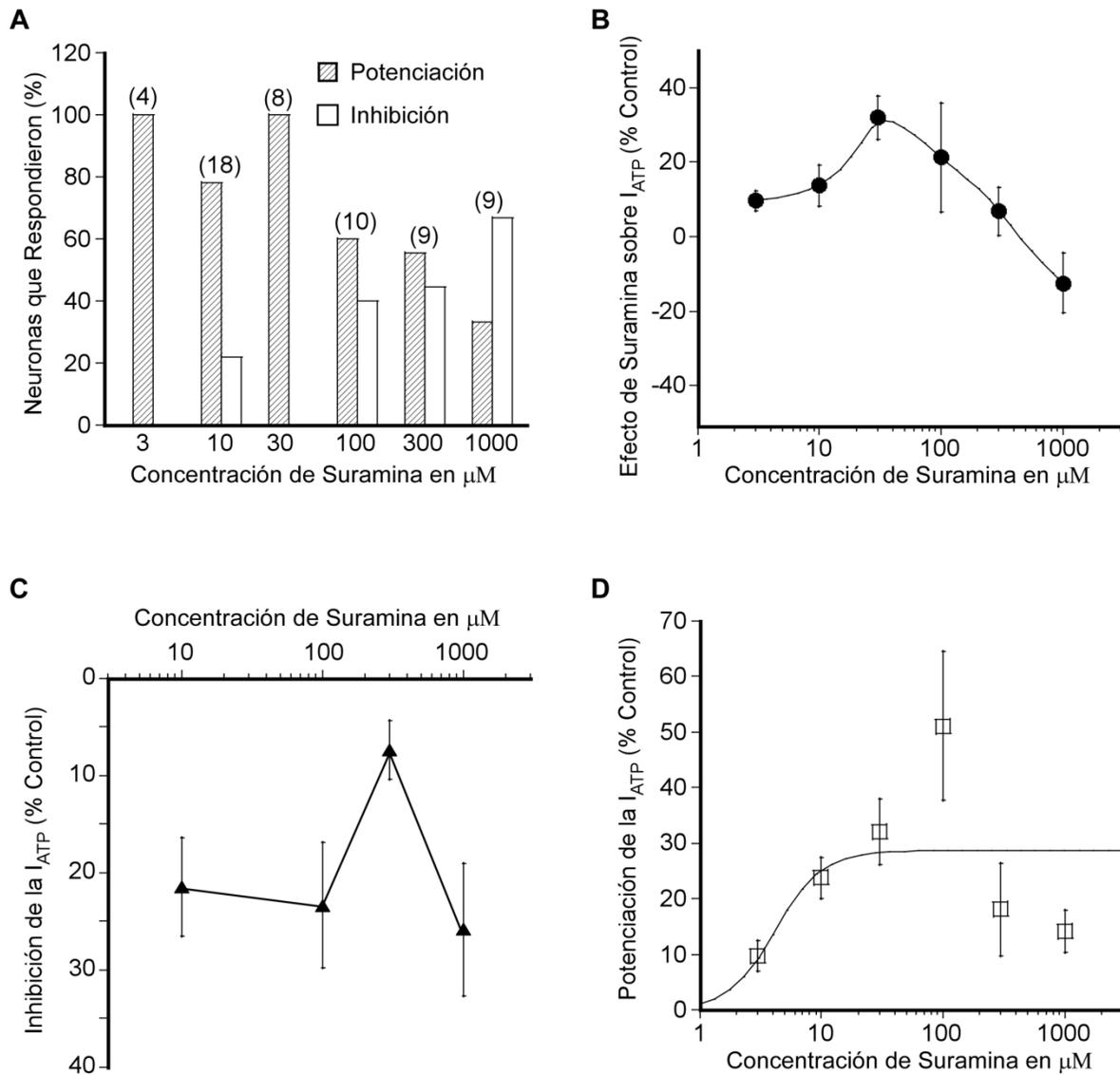


Figura 14. Suramina tiene efectos potenciador e inhibitorio sobre los receptores P2X de neuronas mientéricas de cobayo. A: Distribución de frecuencia del porcentaje de neuronas que mostraron inhibición y potenciación por suramina. A concentraciones $\leq 30 \mu\text{M}$, suramina potencia las I_{ATP} en el 90% de las neuronas de cobayo. A concentraciones de $100 - 1000 \mu\text{M}$, suramina potencia el 50% de las neuronas. B: La curva concentración-respuesta del efecto de suramina sobre las I_{ATP} tiene forma de campana, indicando un efecto bifásico. Los símbolos representan el valor promedio y las líneas verticales los S.E.M. de los datos obtenidos de 4-14 neuronas. C: Curva concentración-respuesta de suramina mostrando únicamente el efecto inhibitorio sobre las I_{ATP} , el cual no fue dependiente de la concentración ($n=14$). D: La curva concentración-respuesta del efecto potenciador de suramina sobre las I_{ATP} se ajusta mejor al modelo logístico a concentraciones $\leq 30 \mu\text{M}$ ($n=27$). La curva fue ajustada a una función logística de dos parámetros, asumiendo un efecto máximo del 70% debido a que a concentraciones más altas no se ajusta a este modelo.

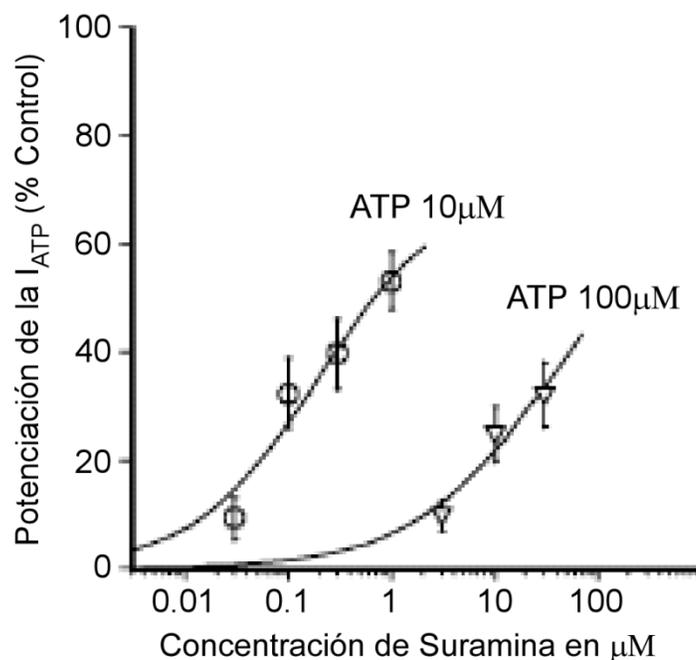


Figura 15. El efecto potenciador de Suramina es dependiente de la concentración de ATP. Curva concentración-respuesta del efecto potenciador de suramina sobre las corrientes inducidas por varias concentraciones de ATP (10 y 100 μM). Los símbolos representan el valor promedio y las líneas verticales los S.E.M. de los datos obtenidos de 3 –10 neuronas. La curva fue ajustada a una función logística de dos parámetro, asumiendo un efecto máximo del 70% debido a que a concentraciones más altas no se ajusta mejor a este modelo, dando valores de EC₅₀ de 0.2 ± 0.04 and 34 ± 12 μM para 10 y 100 μM de ATP, respectivamente.

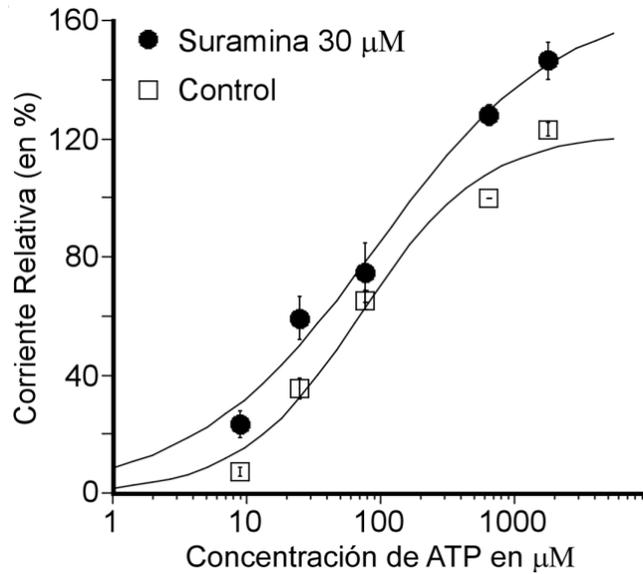


Figura 16. Suramina incrementa la eficiencia del ATP sin cambiar su potencia en las neuronas mientéricas de cobayo. Curva concentración-respuesta para ATP (100 μM) en ausencia y presencia de suramina (30 μM). La respuesta fue normalizada con respecto a la obtenida con ATP 1 mM en cada célula. Los símbolos representan el valor promedio y las líneas verticales los S.E.M. de los datos obtenidos de 6 – 10 neuronas. Las líneas representan el ajuste matemático a una curva sigmoidea obteniendo un EC_{50} de 115 ± 51 y $126 \pm 104 \mu\text{M}$, antes y en presencia de suramina, respectivamente. Mientras que el promedio de la amplitud de las corrientes inducidas por 3 mM de ATP aumentaron significativamente ($P < 0.05$) en presencia de suramina con respecto a su valor control, de -1591 ± 406 a $-1840 \pm 467 \text{ pA}$ ($n=6$).

Por otro lado, en veinte neuronas, se aplicaron tanto una concentración de suramina baja (3-10 μM) como una alta (100 – 1000 μM), y encontramos que el 35% de estas neuronas responden con potenciación ($14 \pm 3.6\%$) e inhibición ($8 \pm 3.6\%$) a bajas y altas concentraciones, respectivamente (Figura 17A). En cinco neuronas en donde una concentración alta de suramina inhibió la I_{ATP} durante aplicaciones separadas de ATP (Figura 17B), llevamos a cabo aplicaciones secuenciales de ATP (ATP-ATP+Suramina-ATP). En todas estas neuronas, la suramina induce ambos efectos; en primer lugar se observó una inhibición seguida de una potenciación justo después de eliminar la suramina. La Figura 17C muestra un registro representativo de este experimento. Estas observaciones muestran que ambos efectos están presentes en la misma neurona y que la potenciación probablemente esté presente en la mayoría, si no es que en todas, las neuronas. La mezcla de los efectos potenciador e inhibidor a concentraciones altas de suramina explicaría por qué en el cobayo, estos efectos no son dependientes de la concentración, a este rango de concentración (ver Figura 14D).

Durante aplicaciones secuenciales de ATP y suramina, la recuperación de la inhibición y potenciación se ajustó mejor a una función exponencial. Los valores de τ para la recuperación de la potenciación incrementaron conforme se aumentaban las concentraciones de suramina (Figura 18C, D y F). Siendo esos valores de 1.0 ± 0.4 , 1.5 ± 0.3 , y 3.9 ± 0.8 s, para 10, 30, y 300 μM de suramina, respectivamente. La inhibición inducida por 300 μM de suramina, se recupera más rápido ($P < 0.01$) que la recuperación de la potenciación y su valor de τ fue de 0.16 ± 0.1 s en cuatro neuronas de cobayo tratadas con 300 μM de suramina (Figura

18B y E). Experimentos secuenciales similares al mostrado en la figura 18D demuestra que no hay evidencia de inhibición por suramina en 5 neuronas analizadas. Si una fuerte potenciación estuviera enmascarando el efecto inhibitorio en estas células, esperaríamos observar una potenciación grande transitoria justo después de quitar la suramina debido a que la potenciación se recupera ~24 veces más lenta que la inhibición, sin embargo, nosotros no observamos eso. Por lo tanto, es probable que el efecto inhibitorio sea mínimo o ausente en algunas neuronas mientéricas, lo cual indica que estos efectos son mediados por sitios de unión a suramina que no siempre están co-expresados en la misma célula.

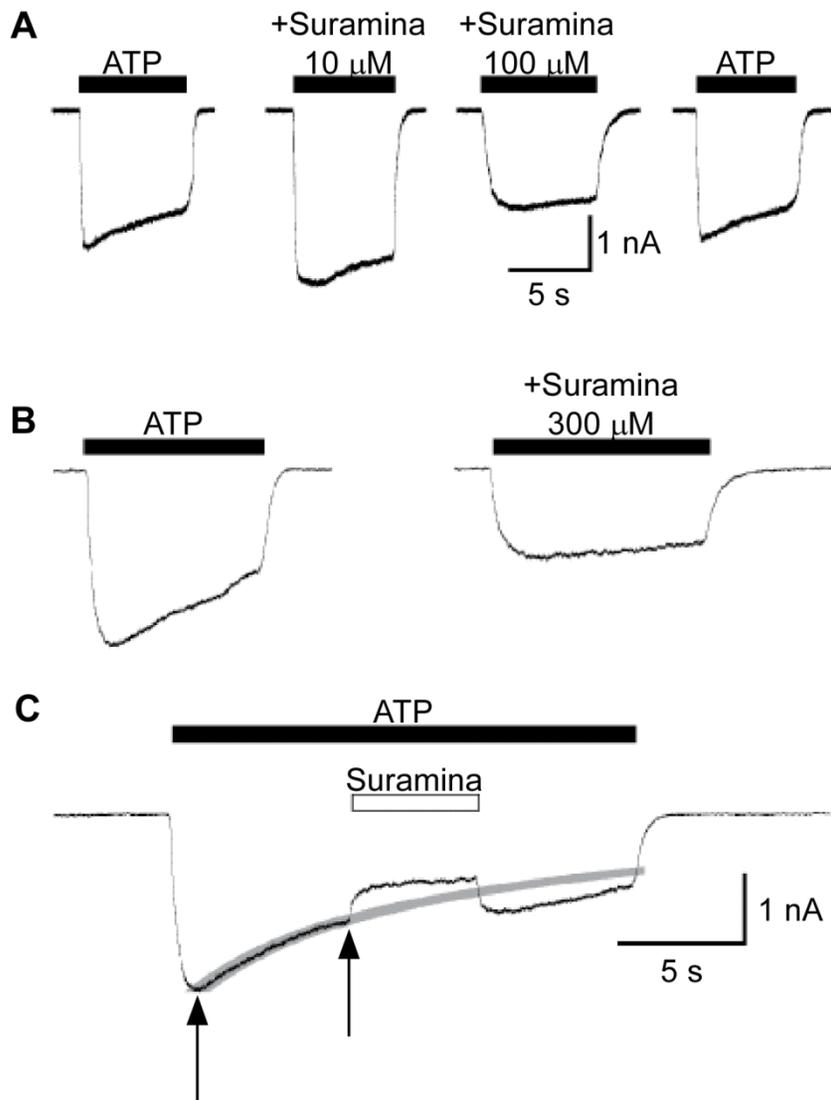


Figura 17. El efecto potenciador e inhibitor de suramina sobre los receptores P2X coexiste en la misma neurona mientérica de cobayo. A: Corrientes entrantes inducidas por 100 μM de ATP en la misma célula: antes (trazo izquierdo), durante la aplicación de dos concentraciones de suramina y 5 min después de retirar suramina (trazo derecho). B y C: son registros representativos de las I_{ATP} de otra neurona mientérica. Suramina tiene un efecto inhibitorio sobre las I_{ATP} durante aplicaciones separadas (B) y secuenciales (C) de 100 μM de ATP y 300 μM de suramina. Sin embargo, durante aplicaciones secuenciales de ATP y suramina, una potenciación transitoria se puede notar justo después de quitar suramina. Esto es demostrado por el trazo sobrepuesto en el registro original de la corriente esperada (como lo indica la línea gris). Esta corriente esperada se calculó mediante la búsqueda del mejor ajuste (una sola exponencial más una constante) para la cinética de desensibilización antes de agregar suramina, como lo indican las flechas. Las barras negras horizontales arriba de los trazos indican la duración de aplicación del agonista y la barra blanca indica la aplicación de suramina. En A y B, suramina se aplicó 15 s antes de la aplicación de ATP.

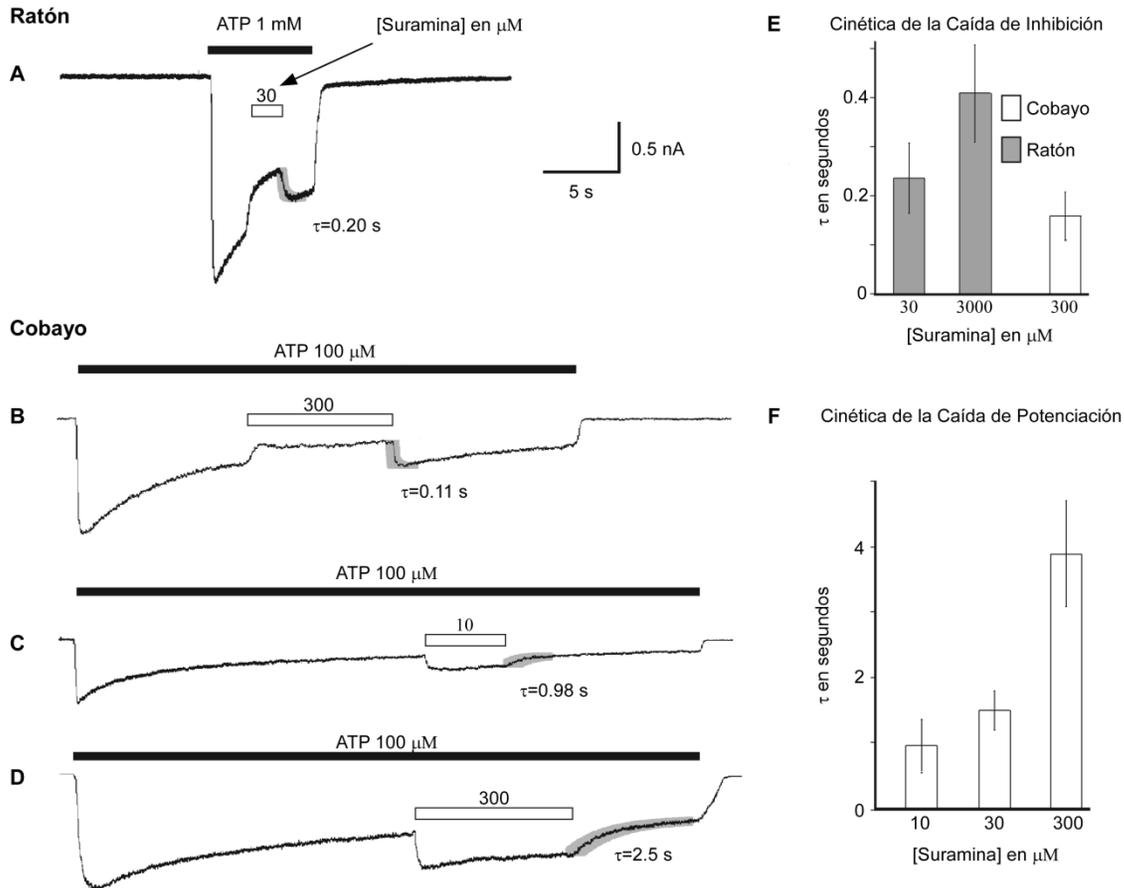


Figura 18. La inhibición y potenciación son mediadas por diferentes sitios de unión a suramina en los receptores P2X mientéricos de cobayo, como lo indican sus diferentes cinéticas. A: registro representativo de la corriente durante la aplicación secuencial de ATP 1 mM y suramina en una neurona mientérica de ratón. B – D: corrientes representativas en respuesta a aplicación secuencial de ATP 100 μM en tres neuronas mientéricas de cobayo. Suramina inhibe las I_{ATP} en A y B pero potencia en C y D. El mejor ajuste para la recuperación de la inhibición y potenciación fue obtenido por una sola función exponencial (como lo indica la línea negra sobrepuesta en el registro original), los valores de τ para esta función son indicados. Todos los registros están presentados a la misma escala de tiempo. Suramina (como lo indica la barra blanca) se agregó durante la aplicación de ATP, a las concentraciones indicadas. La recuperación de la inhibición en ratón no es significativamente diferente a la de neuronas de cobayo (E). Sin embargo, la recuperación de la potenciación tiene un valor de τ significativamente mayor ($P = 0.01$) y aumenta significativamente después de aumentar las concentraciones de suramina (F). Las barras y líneas son el promedio de los valores de τ y S.E.M ($n=3-5$) para la función exponencial de la recuperación de la inhibición (E) y de la potenciación (F). El valor P fue obtenido con la prueba de Dunnet.

IX. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio comparativo realizado en neuronas mientéricas de ratón y de cobayo que demuestra propiedades farmacológicas distintas entre sus receptores P2X nativos. Además, nuestros datos aclaran la controversia existente respecto a los efectos de la suramina sobre los receptores P2X en neuronas mientéricas de cobayo, revelando que la suramina principalmente potencia las I_{ATP} a concentraciones micromolares bajas pero un efecto inhibitorio aparece a concentraciones altas. Nuestras observaciones indican que el efecto inhibitorio y potenciador son mediados por dos diferentes sitios de unión a suramina. En ambas especies, está presente el sitio de unión que produce inhibición y al parecer este sitio es similar. Sin embargo, solamente el sitio de unión que produce potenciación está presente en los receptores P2X mientéricos de cobayo.

Varios de nuestros resultados demuestran que la suramina actúa sobre dos diferentes sitios de unión para modular las I_{ATP} en las neuronas mientéricas de cobayo: primero, la suramina tiene dos efectos opuestos sobre las I_{ATP} ; segundo, el efecto inhibitorio y potenciador fueron observados a diferentes concentraciones de suramina; tercero, la recuperación de la corriente del efecto inhibitorio y potenciador tiene cinéticas completamente diferentes; y finalmente, en algunas neuronas solo se observa el efecto potenciador.

Nuestros resultados demuestran que la suramina inhibe y potencia las I_{ATP} , y el efecto predominante observado en cada neurona depende de la concentración de suramina y ATP. Esto origina que el efecto de suramina en los receptores P2X mientéricos de cobayo sea complejo, y esto probablemente esté relacionado con

la controversia que existe con respecto a la acción de suramina en estas neuronas (ver introducción). Además, es complicado el mecanismo de acción de la suramina sobre las I_{ATP} mediadas por los receptores P2X mientéricos de cobayo por el hecho de que ambos efectos (potenciación e inhibición) coexisten en algunas neuronas, mientras que la potenciación parece ser el único efecto en un subgrupo de neuronas. Es probable que ambos efectos sean dependientes de la concentración pero debido a que estos coexisten en más del 50% de las neuronas, no es clara su dependencia. En apoyo a esta interpretación, la potenciación fue claramente dependiente de la concentración con cantidades ≤ 30 μM de suramina y fuimos capaces de desenmascarar la potenciación cuando en las neuronas mientéricas dominaba el efecto inhibitorio, mediante aplicaciones secuenciales. En conjunto, nuestros datos indican que la farmacología compleja de los receptores P2X mientéricos es probablemente la explicación para la controversia sobre los efectos de suramina en neuronas mientéricas de cobayo.

Es muy factible que el sitio de unión a suramina que media la inhibición de las I_{ATP} sea similar en ambas especies y esto es reforzado por el hecho de que las cinéticas de la fase de recuperación de la inhibición no fueron diferentes en ratón y cobayo. Además, en ambas especies, la inhibición se observó a concentraciones relativamente altas. Los receptores P2X de neuronas mientéricas de rata son también inhibidos por suramina con una potencia similar (Ohta *et al.*, 2005) a la del ratón, lo que indica que el sitio inhibitorio activado por esta sustancia podría ser común en ratón, rata y cobayo.

Es posible que la población de receptores P2X expresados en las neuronas mientéricas de ratón sea diferente a los de cobayo, debido a que los receptores de ratón son más sensibles a PPADS y carecen del sitio de unión a suramina que causa potenciación de las I_{ATP} , lo cual podría deberse a la diferente composición de subunidades o a diferencias en la estequiometría entre ambas especies. Esto se va a investigar en futuros experimentos usando técnicas de biología molecular. Además, es poco probable que los receptores P2X sean una población homogénea en ambas especies. Puesto que en ratón, la suramina parece inhibir solamente alrededor del 76% de la I_{ATP} . Igualmente para cobayo, no todos los receptores contienen los sitios de unión de potenciación e inhibición porque los efectos de la suramina son bastante aleatorios entre diferentes células y el efecto inhibitorio parece estar ausente en algunas neuronas. No obstante, nuestros datos no excluyen que algunas subpoblaciones de receptores P2X nativos de neuronas mientéricas de cobayo expresen ambos sitios de unión a suramina. Apoyando esta idea de que los receptores P2X mientéricos son una población heterogénea, se ha descrito la existencia de por lo menos tres diferentes subtipos de receptores P2X mientéricos de cobayo (Zhou & Galligan, 1996), de las cuales dos desensibilizan lentamente, como la que describimos aquí, pero solamente un subtipo es activado por α,β -meATP. Es probable que la pequeña respuesta a α,β -meATP observada aquí podría ser mediada por este subtipo de receptor y por lo tanto, parece que representan sólo una pequeña subpoblación del total de receptores mientéricos. El tercer subtipo de receptor, es activado por ATP y α,β -meATP pero desensibiliza rápidamente, se encuentra en un porcentaje pequeño de neuronas mientéricas

(Barajas-Lopez *et al.*, 1996a; Zhou & Galligan, 1996). Las corrientes de membrana que podrían estar mediadas por este subtipo de receptor no fueron detectadas en este estudio.

La cinética y propiedades farmacológicas descritas en este estudio para los receptores P2X en neuronas mientéricas de ratón y cobayo comparten algunas propiedades con las del receptor recombinante P2X₂ de rata (Brake *et al.*, 1994; Galligan & Bertrand, 1994; Barajas-Lopez *et al.*, 1996a). Por ejemplo, las cinética de desensibilización es similar, muestran la misma sensibilidad al ATP y ATP- γ -S, son insensibles a α,β -meATP, y al menos una subpoblación de canales parece tener un sitio unión para suramina que media la inhibición y son inhibidos por PPADS. El efecto potenciador de suramina, como el que se muestra aquí para los receptores P2X mientéricos de cobayo, también se ha observado para los receptores recombinantes P2X₄ de cerebro de ratón y este efecto fue más fuerte cuando estos canales se co-expresaron con una variante recombinante corta (P2X_{4a}) presentes en este tejido (Townsend-Nicholson *et al.*, 1999). Por ello, es posible que las subunidades P2X₄ puedan ser responsables del efecto potenciador de suramina en los receptores P2X de neuronas mientéricas de cobayo. Sin embargo, no se ha encontrado inmunoreactividad para esta subunidad en estas neuronas (Hu *et al.*, 2001), lo que sugiere que otra subunidad o un subtipo de la P2X₄ muy diferente puede ser responsable del efecto potenciador reportado aquí. Es evidente que para entender las bases de las propiedades únicas de los receptores P2X mientéricos de cobayo, se requiere clonar, expresar y co-expresar las diferentes subunidades en un sistema de expresión heterólogo para

caracterizar sus propiedades y correlacionar éstas con aquellas presentes en los receptores nativos.

X. CONCLUSIÓN

En conclusión los receptores P2X nativos de neuronas mientéricas de ratón y cobayo presentan distintas propiedades farmacológicas. En neuronas mientéricas de cobayo, la suramina tiene un efecto potenciador e inhibidor sobre las I_{ATP} mediadas por sitios distintos de unión a suramina presentes en los receptores P2X. El sitio de unión a suramina que activa la potenciación no está presente en los receptores de neuronas mientéricas de ratón pero éstos si presentan el sitio que produce la inhibición. En conjunto todos nuestros datos indican que los receptores P2X de neuronas mientéricas de cobayo tienen propiedades farmacológicas más complejas que los del ratón, lo cual está probablemente relacionado a la controversia existente sobre los efectos de la suramina en neuronas de cobayo.

XI. REFERENCIAS.

1. Abbracchio MP & Burnstock G. (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* **64**, 445-475.
2. Barajas-Lopez C, Barrientos M & Espinosa-Luna R. (1993). Suramin increases the efficacy of ATP to activate an inward current in myenteric neurons from guinea-pig ileum. *Eur J Pharmacol* **250**, 141-145.
3. Barajas-Lopez C, Espinosa-Luna R & Christofi FL. (2000). Changes in intracellular Ca²⁺ by activation of P2 receptors in submucosal neurons in short-term cultures. *Eur J Pharmacol* **409**, 243-257.
4. Barajas-Lopez C, Huizinga JD, Collins SM, Gerzanich V, Espinosa-Luna R & Peres AL. (1996a). P2x-purinoceptors of myenteric neurones from the guinea-pig ileum and their unusual pharmacological properties. *Br J Pharmacol* **119**, 1541-1548.
5. Barajas-Lopez C, Peres AL & Espinosa-Luna R. (1996b). Cellular mechanisms underlying adenosine actions on cholinergic transmission in enteric neurons. *Am J Physiol* **271**, C264-275.
6. Bertrand PP. (2003). ATP and sensory transduction in the enteric nervous system. *Neuroscientist* **9**, 243-260.
7. Bian X, Ren J, DeVries M, Schnegelsberg B, Cockayne DA, Ford AP & Galligan JJ. (2003). Peristalsis is impaired in the small intestine of mice lacking the P2X3 subunit. *J Physiol* **551**, 309-322.
8. Bo X, Zhang Y, Nassar M, Burnstock G & Schoepfer R. (1995). A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. *FEBS Lett* **375**, 129-133.
9. Boue-Grabot E, Archambault V & Seguela P. (2000). A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels. *J Biol Chem* **275**, 10190-10195.
10. Brake AJ, Wagenbach MJ & Julius D. (1994). New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* **371**, 519-523.
11. Brandle U, Spielmanns P, Osteroth R, Sim J, Surprenant A, Buell G, Ruppersberg JP, Plinkert PK, Zenner HP & Glowatzki E. (1997).

- Desensitization of the P2X(2) receptor controlled by alternative splicing. *FEBS Lett* **404**, 294-298.
12. Burnstock G. (2006). Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 166-176.
 13. Burnstock G & Knight GE. (2004). Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* **240**, 31-304.
 14. Castelucci P, Robbins HL, Poole DP & Furness JB. (2002). The distribution of purine P2X(2) receptors in the guinea-pig enteric nervous system. *Histochem Cell Biol* **117**, 415-422.
 15. Connolly CN & Wafford KA. (2004). The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochem Soc Trans* **32**, 529-534.
 16. Costa M, Brookes SJ & Hennig GW. (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* **47 Suppl 4**, iv15-19; discussion iv26.
 17. Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G & Wood JN. (1995). A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* **377**, 428-431.
 18. Chessell IP, Hatcher JP, Bountra C, Michel AD, Hughes JP, Green P, Egerton J, Murfin M, Richardson J, Peck WL, Grahames CB, Casula MA, Yiangou Y, Birch R, Anand P & Buell GN. (2005). Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* **114**, 386-396.
 19. Christofi FL, Guan Z, Wood JD, Baidan LV & Stokes BT. (1997). Purinergic Ca²⁺ signaling in myenteric neurons via P2 purinoceptors. *Am J Physiol* **272**, G463-473.
 20. Dang K, Bielfeldt K, Lamb K & Gebhart GF. (2005). Gastric ulcers evoke hyperexcitability and enhance P2X receptor function in rat gastric sensory neurons. *J Neurophysiol* **93**, 3112-3119.
 21. Donnelly-Roberts DL & Jarvis MF. (2007). Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br J Pharmacol* **151**, 571-579.
 22. Ennion S, Hagan S & Evans RJ. (2000). The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X1 receptors. *J Biol Chem* **275**, 35656.

23. Ennion SJ & Evans RJ. (2002). P2X(1) receptor subunit contribution to gating revealed by a dominant negative PKC mutant. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 611-616.
24. Evans RJ, Lewis C, Buell G, Valera S, North RA & Surprenant A. (1995). Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Mol Pharmacol* **48**, 178-183.
25. Fonfria E, Clay WC, Levy DS, Goodwin JA, Roman S, Smith GD, Condreay JP & Michel AD. (2008). Cloning and pharmacological characterization of the guinea pig P2X7 receptor orthologue. *Br J Pharmacol* **153**, 544-556.
26. Furness JB. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* **81**, 87-96.
27. Furness JB & Costa M. (1980). Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience* **5**, 1-20.
28. Galligan JJ. (2002). Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **14**, 611-623.
29. Galligan JJ. (2004). Enteric P2X receptors as potential targets for drug treatment of the irritable bowel syndrome. *Br J Pharmacol* **141**, 1294-1302.
30. Galligan JJ & Bertrand PP. (1994). ATP mediates fast synaptic potentials in enteric neurons. *J Neurosci* **14**, 7563-7571.
31. Gao N, Hu HZ, Zhu MX, Fang X, Liu S, Gao C & Wood JD. (2006). The P2Y purinergic receptor expressed by enteric neurones in guinea-pig intestine. *Neurogastroenterol Motil* **18**, 316-323.
32. Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G & Ford AP. (2006). Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch* **452**, 513-537.
33. Gillis KD, Pun RY & Mislser S. (1991). Single cell assay of exocytosis from adrenal chromaffin cells using "perforated patch recording". *Pflugers Arch* **418**, 611-613.
34. Glushakow AV, Glushakova HY & Skok VI. (1998). Two types of P2X-purinoceptors in neurons of the guinea pig ileum submucous plexus. *Neurophysiology* **30**, 301-304.

35. Guo C, Masin M, Qureshi OS & Murrell-Lagnado RD. (2007). Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* **72**, 1447-1456.
36. Hansen MB. (2003). Neurohumoral control of gastrointestinal motility. *Physiol Res* **52**, 1-30.
37. Honore P, Donnelly-Roberts D, Namovic MT, Hsieh G, Zhu CZ, Mikusa JP, Hernandez G, Zhong C, Gauvin DM, Chandran P, Harris R, Medrano AP, Carroll W, Marsh K, Sullivan JP, Faltynek CR & Jarvis MF. (2006). A-740003 [N-(1-[[cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl]amino]-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **319**, 1376-1385.
38. Hu HZ, Gao N, Lin Z, Gao C, Liu S, Ren J, Xia Y & Wood JD. (2001). P2X(7) receptors in the enteric nervous system of guinea-pig small intestine. *J Comp Neurol* **440**, 299-310.
39. Jones CA, Chessell IP, Simon J, Barnard EA, Miller KJ, Michel AD & Humphrey PP. (2000). Functional characterization of the P2X(4) receptor orthologues. *Br J Pharmacol* **129**, 388-394.
40. Kandel ERS, S. A. (2000). *Signalling at the Nerve-Muscle Synapse: Directly Gated Transmission. In Principles of Neuroscience.*
41. Kenakin R. (1993). *Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction.* Raven Press, Ltd., New York, N.Y.
42. Khakh BS, Proctor WR, Dunwiddie TV, Labarca C & Lester HA. (1999). Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels. *J Neurosci* **19**, 7289-7299.
43. Lewis C, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G & Surprenant A. (1995). Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* **377**, 432-435.
44. Li M, Chang TH, Silberberg SD & Swartz KJ. (2008). Gating the pore of P2X receptor channels. *Nat Neurosci* **11**, 883-887.
45. North RA. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* **82**, 1013-1067.
46. North RA & Surprenant A. (2000). Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 563-580.

47. Ohta T, Kubota A, Murakami M, Otsuguro K & Ito S. (2005). P2X2 receptors are essential for $[Ca^{2+}]_i$ increases in response to ATP in cultured rat myenteric neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**, G935-948.
48. Poole DP, Castelucci P, Robbins HL, Chiocchetti R & Furness JB. (2002). The distribution of P2X3 purine receptor subunits in the guinea pig enteric nervous system. *Auton Neurosci* **101**, 39-47.
49. Ralevic V & Burnstock G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* **50**, 413-492.
50. Ren J & Bertrand PP. (2008). Purinergic receptors and synaptic transmission in enteric neurons. *Purinergic Signal* **4**, 255-266.
51. Ren J, Bian X, DeVries M, Schnegelsberg B, Cockayne DA, Ford AP & Galligan JJ. (2003). P2X2 subunits contribute to fast synaptic excitation in myenteric neurons of the mouse small intestine. *J Physiol* **552**, 809-821.
52. Roberts JA, Vial C, Digby HR, Agboh KC, Wen H, Atterbury-Thomas A & Evans RJ. (2006). Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch* **452**, 486-500.
53. Ruan HZ & Burnstock G. (2005). The distribution of P2X5 purinergic receptors in the enteric nervous system of mouse. *Cell Tissue Res* **319**, 191-200.
54. Ruhl A, Nasser Y & Sharkey KA. (2004). Enteric glia. *Neurogastroenterol Motil* **16 Suppl 1**, 44-49.
55. Smith FM, Humphrey PP & Murrell-Lagnado RD. (1999). Identification of amino acids within the P2X2 receptor C-terminus that regulate desensitization. *J Physiol* **520 Pt 1**, 91-99.
56. Surprenant A, Buell G & North RA. (1995). P2X receptors bring new structure to ligand-gated ion channels. *Trends Neurosci* **18**, 224-229.
57. Torres GE, Egan TM & Voigt MM. (1999). Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem* **274**, 6653-6659.
58. Townsend-Nicholson A, King BF, Wildman SS & Burnstock G. (1999). Molecular cloning, functional characterization and possible cooperativity between the murine P2X4 and P2X4a receptors. *Brain Res Mol Brain Res* **64**, 246-254.

59. Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A & Buell G. (1994). A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* **371**, 516-519.
60. Van Nassauw L, Brouns I, Adriaensen D, Burnstock G & Timmermans JP. (2002). Neurochemical identification of enteric neurons expressing P2X(3) receptors in the guinea-pig ileum. *Histochem Cell Biol* **118**, 193-203.
61. Werner P, Seward EP, Buell GN & North RA. (1996). Domains of P2X receptors involved in desensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15485-15490.
62. Wood JD. (2007). Neuropathophysiology of functional gastrointestinal disorders. *World J Gastroenterol* **13**, 1313-1332.
63. Wynn G, Ma B, Ruan HZ & Burnstock G. (2004). Purinergic component of mechanosensory transduction is increased in a rat model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**, G647-657.
64. Xiang Z & Burnstock G. (2006). Distribution of P2Y6 and P2Y12 receptor: their colocalization with calbindin, calretinin and nitric oxide synthase in the guinea pig enteric nervous system. *Histochem Cell Biol* **125**, 327-336.
65. Yiangou Y, Facer P, Baecker PA, Ford AP, Knowles CH, Chan CL, Williams NS & Anand P. (2001). ATP-gated ion channel P2X(3) is increased in human inflammatory bowel disease. *Neurogastroenterol Motil* **13**, 365-369.
66. Zhou X & Galligan JJ. (1996). P2X purinoceptors in cultured myenteric neurons of guinea-pig small intestine. *J Physiol* **496 (Pt 3)**, 719-729.

APÉNDICE

**Aislamiento y clonación de los genes que codifican
para los receptores ionotrópicos P2X₇ y 5-HT_{3A} de
intestino de ratón**

Resumen

En el Sistema Nervioso Entérico (SNE) se expresan una gran variedad de canales iónicos activados por ligando (LGICs) como son los activados por serotonina (5-HT₃), y los activados por ATP (P2X). Estos receptores están dispersos en todo el plexo mientérico y submucoso, con diferentes neuronas expresando diferentes subunidades y diferentes perfiles. Con la finalidad de aislar y clonar DNAs complementarios (cDNAs) correspondientes a los receptores 5-HT_{3A} y al P2X₇ del intestino delgado de ratón, se diseñaron oligonucleótidos en base a secuencias de dichos receptores de otros tejidos de ratón reportados en el GenBank. De esta manera, logramos aislar secuencias de cDNAs que codifican para los receptores ionotrópicos P2X₇ y 5-HT_{3A} de intestino de ratón C57/BL6 (*Mus musculus*). Amplificamos una única banda de 1490 pb que corresponde al gen 5-HT_{3AS} de ratón. La secuenciación reveló un único marco de lectura abierto correspondiente a una proteína de 483 amino ácidos, con una identidad del 100% a la subunidad 5HT_{3A} variante corta (5-HT_{3AS}) con número de acceso NP_001093114.1. Además, el análisis de secuencia del cDNAs P2X₇ aislado de intestino de ratón reveló dos diferentes marcos de lectura abierto. El primero correspondió a una proteína de 595 amino ácidos, con una identidad del 100% a la subunidad P2X₇ isoforma **a** con número de acceso NP_035157.2. La segunda secuencia originó a una proteína de 545 amino ácidos, con una identidad del 91% a la isoforma **a**. Con el propósito de caracterizar molecularmente estos receptores aislados de intestino de ratón, dichos cDNAs se clonaron en el vector de expresión pCDNA3. El

aislamiento y clonación de los receptores 5-HT_{3AS} y las dos variantes del receptor P2X₇ aislados del plexo mientérico de ratón permitirá su caracterización molecular, biofísica y farmacológica en un sistema de expresión heterólogo y de ese modo ayudarnos a entender las propiedades farmacológicas de los receptores 5-HT₃ y P2X₇ nativos en neuronas mientéricas de ratón.

Introducción

La habilidad de las neuronas de responder a cambios en el medio ambiente es llevada a cabo a través de la expresión en la superficie celular de un repertorio de receptores específicos. Estos receptores por lo tanto traducen las señales del medio ambiente y generan respuestas químicas o eléctricas apropiadas a través de rutas de señalización membranal e intracelular (Kandel, 2000). La transmisión sináptica química depende de la conversión de una señal química a una eléctrica que se manifiesta por cambios en el potencial de membrana a nivel postsináptico. Este tipo de procesos es frecuentemente mediado por un tipo de proteínas receptoras presentes en la membrana neuronal las cuales contienen un canal iónico por lo que se les conoce como *receptores ionotrópicos* o canales activados por ligando (LGIC; por sus siglas en inglés) (Kandel, 2000).

Los receptores ionotrópicos son proteínas integrales de la membrana compuestas por varias subunidades (unidas por uniones no-covalentes) para formar una sola macromolécula, que contiene un dominio extracelular que forma el receptor del neurotransmisor y otro que abarca toda la membrana y forma un canal iónico (Galligan, 2002). En ausencia del ligando, estos receptores tienen una muy baja probabilidad de apertura; una vez activado por la unión del ligando a su sitio, estos receptores incrementan su probabilidad de apertura para permitir la transferencia de iones entre el medio extracelular e intracelular (Galligan, 2002).

Los receptores ionotrópicos se dividen en cuatro superfamilias: la *Cys-loop*, los receptores a glutamato (NMDA, AMPA y Kainato), los canales TRP (Transient Receptor Potential) y los receptores P2X (Connolly & Wafford, 2004).

Receptores *Cys-loop*

Los miembros de la familia *Cys-loop* son diversos y su activación es responsable de potenciales sinápticos excitatorios e inhibitorios dependiendo de si su permeabilidad es a cationes (nAChR, 5-HT₃) o permeables a aniones (GABA_A, receptores glicinérgicos) (Connolly & Wafford, 2004).

Los receptores *Cys-loop* poseen una estructura similar, están formados por cinco subunidades. Cada subunidad está constituida por un dominio amino terminal extracelular, cuatro dominios transmembranales (M1-M4) y un dominio carboxilo terminal extracelular. Entre los dominios M3 y M4 tienen un dominio largo intracelular, el cual ha sido implicado en la interacción entre el receptor y la matriz intracelular. Característicamente, la subunidad α que conforma a estos receptores contiene dos residuos de cisteína en el dominio amino terminal formándose un puente disulfuro (Lester *et al.*, 2004). En este trabajo solo se discutirá a cerca de los receptores 5-HT₃ miembro de esta familia.

Receptores 5HT₃

Estos receptores median la transmisión sináptica rápida en el SNC y SNP. Están compuestos de 5 subunidades (5-HT_{3A-E}), aunque sólo se conocen las secuencias de aminoácidos de tres subunidades (5-HT_{3A-C}). Ha sido demostrado que la subunidad 5-HT_{3A} forma canales homoméricos funcionales, mientras que la subunidad 5-HT_{3B}, necesita ser coexpresado con la subunidad 5-HT_{3A} para formar canales funcionales (Davies *et al.*, 1999). El gen que codifica la subunidad 5-HT_{3A} de ratón produce las variantes alternativas de ARNm 5-HT_{3AS} (isoforma corta) y 5-

HT_{3AL} (isoforma larga) presentes en la línea celular de neuroblastoma de ratón (NCB-20) y en tejidos neuronales como son corteza, hipocampo, ganglio cervical superior (Reeves & Lummis, 2002). Los ARNm de las subunidades 5-HT_{3AS} y 5-HT_{3AL} difieren por seis codones en la región que codifica por el dominio intracelular largo.

Los receptores 5HT₃ son modulados por una gran variedad de sustancias incluyendo cationes divalentes, alcoholes, esteroides, anestésicos, etc. Sin embargo, el conocimiento de su mecanismo de acción es limitado. Por ejemplo iones calcio actúan inhibiendo al receptor probablemente actuando en el sitio de unión al ligando. El receptor 5HT₃ también es blanco principal de algunos anestésicos locales como el halotano o el isoflurano potenciando respuestas mediadas por este receptor (Reeves & Lummis, 2002).

Receptores P2X

Inicialmente se pensaba que el canal P2X tenía la misma estructura de la superfamilia de los receptores *Cys-loop*, sin embargo después de un análisis estructural fue reportado que hay diferencias sustanciales entre estas dos familias de receptores. Las subunidades de la familia de receptores P2X tienen solo dos dominios transmembranales (TM1 y TM2) con un largo dominio extracelular en forma de asa entre ellos, haciendo que ambos dominios, el amino y carboxilo terminal, sean intracelulares. El modelo más aceptado de la conformación de estos canales es el que considera que los canales funcionales están compuestos por tres subunidades que están organizados como homotrímeros, y en algunos

casos como heterotrímeros conteniendo dos subunidades diferentes (Khakh, 2001; North, 2002).

A la fecha, han sido clonadas siete subunidades del receptor P2X (P2X₁₋₇). De estas, todas excepto P2X₆ son capaces de formar canales homoméricos (North & Surprenant, 2000). También han sido descubiertos cinco canales heteroméricos incluyendo los receptores P2X_{2/3} P2X_{4/6} P2X_{1/5}, P2X_{2/6} (North, 2002; Roberts *et al.*, 2006) y P2X_{4/7} (Guo *et al.*, 2007). Para fines de este trabajo solo se discutirá respecto al receptor P2X₇.

Receptor P2X₇

Es un canal catiónico activado por ATP extracelular, es el único entre la familia P2X que bajo continua estimulación resulta en la formación de un gran poro lo cual facilita la entrada de cationes con peso molecular mayor a 900Da. El receptor P2X₇ se expresa principalmente en células de linaje hematopoyético incluyendo monocitos, macrófagos, microglia, células dendríticas, células T y células B. La activación del receptor P2X₇ por ATP modula múltiples funciones inmunes, incluyendo producción de mediadores inflamatorios, como son la liberación de IL-1 β e IL-18, eventos de fusión de membrana y apoptosis (Becker *et al.*, 2008). En estudios recientes con ratones deficiente de P2X₇ se ha encontrado que se suprime la habilidad del ATP extracelular para inducir la liberación de IL-1 β de macrófagos aislados (Solle *et al.*, 2001). Además análisis de estos ratones revelan que P2X₇ tiene un rol importante en enfermedades auto-inmunes como son la artritis reumatoides, puesto que los ratones deficientes de P2X₇ son protegidos

contra el desarrollo de síntomas y destrucción de cartílago en ratones con artritis inducida con anticuerpos anti-colagena (Labasi *et al.*, 2002). En estudios previos se ha revelado que el carboxi-terminal de este receptor posee un dominio de unión a lípidos el cual regula la función de éste, como son la actividad del canal y su tráfico (Denlinger *et al.*, 2003).

Materiales y métodos

Preparación del cultivo celular de plexo mientérico de ratón

Ratones adultos C57 (19 – 25 g) de ambos sexos, fueron sacrificados por decapitación y se extrajo un segmento de 5 cm de yeyuno proximal. Se mantuvo abierto longitudinalmente en solución de Krebs modificada (en mM: NaCl, 126; NaH₂PO₄, 1.2; MgCl₂, 1.2; CaCl₂, 2.5; KCl, 5; NaHCO₃, 25; glucosa, 11; gasificada con 95% O₂ and 5% CO₂), la capa mucosa y submucosa de este segmento de intestino fue disecada dejando las capas del musculo circular y longitudinal con el plexo mientérico.

La preparación del plexo mientérico fue disociada usando un tratamiento secuencial con dos soluciones enzimáticas, como ya lo describió (Barajas-Lopez *et al.*, 1996). Se describe brevemente, la primera solución contenía papaína (0.01 mL/mL; activada con 0.4mg/mL de L-cisteína) y la segunda contenía colagenasa (1 mg/mL) y dispasa (4 mg/mL). Las enzimas fueron lavadas con medio L-15 y después las células se sembraron en medio D-MEM sobre cubreobjetos redondos cubiertos con colagena estéril de cola de rata. El medio de cultivo D-MEM contenía 97.5% de medio mínimo esencial, 2.5% de suero bovino fetal, L-glutamina 2 mM, penicilina 10 U/mL, estreptomycin 10 µg/mL y glucosa 15 mM. El cultivo celular se mantuvo durante cuatro días y se le cambio el medio cada 48 horas. Después de ese tiempo de incubación se aspiró el medio de cultivo y se le agrego 800 µL de solución Cellstripper (Mediatech, Inc.) para separar las células de la superficie de crecimiento, una vez separadas se pasaron a un tubo Falcon

de 15 ml y se centrifugo a 600 rpm durante 5 min, se descarto el sobrenadante y se agrego el buffer de Lisis para extracción de ARN.

Aislamiento de los cDNAs que codifica para receptores 5-HT_{3A} y P2X₇ de cultivo primario de plexo mientérico de ratón

El ARN total de las células del cultivo primario de plexo mientérico se extrajo usando un kit de extracción RNAqueous (*Ambion, Inc.*) y tratado con DNAsa I (*Invitrogen*). La síntesis de la primera cadena de cDNA fue sintetizada (50 min, 42°C) usando el kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (*Invitrogen*). La mezcla de reacción fue incubada con RNAsa H a 42°C por 50 min, después a 70°C por 15 min y finalmente a 37°C durante 20 min para eliminar la moléculas híbridas de ARN:ADN del templado RNA. Para cada muestra se llevo a cabo una reacción control sin Transcriptasa reversa. Los oligos fueron diseñados en las regiones conservadas 5' y '3-UTR de los cDNAs 5-HT_{3A} y P2X₇ pertenecientes a ratón. Para 5-HT_{3A} los oligos fueron los siguientes: oligo sentido, 5'-ACATCTGGAATTCTTGCCATGCGGC-3'; oligo antisentido, 5'-CGAATTCCTGCCAGGCTGTGC-3'. Para P2X₇ los oligos fueron los siguientes: oligo sentido, 5'-CGAATTCGAGCCTGTGCGCCATG-3'; oligo antisentido 5'-GGCTTTCAGTAGGGATACTTGAAG-3'. Las amplificaciones por PCR fueron llevadas a cabo usando 1 µl del cDNA usando los oligos sentido y antisentido (10 pmol/µl de cada oligo), 200 µM de cada desoxinucléotidos, 160 µM de MgCl₂ en presencia de 2.5 unidades de Platinum® Taq DNA polimerasa (*Invitrogen*). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: para 5-HT_{3A}, un ciclo de 94°C, 5 min, 42 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 63°C y 2 min a 72°C con una extensión final de 8

min a 72°C. Para P2X₇, un ciclo de 94°C, 5 min, 42 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C y 2 min a 72°C con una extensión final de 8 min a 72°C. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Para ambos casos, un producto único fue aislado y clonado en el vector pCR 4 TOPO (TA Cloning Kit, Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Ocho clonas fueron secuenciadas completamente utilizando un secuenciador de ADN automático. Para la expresión funcional del receptor, los cDNA 5-HT_{3A} y P2X₇ de intestino delgado de ratón fueron subclonados en el vector de expresión pcDNA 3.1 en el sitio *EcoRI*. La identidad y orientación de los resultados fueron verificadas por secuenciación y análisis de restricción. Los alineamientos de secuencias fueron llevados a cabo con los programas (*DNASTAR*, Madison USA) y *CLUSTAL* (Higgins & Sharp, 1988). Las secuencias fueron comparadas con aquellas disponibles en EMBL GenBank.

Resultados y discusión

Organización genómica del receptor 5-HT_{3A}

La organización genómica de la subunidad 5-HT_{3A} fue descrita por primera vez por (Werner *et al.*, 1994). Este gen es copia única en el genoma de ratón, y se localiza en el cromosoma 9. Posee un marco de lectura abierto (ORF) de 1467 pb, dividido por 8 intrones. La longitud del fragmento de gen que flanquea los exones 1 y 9 asciende a 11.5 Kb.

El primer exón (en lo que corresponde al ORF) codifica para el péptido señal; los exones 2 al 6 corresponden a la mitad del amino terminal (NH₂); el exón 7 codifica para los dos primeros dominios transmembranales (TM1 y TM2); el tercer dominio transmembranal (TM3) y la mitad del loop intracelular son codificados por el exón 8. El último exón codifica para la otra mitad del loop intracelular, el dominio transmembranal 4 y el carboxilo (COOH) terminal extracelular (Figura 1).

Aislamiento del cDNA 5-HT_{3A} de intestino de ratón

Con la finalidad de aislar y clonar el cDNA correspondiente al receptor 5-HT_{3A} del intestino delgado de ratón, se diseñaron oligonucleótidos en base a secuencias del 5-HT_{3A} de otros tejidos de ratón (GenBank X72395). Mediante la técnica de PCR se logró amplificar un fragmento de cDNA de 1490 pb a partir de ARN de intestino delgado (Figura 2). Dicho cDNA corresponde al ORF más 25 pb de UTR5' y 16 pb de UTR3', y se clonó en el vector pCR 4 TOPO® para su secuenciación.

El análisis de dicha secuencia reveló un marco de lectura abierto correspondiente a una proteína de 483 amino ácidos, la cual presenta una identidad del 100% con

la subunidad 5HT_{3A} variante corta (5-HT_{3AS}) previamente descrita por (Werner *et al.*, 1994) con número de acceso NP_001093114.1 (Figura 2).

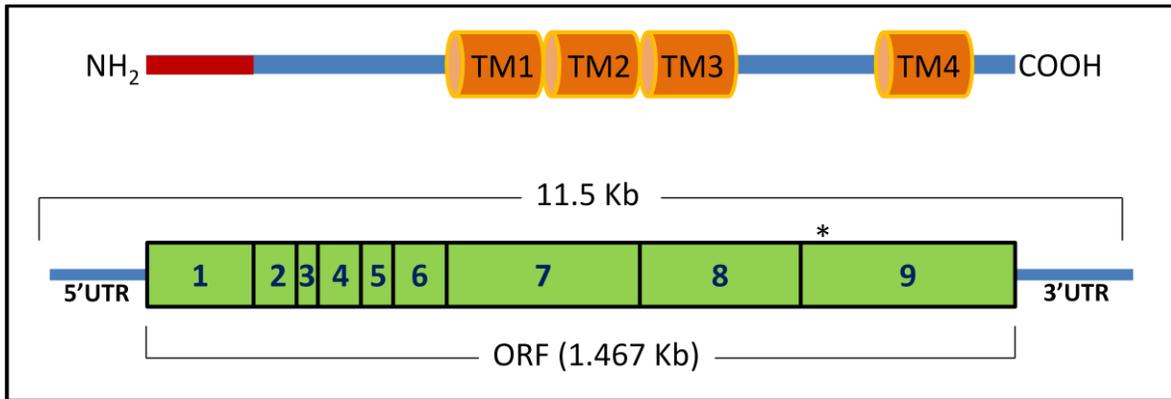


Figura 1. Organización del gen que codifica la subunidad 5-HT_{3A}. En la parte superior se muestra un esquema representativo de la estructura proteica de la subunidad. La línea roja representa el péptido señal, los dominios transmembranales se representan con los cilindros naranjas. En la parte inferior se muestra un esquema representativo de la organización del gen. Las cajas verdes representan los exones, las líneas verticales negras representan la posición de los intrones y el asterisco señala la pérdida de 6 codones en el exón 9 generando la subunidad 5-HT_{3AS} por *splicing* alternativo.

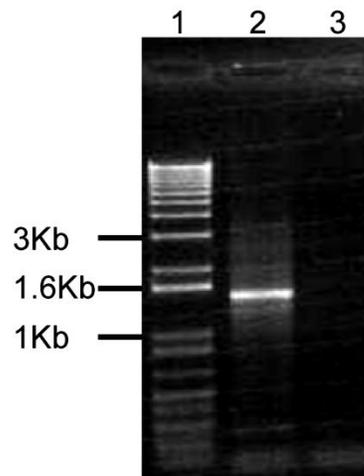


Figura 2. Amplificación mediante PCR del cDNA 5-HT_{3AS}. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de peso molecular de 1Kb. Carril 2, producto de PCR del cDNA 5-HT_{3AS}. Carril 3, control negativo (sin transcriptasa reversa).

5-HT _{3AL}	MRLCI PQVLLALFLSMLTAPGEGSRRRATQARDTTQPALLRLSDHLLANYKKGVRPVRDWRKPTTVSI DVI MYAI LNVDE	80
5-HT _{3AS}	MRLCI PQVLLALFLSMLTAPGEGSRRRATQARDTTQPALLRLSDHLLANYKKGVRPVRDWRKPTTVSI DVI MYAI LNVDE	80
Intestino	MRLCI PQVLLALFLSMLTAPGEGSRRRATQARDTTQPALLRLSDHLLANYKKGVRPVRDWRKPTTVSI DVI MYAI LNVDE	80
	*	
5-HT _{3AL}	KNQVLTYYI WYRQYWTDEFLQWTPEDFDNVTKLSI PTDSI WPDIL I NEFVDVGKSPNI PYVYVHHRGEVQNYKPLQLVT	160
5-HT _{3AS}	KNQVLTYYI WYRQYWTDEFLQWTPEDFDNVTKLSI PTDSI WPDIL I NEFVDVGKSPNI PYVYVHHRGEVQNYKPLQLVT	160
Intestino	KNQVLTYYI WYRQYWTDEFLQWTPEDFDNVTKLSI PTDSI WPDIL I NEFVDVGKSPNI PYVYVHHRGEVQNYKPLQLVT	160
5-HT _{3AL}	ACSLDI YNPFDFVQNCSLTFTSWLHTI QDI NI TLWRSPPEEVRSDKSI FI NQGEWELLEVPQFKEFSI DI SNSYAEMKFY	240
5-HT _{3AS}	ACSLDI YNPFDFVQNCSLTFTSWLHTI QDI NI TLWRSPPEEVRSDKSI FI NQGEWELLEVPQFKEFSI DI SNSYAEMKFY	240
Intestino	ACSLDI YNPFDFVQNCSLTFTSWLHTI QDI NI TLWRSPPEEVRSDKSI FI NQGEWELLEVPQFKEFSI DI SNSYAEMKFY	240
	*	
5-HT _{3AL}	VI I RRRPLFYAVSLLPSI FLMVVDI VGFCLPPDSGERVSFKI TLLLGYSVFLI I VSDTLPATAI GTPLI GYFYVVCMAI	320
5-HT _{3AS}	VI I RRRPLFYAVSLLPSI FLMVVDI VGFCLPPDSGERVSFKI TLLLGYSVFLI I VSDTLPATAI GTPLI GYFYVVCMAI	320
Intestino	VI I RRRPLFYAVSLLPSI FLMVVDI VGFCLPPDSGERVSFKI TLLLGYSVFLI I VSDTLPATAI GTPLI GYFYVVCMAI	320
5-HT _{3AL}	LVI SLAETI FI VRLVHKQDLQRPVPDWL RHL VLDRI AW LCLGEQPMHRPPATFQANKTDDCSGSDLLPAMGNHCSHVG	400
5-HT _{3AS}	LVI SLAETI FI VRLVHKQDLQRPVPDWL RHL VLDRI AW LCLGEQPMHRPPATFQANKTDDC- - - - - SAMGNHCSHVG	394
Intestino	<u>LVI SLAETI</u> FI VRLVHKQDLQRPVPDWL RHL VLDRI AW LCLGEQPMHRPPATFQANKTDDC- - - - - SAMGNHCSHVG	394
5-HT _{3AL}	GPQDLEKTPRGRGSPLPPPRESLAVRGLLQELSSI RHFLEKRDEMREVARDWLRVGYVLDRLLFRI YLLAVLAYSI TLV	480
5-HT _{3AS}	GPQDLEKTPRGRGSPLPPPRESLAVRGLLQELSSI RHFLEKRDEMREVARDWLRVGYVLDRLLFRI YLLAVLAYSI TLV	474
Intestino	GPQDLEKTPRGRGSPLPPPRESLAVRGLLQELSSI RHFLEKRDEMREVARDWLRVGYVLDRLLFRI <u>YLLAVLAYSI TLV</u>	474
5-HT _{3AL}	TLWSI WHYS	489
5-HT _{3AS}	TLWSI WHYS	483
Intestino	<u>TLWSI WHYS</u>	483

Figura 3. Comparación de la secuencia de amino ácidos de la proteína 5-HT_{3AS} aislado de intestino delgado de ratón con la subunidad 5-HT_{3AL} (NP_038589.2) y 5-HT_{3AS} (NP_001093114.1) de ratón reportadas en GenBank. El péptido señal de la proteína se muestra dentro del recuadro. Los asteriscos señalan los sitios de glicosilación y los dominios transmembranales están indicados en barras negras. Los alineamientos de secuencias fueron llevados a cabo con los programas (DNASTAR, Madison USA) y CLUSTAL (Higgins & Sharp, 1988)

Werner *et al.*, (1994) demostró por ensayos de protección de RNAsa que el ARNm 5-HT_{3AS} (versión corta) es aproximadamente 5 veces más abundante que el ARNm 5-HT_{3AL} (versión larga) en líneas celulares de neuroblastomas y tejidos neuronales, por lo que no se descarta la posibilidad de la co-existencia de ambas formas en el intestino delgado de ratón. Dichas formas son el resultado de corte y empalme alternativo del ARN mensajero (ARNm) a partir del mismo gen (Hope *et al.*, 1993). Este procesamiento del ARNm es un mecanismo común para generar

heterogeneidad en canales iónicos activados por ligando, pero la significancia fisiológica de la existencia de estas variantes todavía no es bien entendida, sobre todo para el caso del receptor 5-HT_{3A}, puesto que no se han encontrado diferencias en las características electrofisiológicas de ambas variantes (Werner *et al.*, 1994).

Otro resultado interesante que obtuvimos, fue una variante que presentó un codón de paro del receptor 5-HT_{3A} por medio de PCR. Durante el proceso de aislamiento del cDNA 5-HT_{3A} utilizamos una Taq polimerasa convencional la cual en la amplificación cometió un error en el nucleótido (nt) 1341 pb, cambiando el nt G por el nt A. Dicha polimerasa introdujo un nuevo codón de paro, resultando un marco de lectura más pequeño, que nos originaría una proteína más corta, la cual carece de los últimos 36 amino ácidos de la proteína completa, por lo que carece de un tercio del loop intracelular, del dominio transmembranal 4 (TM4) y el COOH-terminal. Esta variante truncada puede ser muy útil para los estudios de interacciones cruzadas entre receptores P2X y 5-HT_{3A}, ya que se ha propuesto que una parte del loop intracelular del receptor 5-HT_{3A} pudiera estar interaccionando con el COOH-terminal del receptor P2X (Boue-Grabot *et al.*, 2003). Con el resultado anterior, las siguientes amplificaciones por PCR fueron realizadas utilizando Taq polimerasas de alta fidelidad para evitar posibles errores en la amplificación.

Organización genómica del receptor P2X₇

Los genes que codifican las subunidades P2X varían considerablemente en tamaño, por ejemplo el gen que codifica para la subunidad P2X₃ de ratón tiene un tamaño de 30 Kb (incluyendo los exones e intrones) (Souslova *et al.*, 1997) mientras que el gen que codifica la subunidad P2X₆ mide 12 Kb (incluyendo los exones e intrones) (Urano *et al.*, 1997). Los cDNAs que codifican para las variantes completas presentan de entre 11 a 13 exones, y todos muestran una estructura común, con bordes intron/exón bien conservados (North, 2002). Con respecto al gen que codifica para la subunidad P2X₇ de ratón es copia única en el genoma y se localiza en el cromosoma 5, tiene un tamaño de 47.5 Kb, su ORF mide 1,785 pb, consta de 13 exones divididos por 12 intrones.

Aislamiento del cDNA P2X₇ de plexo mientérico de ratón

Con la misma finalidad de aislar un cDNA correspondiente de P2X₇ de intestino delgado de ratón, utilizando oligonucleótidos específicos basados en la secuencia de cDNA P2X₇ de ratón aislado de microglía (GenBank NM_011027). Por la técnica de PCR, amplificamos un cDNA de 1810 pb a partir de un ARN total de cultivo primario de plexo mientérico de intestino delgado de ratón por medio de PCR (Figura 4). El cDNA se clonó en el vector pCR 4 TOPO® para su secuenciación. Se analizaron 8 clonas diferentes por restricción y secuenciación. El análisis de secuencia reveló dos diferentes marcos de lectura abiertos. El primero correspondió a una proteína de 595 amino ácidos, con una identidad del 100% a la subunidad P2X₇ isoforma **a** con número de acceso NP_035157.2. La segunda

secuencia originó a una proteína de 545 amino ácidos, con una identidad del 91% a la subunidad P2X₇ isoforma **a** (Figura 5). Solo con el análisis de secuencia nos fue posible detectar estas dos variantes generadas por “splincing” del receptor P2X₇. En el gel de agarosa al 1% no nos fue posible detectar las dos bandas, ya que la diferencia en pares de bases es muy pequeña (150 pb).

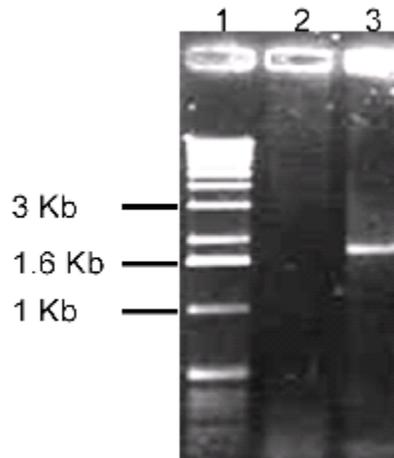


Figura 4. Amplificación mediante PCR del cDNA P2X₇. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de peso molecular de 1Kb. Carril 2, control negativo (sin transcriptasa reversa). Carril 3, producto de PCR del cDNA P2X₇.

Dos variantes del canal P2X₇ de plexo mientérico de intestino delgado de ratón fueron aisladas e identificadas. Una variante correspondiente a la forma larga identificada previamente (Chessell *et al.*, 1998) y otra registrada anteriormente en la base de datos GenBank con numero de acceso EDL 19673.1. Esta última variante carece del exón 11, el cual codifica para 9 amino ácidos del TM2 y 41 amino ácidos del carboxilo terminal. Se sabe que el TM2 forma el poro del canal (North, 2002) y recientemente se ha encontrado que el carboxilo terminal del

receptor P2X₇ es un modulador de la actividad del canal (Becker *et al.*, 2008). Las implicaciones funcionales de esta variante las desconocemos aún, sin embargo, una variante P2X₇ similar se ha reportado en humano, la cual carece completamente del carboxilo terminal y parte del TM2. Dicha variante es altamente expresada en varios tejidos humanos y se encontró que media el influjo de Ca²⁺ regulado por ATP y la depolarización de la membrana cuando se expresa en células HEK 293 (Cheewatrakoolpong *et al.*, 2005). Otra variante truncada del receptor P2X₇, designada como P2X_{7-j}, fue identificada, está se expresa normalmente en células de cáncer cervical. Esta variante interacciona con la subunidad P2X₇ isoforma **a** formado hetero-oligomeros, lo cual trae como consecuencia el bloqueo de las funciones del canal P2X₇ (Feng *et al.*, 2006). Por las evidencias anteriores, podemos especular que la variante del receptor P2X₇, carente del exón 11, aislada de plexo mientérico de ratón, podría formar un canal funcional pero con propiedades diferentes o más aún formar canales heteroméricos ya sea con la subunidad P2X₇ **a** (subunidad larga) expresada también en el plexo mientérico (este estudio) o con otras subunidades expresadas en el mismo plexo como son P2X₂, P2X₃ y P2X₅ (Ruan & Burnstock, 2005) y formar canales con propiedades únicas.

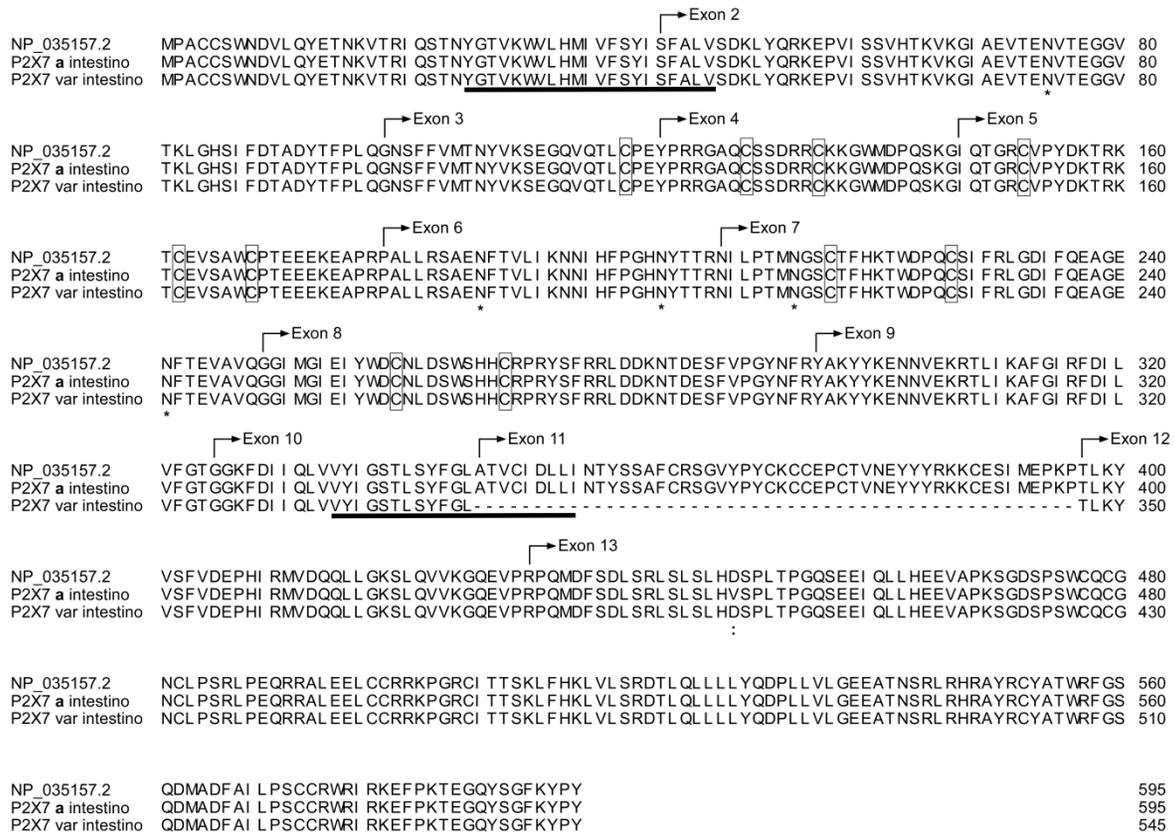


Figura 5. Alineamiento de las secuencias de amino ácidos de la proteína P2X₇ aislado de cultivo mientérico de intestino delgado de ratón con la subunidad P2X₇ isoforma a (NP_035157.2) reportada en GenBank. Los dominios transmembranales están indicados por las barras negras y los asteriscos señalan los sitios de glicosilación. Las cisteínas conservadas en la familia de los receptores P2X se indican con recuadros. Las posiciones correspondientes al inicio de cada exón son indicadas con flechas. Los alineamientos de secuencias fueron llevados a cabo con los programas (DNASTAR, Madison USA) y CLUSTAL (Higgins & Sharp, 1988)

Clonación de 5-HT_{3AS} y P2X₇ en el vector pcDNA3.1

Nuestro siguiente objetivo fue construir vectores para la sobreexpresión de los receptores aislados en este estudio. Para ello, se utilizó el vector pCR 4 TOPO® para facilitar los pasos de subclonación en el vector de expresión pcDNA 3.1®. El vector pcDNA 3.1® es un plásmido diseñado para facilitar un alto nivel de expresión de cDNAs clonados en células de mamífero, ya que posee el promotor

inmediato temprano de citomegalovirus (CMV), un sitio clonación múltiple (MCS) en orientación sentido y antisentido para facilitar su clonación y un gen de resistencia a neomicina para la selección de líneas estables. Además, el MCS está flanqueado por los promotores derivados de bacteriófagos T7 y SP6 para permitir la transcripción *in vitro* de cualquier cadena del DNA clonado, lo que permite la síntesis de ARN mensajero (ARNm) *in vitro*. Los ARNm *in vitro* de canales iónicos han sido usados extensamente para la microinyección de ovocitos de *Xenopus laevis*.

El vector pCR 4 TOPO® fue digerido con la enzima *EcoRI* para liberar los cDNAs 5-HT_{3AS} y P2X₇. Por otro lado, el vector pcDNA3.1 fue digerido con la enzima *EcoRI* para eliminar un inserto que no era de nuestro interés, y en su lugar subclonar los cDNAs 5-HT_{3AS} y P2X₇. Una vez purificados los productos de la digestión, se realizó la ligación del vector con el inserto, con la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen), el producto de la ligación se utilizó para electroporar la cepa DH5α de *E. coli* y las clonas que crecieron en medio selectivo fueron caracterizadas mediante análisis de restricción y secuenciación. En la Figura 6 se muestra un ejemplo de la clonación del gen P2X₇. En la Tabla I muestro un resumen de los cDNAs aislados de intestino de ratón reportados en este estudio que se tienen clonados en el vector pcDNA3.1®.

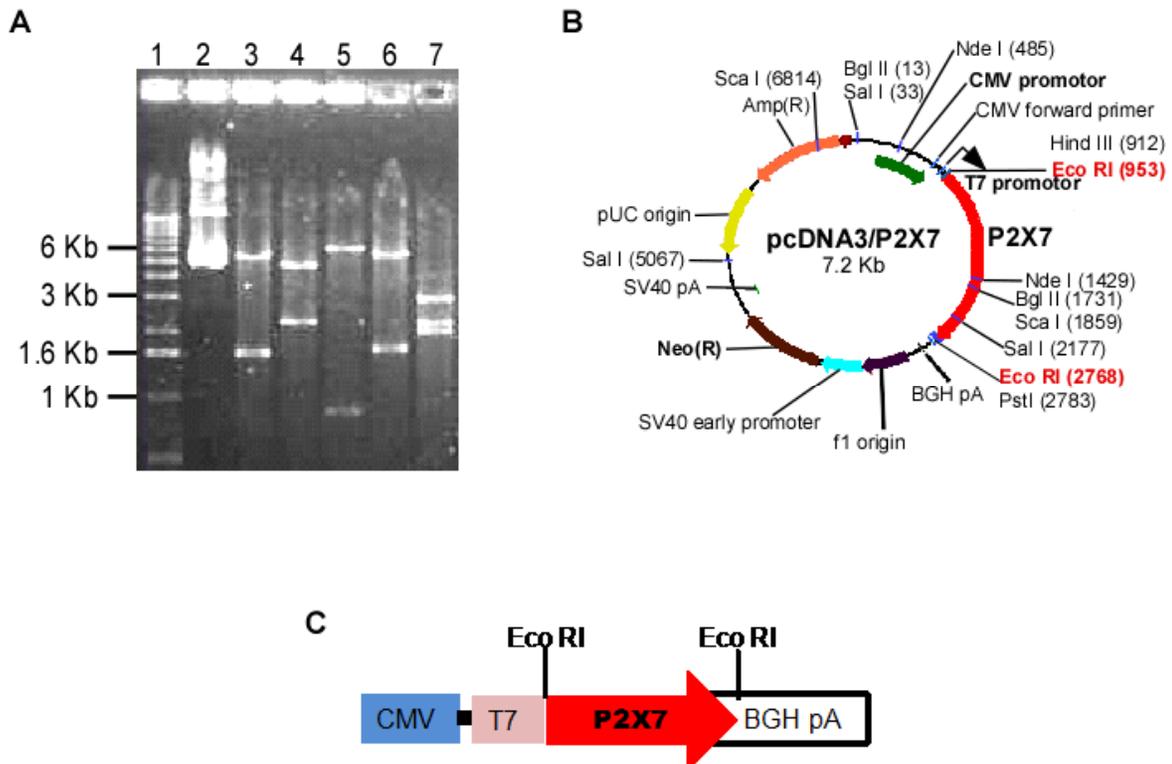


Figura 6. Análisis de restricción del vector pcDNA3/P2X7. A) Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de peso molecular de 1Kb. Carril 2, vector sin digerir. Carril 3, vector digerido con *Eco RI*. Carril 4, vector digerido con *Sca I*. Carril 5, vector digerido con *Nde I*. Carril 6, vector digerido con *Bgl II*. Carril 7, vector digerido con *Sal I*. B) Mapa de restricción del vector. C) Representación esquemática del vector donde se indica la región, en la que se realizó la introducción del cDNA P2X7.

Tabla I. cDNAs aislados de intestino de ratón clonados en el vector pcDNA3.1

Nombre del gen aislado de intestino de ratón	Tamaño del inserto clonado (pb)	Tamaño de la proteína (amino ácidos)	% de identidad de la proteína con respecto a la reportada en el GenBank
5-HT _{3AS}	1490	483	100%(NP_001093114.1)
5-HT _{3A} (truncada)*	1490	447	
P2X ₇ isoforma a	1810	595	100% (NP_035157.2)
P2X ₇ truncada	1660	545	91% (NP_035157.2)

* Variante truncada de la subunidad 5-HT_{3A} generada por un artefacto de la PCR.

En resumen, la clonación de los receptores 5-HT_{3AS} y las dos variantes del receptor P2X₇ aislados del intestino delgado de ratón permitirá su caracterización molecular, biofísica y farmacológica en un sistema de expresión heterólogo y de ese modo ayudarnos a entender las propiedades farmacológicas de los receptores 5-HT_{3A} y P2X₇ nativos en neuronas mientéricas de ratón.

Referencias

1. Barajas-Lopez C, Peres AL & Espinosa-Luna R. (1996). Cellular mechanisms underlying adenosine actions on cholinergic transmission in enteric neurons. *Am J Physiol* 271, C264-275.
2. Becker D, Woltersdorf R, Boldt W, Schmitz S, Braam U, Schmalzing G & Markwardt F. (2008). The P2X7 carboxyl tail is a regulatory module of P2X7 receptor channel activity. *J Biol Chem* 283, 25725-25734.
3. Boue-Grabot E, Barajas-Lopez C, Chakfe Y, Blais D, Belanger D, Emerit MB & Seguela P. (2003). Intracellular cross talk and physical interaction between two classes of neurotransmitter-gated channels. *J Neurosci* 23, 1246-1253.
4. Connolly CN & Wafford KA. (2004). The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochem Soc Trans* 32, 529-534.
5. Cheewatrakoolpong B, Gilchrest H, Anthes JC & Greenfeder S. (2005). Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel. *Biochem Biophys Res Commun* 332, 17-27.
6. Chessell IP, Simon J, Hibell AD, Michel AD, Barnard EA & Humphrey PP. (1998). Cloning and functional characterisation of the mouse P2X7 receptor. *FEBS Lett* 439, 26-30.
7. Davies PA, Pistis M, Hanna MC, Peters JA, Lambert JJ, Hales TG & Kirkness EF. (1999). The 5-HT3B subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* 397, 359-363.
8. Denlinger LC, Sommer JA, Parker K, Gudipaty L, Fiset PL, Watters JW, Proctor RA, Dubyak GR & Bertics PJ. (2003). Mutation of a dibasic amino acid motif within the C terminus of the P2X7 nucleotide receptor results in trafficking defects and impaired function. *J Immunol* 171, 1304-1311.
9. Feng YH, Li X, Wang L, Zhou L & Gorodeski GI. (2006). A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization. *J Biol Chem* 281, 17228-17237.
10. Galligan JJ. (2002). Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 14, 611-623.
11. Guo C, Masin M, Qureshi OS & Murrell-Lagnado RD. (2007). Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 72, 1447-1456.

12. Higgins DG & Sharp PM. (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73, 237-244.
13. Hope AG, Downie DL, Sutherland L, Lambert JJ, Peters JA & Burchell B. (1993). Cloning and functional expression of an apparent splice variant of the murine 5-HT₃ receptor A subunit. *Eur J Pharmacol* 245, 187-192.
14. Kandel ERS, S. A. . (2000). *Signalling at the Nerve-Muscle Synapse: Directly Gated Transmission. In Principles of Neuroscience.*
15. Khakh BS. (2001). Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat Rev Neurosci* 2, 165-174.
16. Labasi JM, Petrushova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, Payette MM, Brissette W, Wicks JR, Audoly L & Gabel CA. (2002). Absence of the P2X₇ receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol* 168, 6436-6445.
17. Lester HA, Dibas MI, Dahan DS, Leite JF & Dougherty DA. (2004). Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends Neurosci* 27, 329-336.
18. North RA. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82, 1013-1067.
19. North RA & Surprenant A. (2000). Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 563-580.
20. Reeves DC & Lummis SC. (2002). The molecular basis of the structure and function of the 5-HT₃ receptor: a model ligand-gated ion channel (review). *Mol Membr Biol* 19, 11-26.
21. Roberts JA, Vial C, Digby HR, Agboh KC, Wen H, Atterbury-Thomas A & Evans RJ. (2006). Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch* 452, 486-500.
22. Ruan HZ & Burnstock G. (2005). The distribution of P2X₅ purinergic receptors in the enteric nervous system of mouse. *Cell Tissue Res* 319, 191-200.
23. Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ & Gabel CA. (2001). Altered cytokine production in mice lacking P2X₇ receptors. *J Biol Chem* 276, 125-132.
24. Souslova V, Ravenall S, Fox M, Wells D, Wood JN & Akopian AN. (1997). Structure and chromosomal mapping of the mouse P2X₃ gene. *Gene* 195, 101-111.

25. Urano T, Nishimori H, Han H, Furuhata T, Kimura Y, Nakamura Y & Tokino T. (1997). Cloning of P2XM, a novel human P2X receptor gene regulated by p53. *Cancer Res* 57, 3281-3287.
26. Werner P, Kawashima E, Reid J, Hussy N, Lundstrom K, Buell G, Humbert Y & Jones KA. (1994). Organization of the mouse 5-HT3 receptor gene and functional expression of two splice variants. *Brain Res Mol Brain Res* 26, 233-241.

ANEXO

Guerrero-Alba, R., et al., Two suramin binding sites are present in guinea pig but only one in murine native P2X myenteric receptors, *Eur. J. Pharmacol.* (2009), doi:10.1016/j.ejphar.2009.09.063