



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**El receptor P2X₇ contribuye a las corrientes
nativas de las neuronas mientéricas de cobayo**

Tesis que presenta

Eduardo Emmanuel Valdez Morales

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Carlos Barajas López

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto de 2011



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

IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**El receptor P2X₇ contribuye a las corrientes nativas de las neuronas mientéricas de cobayo**” presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Eduardo Emmanuel Valdez Morales** y aprobada el **5 de Agosto de 2011** 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
Director de la tesis

Dr. Irene B. Castaño Navarro
Asesor de la tesis

Dr. Elia B. Naranjo Rodríguez
Asesor de la tesis

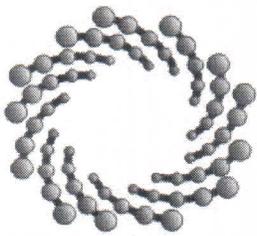
Dr. Luis M. Montaña Ramírez
Asesor de la tesis



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. Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT-166615 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica complementaria del Programa de Becas-Mixtas en el Extranjero para Becarios CONACYT Nacionales



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 035 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 19 días del mes de agosto del año 2011, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Presidenta	IPICYT
Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez	Secretario	UNAM
Dr. Carlos Barajas López	Sinodal	IPICYT
Dra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez	Sinodal externo	UNAM
Dra. Marcela Miranda Morales	Sinodal	IPICYT

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

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Eduardo Emmanuel Valdez Morales

sobre la Tesis intitulada:

El receptor P2X7 contribuye a las corrientes nativas de las neuronas mientéricas de cobayo

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Carlos Barajas López

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 14:25 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 19 días del mes de agosto de 2011.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bohillo Marín
Secretario Académico



DEDICATORIAS

A mi linda Esposa y mi hermoso Hijo

A mis Padres y Hermanos

Por todo su cariño y apoyo

AGRADECIMIENTOS

Al IPICyT por brindarme la gran oportunidad que medio de realizar mis estudios de doctorado.

Al CONACyT por el apoyo económico otorgado.

A mi amigo y director de tesis el Dr. Carlos Barajas López por haberme dado la confianza de pertenecer a su grupo de trabajo y por todo el apoyo que me ha brindado más allá de la realización de este proyecto, estaré siempre en deuda contigo.

A Rosa Espinosa Luna por todo su apoyo y enseñanzas técnicas, y por brindarme esa gran amistad que hemos compartido.

A mi compañera y esposa la Dra. Raquel Guerreo Alba por todo su cariño apoyo incondicional por sus consejos y por estar siempre a mi lado en todo momento. Te amo.

A mis compañeros del laboratorio de neurobiología: Andrómeda, Ésri, Raúl, Néstor, Lupita, Paco, Telma, Cintia, Josué, Criseida, gracias a todos ustedes por su compañerismo y amistad.

A mi compa Pablo Delgado Sánchez, por que cuando ocupe de un amigo siempre estuvo listo para ayudarme.

A mi grupo de asesores, la, la Dra. Irene Castaño Navarro, La Dra. Elia Naranjo, Dra. Marcela Miranda Morales y el Dr. Luis Montaña, Por todas sus valiosas enseñanzas y todas esas observaciones tan oportunas que ayudaron a mi formación y a la realización de este trabajo.

A mis padres y hermanos por estar siempre al pendiente en todo momento los amo con todo mi corazón.

A mis suegros y cuñados por todas sus atenciones y la hospitalidad que siempre me han dado.

A todos los miembros del IPICyT y cada uno que directa o indirectamente hicieron posible la realización de este trabajo muchas gracias a todos ustedes.

CONTENIDO

	Página
CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS	ii
CRÉDITOS INSTITUCIONALES	iii
ACTA DE EXAMEN	iv
DEDICATORIAS	v
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
ANEXOS	ix
ABREVIACIONES	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. El sistema nervioso	3
2.2. Sistema nervioso entérico	4
2.3. Señalización del ATP en el SNE	8
III. RECEPTORES P2X	8
3.1. Propiedades farmacológicas de los receptores P2X en neuronas mientéricas del cobayo	10
3.2. Receptor P2X ₇	14
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
V. HIPOTESIS	18
VI. OBJETIVOS	18
VII. MATERIALES Y METODOS	19
7.1. Preparación del cultivo neuronal primario	19
7.2. Registros de Patch Clamp	20
7.3. RT-PCR de célula única	22
7.4. Fármacos y soluciones utilizadas	24
7.5. Análisis de datos	25
VIII. RESULTADOS	26
8.1. La curva concentración-respuesta de ATP en neuronas mientéricas de cobayo es bifásica.	26
8.2. Las I _{ATP} de alta sensibilidad muestran una mayor	27

rectificación entrante que las corrientes de baja sensibilidad.	
8.3. Caracterización del efecto de varios inhibidores de los receptores P2X ₇ sobre los receptores hsP2X y lsP2X.	29
8.4. BzATP es un agonista parcial de los receptores hsP2X y es inactivo sobre los receptores lsP2X	31
8.5. Detección del ARNm del receptor P2X ₇ mediante RT-PCR en neurona única.	34
IX. DISCUSIÓN GENERAL	36
X. CONCLUSIONES	42
XI. REFERENCIAS	43

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. La estructura de los sistemas nervioso central y periférico	3
2. Capas principales y organización del tracto digestivo	5
3. Red neuronal que inician y generan la respuesta peristáltica	7
4. Estructura de la subunidad P2X	9
5. La cinética de desensibilización de las I_{ATP} en neuronas mientéricas de ratón y cobayo no son diferentes	11
6. El orden de potencia de los agonistas para los P2XRs de neuronas mientéricas de ratón es similar que para los de cobayo	12
7. Suramina induce potenciación e inhibición en los receptores P2X mientérico de cobayo	12
8. 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	13
9. Suramina tiene efectos potenciatorio e inhibitorios sobre los receptores P2X de neuronas mientéricas de cobayo	13
10. Co-localización del receptor P2X ₇ y marcadores neuroquímicos en el plexo mientérico de íleon de cobayo	16
11. Se aprecian dos fases en la curva concentración respuesta de ATP en neuronas mientéricas de cobayo	28
12. Una fuerte rectificación entrante se ve para las corrientes de alta sensibilidad que para las de baja sensibilidad	30
13. El BBG inhibió las corrientes inducidas por ATP 1 mM pero no las inducidas con 0.1 mM de ATP en las neuronas mientéricas de cobayo	32
14. BzATP activa los receptores P2X mientéricos con aproximadamente la mitad de la eficiencia de ATP 1 mM	33
15. BzATP inhibió las corrientes inducidas por bajas concentraciones de ATP lo que sugiere que es un agonista parcial de los receptores P2X	33
16. Los receptores P2X activados por BzATP muestran las mismas propiedades que las activadas por bajas concentraciones de ATP	34
17. Detección de ARNm de la subunidad P2X ₇ revelado por RT-PCR en célula única.	35

ANEXOS

1. Valdez-Morales E. E., Guerrero-Alba R., Liñan-Rico A, Espinosa-Luna R., Zarazua-Guzman S., Miranda-Morales M., Montaña LM., Barajas-López C. (2011). P2X7 receptors contribute to the currents induced by ATP in guinea pig intestinal myenteric neurons. *Eur. J. Pharmacol.* <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299911007941>
2. Guerrero-Alba R., Valdez-Morales E. E., Juárez E. H., Miranda-Morales M., Ramírez-Martínez J. F., Espinosa-Luna R., Barajas-López C. (2010). Two suramin binding sites are present in guinea pig but only one in murine native P2X myenteric receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 626: 179-185.

ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
α , β -meATP	α , β -metileno ATP
ADP	Adenosina difosfato
ACh	Acetilcolina
AHP	Hiperpolarización después de un potencial de acción
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina-5-Trifosfato
Ca ²⁺	Calcio (ión calcio)
CO	Monóxido de carbono
COOH	Grupo Carboxilo
DMSO	Dimetil sulfóxido
DRG	Ganglio de la raíz dorsal
EPSPs	Potenciales postsinápticos excitatorios
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GDP	Guanosina difosfato
GI	Gastrointestinal
GPCRs	Receptores asociados a proteínas G
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
I _{ATP}	Corriente inducida por ATP
I _{ATP(H-S)}	Corriente inducida por ATP de alta sensibilidad
I _{ATP(L-S)}	Corriente inducida por ATP de baja sensibilidad
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
nACh	Receptor nicotínico a acetilcolina
NH ₂	Grupo amino
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetasa
NPY	Neuropéptido Y
PPADS	Ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2'.4'-disulfónico
pS	Picosimens
S.E.M.	Error estándar del promedio
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SNC	Sistema Nervioso Central
SNE	Sistema Nervioso Entérico
SNP	Sistema Nervioso Parasimpático
SNS	Sistema Nervioso Simpático

GLOSARIO

Agonista. Es es aquella sustancia que es capaz de unirse a un receptor y provocar una respuesta en la célula

Antagonista. Molécula química que no provoca una respuesta biológica por sí sola uniéndose a un receptor, pero bloquea o detiene respuestas mediadas por agonistas 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.

Compliancia. es una medida de la propiedad de un órgano hueco que le permite el alargamiento o distensión en resistencia al retorno hacia sus dimensiones originales. Es el recíproco de "elastancia".

Desensibilización. Cuando el efecto de un agonista disminuye gradualmente si se administra continua o repetidamente.

Estequiometria. Es la relación cuantitativa de las subunidades que conforman el canal.

Fibras posganglionares. Son fibras de neuronas cuyo cuerpo se localiza en el ganglio nervioso.

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 cúmulos de cuerpos neuronales y se localizan fuera del sistema nervioso central.

Inmunoreactividad. Señal fluorescente que emite un anticuerpo marcado con un fluoróforo a determinada longitud de onda al unirse a 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.

Nervios espinales. Son aquellos que se prolongan desde la médula espinal y atraviesan los orificios vertebrales para distribuirse a las zonas del cuerpo.

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

Rectificación entrante. Es la propiedad del canal iónico que permite el paso de iones con mayor facilidad en una sola dirección (hacia adentro de la célula). Se cree que esta corriente puede jugar un papel importante en la regulación de la actividad neuronal, ayudando a establecer el potencial de reposo de la membrana de la célula.

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.

Resumen

El receptor P2X7 contribuye a las corrientes nativas de las neuronas mientéricas de cobayo

La configuración de célula completa, varias herramientas farmacológicas y PCR en célula única fueron usadas para investigar la contribución de las subunidad P2X₇ en las corrientes inducidas por ATP (I_{ATP}) en neuronas mientéricas de cobayo. Las I_{ATP} fueron registradas. La curva concentración respuesta para el ATP (0-01-5 mM) mostró dos corrientes, una de alta sensibilidad I_{ATP} ($I_{ATP(H-S)}$) observada entre 0-01-0.3 mM y otra de menor sensibilidad I_{ATP} ($I_{ATP(L-S)}$) por arriba de 0.3 mM. Los valores calculados de EC₅₀ para estas corrientes fueron 38 y 1759 μ M respectivamente. La curva concentración respuesta para el 2'-3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP (BzATP) fue monofásica (0-01-1mM) y este agonista fue menos potente (EC₅₀ 142 μ M) que el ATP para inducir $I_{ATP(H-S)}$ pero más potente que el ATP para activar $I_{ATP(L-S)}$. Una fuerte rectificación fue observada cuando $I_{ATP(L-S)}$ fue activada y para I_{BzATP} (0.1 mM) pero una rectificación mínima fue observada cuando la $I_{ATP(L-S)}$ fue activada (5 mM). Brilliant blue G (BBG; 0.3 μ M, concentración que inhibe solo a los receptores P2X₇) inhibe significativamente las $I_{ATP(L-S)}$ pero no afecta a las $I_{ATP(H-S)}$ y las I_{BzATP} . Utilizando la técnica de RT-PCR en célula única, el ARNm de P2X₇ fue detectado en 7 células de 13 que amplificaban también el ARNm de P2X₂. En conjunto nuestros datos muestran que P2X₇ es el probable responsable de las $I_{ATP(L-S)}$ mientras que en la gran mayoría de las neuronas las $I_{ATP(H-S)}$ pueden estar mediadas por, al menos en parte, por las subunidades P2X₂.

PALABRAS CLAVE:

ATP, Neuronas mientéricas, Receptor P2X₇.

Abstract

P2X₇ receptors contribute to the currents induced by ATP in guinea pig intestinal myenteric neurons

The whole-cell configuration, various pharmacological tools, and single cell PCR were used to investigate the contribution of P2X₇ subunits to the ATP-induced currents (I_{ATP}) of guinea pig myenteric neurons. I_{ATP} was recorded in tested neurons. ATP concentration-response curve (0.01-5 mM) showed two currents, one high sensitive I_{ATP} ($I_{ATP(H-S)}$) observed between 0.01-0.3 mM and another low sensitive I_{ATP} ($I_{ATP(L-S)}$) above 0.3 mM. The calculated EC₅₀ values to induce these currents were 38 and 1759 μ M, respectively. 2'-3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP (BzATP) concentration-response curve was monophasic (0.01-1 mM) and this agonist was less potent (EC₅₀ 142 μ M) than ATP to induced $I_{ATP(H-S)}$ but more potent than ATP to activate $I_{ATP(L-S)}$. A strong inward rectification was noticed for $I_{ATP(H-S)}$ and for I_{BzATP} (0.1 mM) but a minimal rectification was noticed when $I_{ATP(L-S)}$ was activated (5 mM). Brilliant blue G (BBG; 0.3 μ M, concentration known to inhibit only P2X₇ receptors), significantly inhibited $I_{ATP(L-S)}$ but neither affect $I_{ATP(H-S)}$ nor I_{BzATP} . Using the single-cell RT-PCR technique P2X₇ mRNA was detectable in 7 out of 13 (out of 14) myenteric neurons exhibiting P2X₂ mRNA. Altogether, our results show that P2X₇ is likely responsible for the $I_{ATP(L-S)}$, whereas, in the great majority of neurons $I_{ATP(H-S)}$ are likely mediated by channels constituted, at least in part, by P2X₂ subunits.

PALABRAS CLAVE:

ATP, Myenteric neurons, P2X₇ receptors.

I. INTRODUCCION

El ATP fue propuesto como neurotransmisor durante la década de los 70 y desde entonces muchos estudios han tratado de precisar su papel en la transmisión sináptica (Burnstock, 2006). El ATP tiene efectos excitatorios en las neuronas del sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP) incluyendo las neuronas entéricas mediante la activación de los receptores ionotrópicos, P2X (North, 2002; Galligan & North, 2004; Ochoa-Cortes et al., 2010). Los receptores P2X son selectivos a cationes ($\text{Na}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Ca}^{2+}$) (Barajas-López et al., 1993; Barajas-López et al., 1994; Galligan & Bertrand, 1994; Barajas-López et al., 1996). Se han clonado y caracterizado 7 subunidades de receptores P2X (P2X₁ – P2X₇) en mamíferos (Khakh et al., 2001). Estas subunidades se agrupan en trímeros para formar un canal funcional. Todas las subunidades son capaces de formar canales homoméricos y heteroméricos, excepto P2X₆, que solo forma canales heteroméricos y P2X₇ que solo forma canales homoméricos. La estequiometría de los receptores P2X heteroméricos es desconocida, pero tienen características farmacológicas y biofísicas únicas, que también son afectadas por formas alternativas de *splicing* (Khakh et al., 2001; North, 2002).

Las propiedades de los receptores P2X han sido determinadas principalmente en estudios utilizando receptores recombinantes, sin embargo el estudio de los receptores P2X nativos no se conoce con detalle debido a la falta de agonistas y antagonistas selectivos y específicos para cada subunidad (Khakh et al., 2001; North, 2002).

En las neuronas mientéricas del intestino delgado de cobayo se ha reportado inmunoreactividad para tres diferentes subunidades: P2X₂ (Castelucci et al., 2002; Xiang and Burnstock, 2004), P2X₃ (Poole et al., 2002; Van Nassauw et al., 2002) y P2X₇ (Hu et al., 2001). De las anteriores, la subunidad P2X₂ es la más abundante en las neuronas mientéricas, mientras que la subunidad P2X₃ se ha reportado como la menos frecuente. También, se ha descrito inmunoreactividad sustancial para la subunidad del receptor P2X₇ a lo largo de fibras nerviosas que atraviesan ganglios, y áreas que rodean los cuerpos neuronales de íleon y se ha propuesto, que los canales P2X₇ contribuyen a las corrientes inducidas por ATP (I_{ATP}) en las neuronas mientéricas de cobayo (Hu et al., 2001). Sin embargo, en este trabajo, tal participación no es soportada con la farmacología existente para el receptor P2X₇ de cobayo.

Como parte de nuestro esfuerzo para entender las propiedades nativas de los receptores P2X de las neuronas mientéricas de cobayo nosotros re-examinamos la posibilidad de que los receptores P2X₇ pudieran contribuir a las I_{ATP} . Hemos encontrado una I_{ATP} de baja sensibilidad con propiedades farmacológicas similares a aquellas reportadas para receptores recombinantes P2X₇ de cobayo (Fonfria et al., 2008). Además encontramos la presencia del ARNm para el receptor P2X₇ por RT-PCR en célula única en el 54% de neuronas mientéricas, lo cual indica que las I_{ATP} de baja sensibilidad presentes en las neuronas mientéricas de cobayo son mediadas por la activación de los receptores P2X₇.

II. ANTECEDENTES

2.1 El sistema nervioso

El sistema nervioso está dividido en central (SNC) y periférico (SNP). El SNC está compuesto por el encéfalo y la médula espinal, ambos están completamente protegidos por hueso y cubiertos por las meninges. El SNP incluye ganglios autónomos, ganglios sensoriales, y los nervios craneales y espinales (figura. 1) (Goodman et al., 2011).

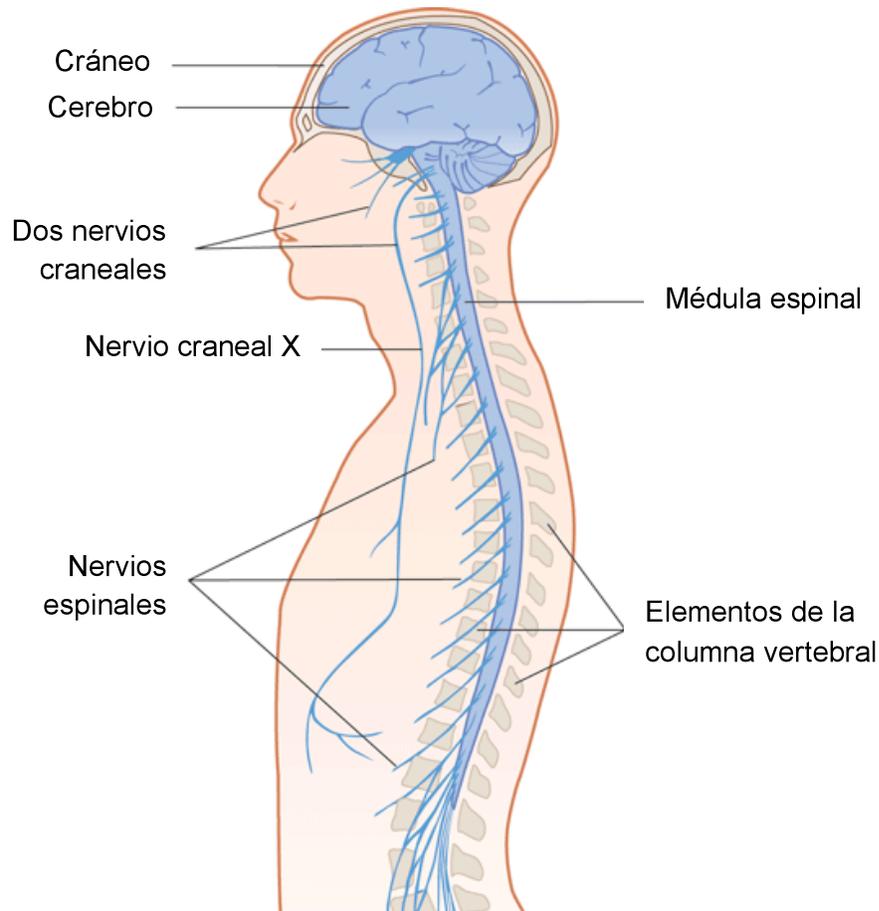


Figura 1. Componentes del sistema nervioso central y periférico. Relación entre el sistema nervioso central y sus cubiertas óseas. Tomada de Goodman et. al., (2011).

Funcionalmente el sistema nervioso (SN) está dividido en dos: 1). Sistema nervioso somático que inerva estructuras de la pared corporal como: músculo esquelético, piel, articulaciones y membranas mucosas. Los nervios somáticos motores no contienen ganglios periféricos y sus sinapsis se localizan completamente en el eje cerebroespinal. Sin embargo, los cuerpos neuronales de los nervios somáticos sensoriales se localizan en ganglios 2). El sistema nervioso autónomo (SNA) (también llamado vegetativo, visceral o involuntario) tiene dos divisiones: la simpática o toracolumbar y la parasimpática o craneosacral. El SNA, contiene porciones de los sistemas central y periférico, se encuentra distribuido a lo largo del cuerpo. En la periferia, consiste de nervios, ganglios y plexos que inervan el corazón, vasos sanguíneos, glándulas, otros órganos viscerales y músculo liso de varios tejidos. Se compone de fibras nerviosas que conducen información hacia (aférente) o desde (eferente) el SNC. En general, las fibras eferentes están involucradas en funciones motoras como la contracción del músculo liso o cardíaco o secreción de glándulas, por otro lado, las fibras aferentes usualmente transmiten estímulos sensoriales desde la piel, mucosas y estructuras profundas (Goodman et al., 2011).

2.2 Sistema nervioso entérico

Los procesos de mezcla, absorción y propulsión de nutrientes en el tracto gastrointestinal se controlan a nivel local por medio de una porción especializada del SNP llamada sistema nervioso entérico (SNE). Este sistema regula el control sensorial y motor del sistema gastrointestinal (GI) y está compuesto por neuronas sensoriales, neuronas motoras e interneuronas que están organizadas en dos

plexos nerviosos, el plexo mientérico y el plexo submucoso (Figura 2). El plexo mientérico, está localizado entre las capas musculares longitudinal y circular, tiene un papel muy importante en la relajación y contracción del músculo liso del tracto GI. (Kunze and Furness, 1999). El plexo submucoso regula las funciones de secreción y absorción del epitelio del tracto GI, flujo sanguíneo local y actividades neuro-inmunes (Cooke, 1998).

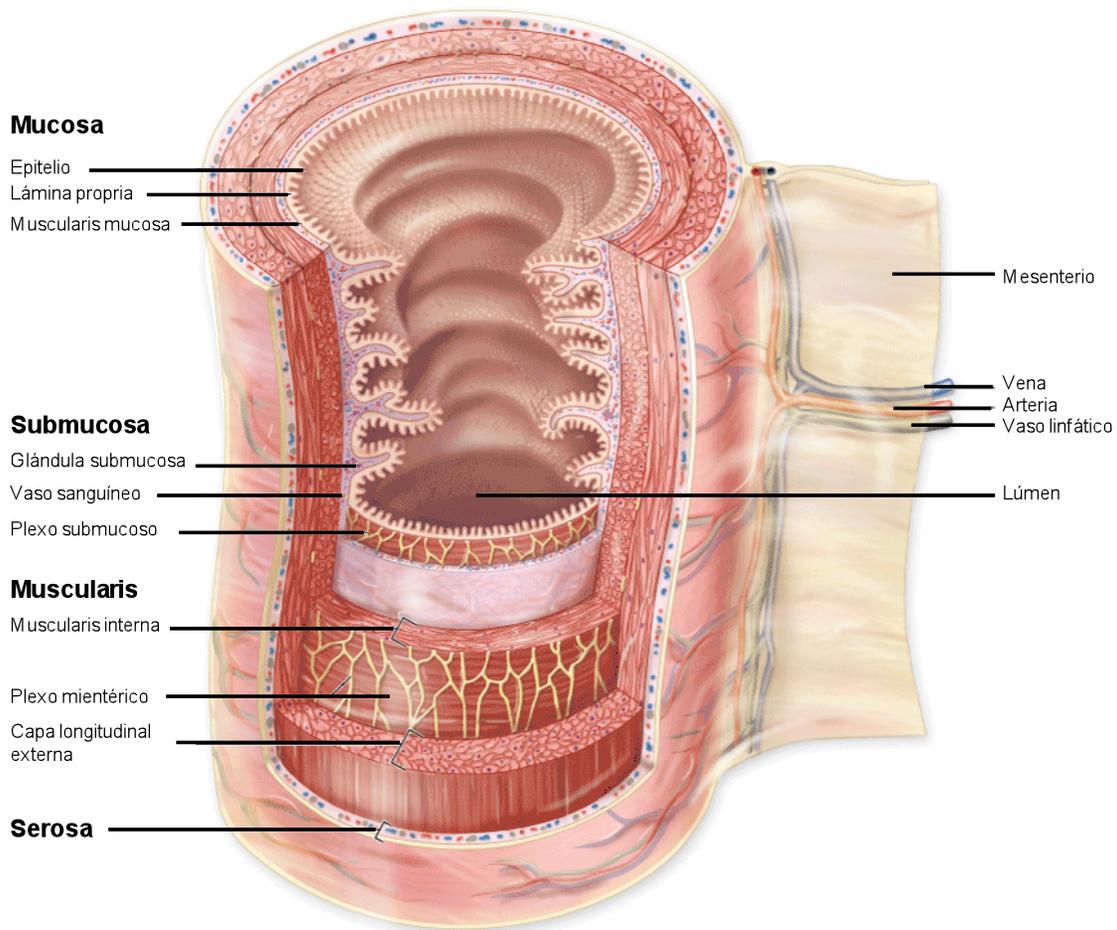


Figura 2. Capas principales y organización del tracto digestivo. Diagrama esquemático que muestra la estructura de una porción intestino delgado. Tomado de Goodman et al., (2011).

El SNE tiene componentes de los sistemas nerviosos simpático y parasimpático por medio de conexiones nerviosas sensoriales a través de ganglios espinales y nodosos. Las entradas pre-ganglionares parasimpáticas que inervan el tracto GI provienen de los nervios pélvicos y del vago. Las fibras preganglionares activan tanto a neuronas motoras excitatorias, como neuronas motoras inhibitorias que controlan procesos de contracción muscular y secreción/absorción (Goodman et al., 2011).

Existen neuronas aferentes primarias intrínsecas cuyos cuerpo celulares se encuentran en los ganglios entéricos y en los procesos que se extienden en la lámina propia de la mucosa, estas neuronas responden a estímulos químicos lumbinales, deformación mecánica de la mucosa y al estiramiento (Costa et al., 2000). Las terminaciones nerviosas de las neuronas aferentes primarias pueden ser activadas por numerosas sustancias endógenas, la más importante es la 5-hidroxitriptamina (5-HT), que es secretada por las células enterocromafines (Goodman et al., 2011).

La información proveniente de las fibras preganglionares aferentes a los ganglios entéricos es integrada y distribuida por una red de interneuronas, estas células proveen de vías ascendentes y descendentes que junto con el plexo entérico generan reflejos como contracción ascendente y relajación descendente en el tracto GI.

Las neuronas motoras inhibitorias también son abundantes en el tracto GI y regulan la motilidad y eventos importantes como la compliancia (expansión/contracción), gástrica la relajación de los esfínteres, y la relajación descendente durante la peristalsis intestinal. Las respuestas inhibitorias están

mediadas por al menos dos transmisores principales: el ATP o la β -nicotinamida adenina dinucleótido (β -NAD), que provocan la relajación a través de los receptores postsinápticos P2Y₁(Furness, 2000).

En general, las neuronas motoras no inervan directamente las células del músculo liso en el tracto GI si no que hacen sinapsis con las células intersticiales de Cajal (ICC), y éstas a su vez hacen conexiones eléctricas (gap junctions) con células del músculo liso (Ward, 2000).

Los arcos reflejos dentro del SNE son los encargados de la peristalsis. Fisiológicamente, la peristalsis consiste en una serie de respuestas reflejas al bolo alimenticio en la luz de un segmento del intestino. Los reflejos excitatorios ascendentes resultan en la contracción del músculo circular en el lado oral del bolo, mientras que los reflejos inhibitorios descendentes, provocan la relajación en dirección anal (Figura 3).

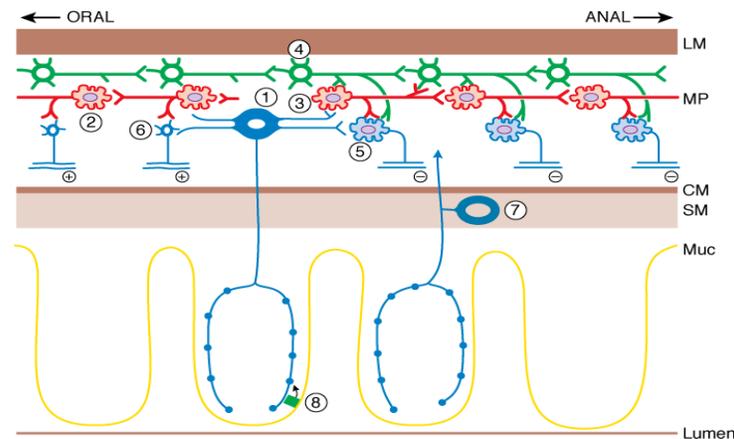


Figura. 3 Red neuronal que inician y generan la respuesta peristáltica. La estimulación de la mucosa promueve la liberación de serotonina por las células enterocrimafines (8), la cual excita las neuronas primarias aferentes intrínsecas (1) que a su vez se comunica con las interneuronas ascendentes (2) y descendentes (3) de las vías de reflejos locales. El estímulo resulta en la contracción de la terminal oral por medio de motoneuronas excitatorias (6) y relajación a través de motoneuronas (5). Interneuronas que transmiten el impulso eléctrico al músculo (4), otras aferentes primarias, cuyo cuerpo celular está en la submucosa (7). MP, plexo mientérico; CM, Músculo circular; LM, músculo longitudinal; SM, submucosa; Muc, mucosa. Tomado de Furness (2000)

2.3 Señalización del ATP en el SNE

Existe evidencia de que el ATP es liberado como neurotransmisor por neuronas entéricas. En los plexos mientérico y submucoso, el ATP activa receptores P2X y P2Y en neuronas motoras y sensoriales, así como en interneuronas. Estos receptores han sido implicados en neurotransmisión sináptica, neuro-modulación y actividades reflejas incluyendo, vías ascendentes excitatorias y vías descendentes inhibitorias. El ATP liberado por células epiteliales y de la mucosa durante la distensión, estimula receptores P2X de nervios sensoriales intrínsecos y extrínsecos que modulan la peristalsis y la sensación de dolor.

III. RECEPTORES P2X

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. Los cDNAs que codifican las variantes completas varían significativamente de tamaño, presentan de 11 a 13 exones y todos muestran una estructura común, con bordes intron/exón bien conservados. Las subunidades P2X tienen una longitud en aminoácidos de 384 (P2X₄) a 595 (P2X₇) con una identidad que va desde un 40 a un 55% (revisado por North, 2002). Cada subunidad muestra una estructura molecular similar que consiste en 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. Se sugiere que el asa extracelular 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). Los residuos del carboxilo terminal tienen un papel importante tanto en la desensibilización del canal, así como sitios de unión de proteínas de señalización intracelular (Khakh et al., 2000). 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).

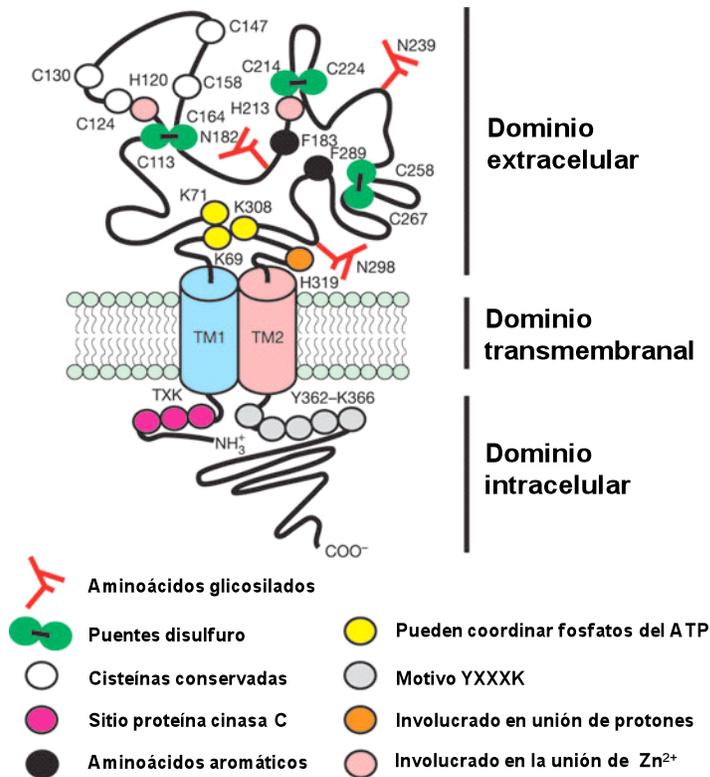


Figura. 4 Estructura de la subunidad P2X. Topología de la subunidad del receptor P2X en una vista hipotética, basada en estudios hechos con receptores P2X1 y P2X2

Tres moléculas de ATP se pueden unir a la porción extracelular de los receptores P2X. Experimentos de mutagénesis, demuestran que los residuos de lisinas conservadas cerca de las terminales extracelulares de los TM1 y TM2 pueden contribuir a la unión del ATP. Las glicinas conservadas en el TM2 de los P2X, siempre están seguidas por un residuo hidrofóbico y otro en la hélice, posiblemente estos residuos tengan la función de compuerta, ya que en estudios de mutagénesis se ha visto que el canal cambia su permeabilidad. Otros motivos probablemente están involucrados en: endocitosis, cambios de permeabilidad, unión a lipopolisacaridos e interacción con otras proteínas (North, 2002)

3.1 Propiedades farmacológicas de los receptores P2X en neuronas mientéricas de cobayo.

Mediante métodos electrofisiológicos, se caracterizaron al menos tres diferentes subtipos de receptores P2X en las neuronas mientéricas de cobayo, (Zhou and Galligan, 1996). Dos de ellas desensibilizan lentamente y solo una es activada por α,β -meATP pero solo está presente en una mínima porción del número total de receptores (Zhou and Galligan, 1996). Un tercer subtipo de receptor P2X es activado por ATP o por α,β -meATP, pero desensibiliza muy rápido y está presente un pequeño porcentaje de neuronas mientéricas (Barajas-Lopez et al., 1996a; Zhou and Galligan, 1996). El α,β -meATP es un agonista de los receptores P2X₁ y P2X₃ pero no activa al receptor P2X₂. Recientemente, también describimos que muchas de las propiedades farmacológicas de los receptores de las neuronas mientéricas de cobayo se asemejan las propiedades descritas para el receptor P2X₂ recombinante (Guerrero-Alba y Col; ANEXO 2). Por ejemplo, desensibilizan

lentamente (Figura 5), muestran la misma sensibilidad a ATP y ATP- γ -S pero son inactivos al α,β -meATP (Figura 6). Por otro lado, también encontramos que la suramina tiene dos efectos, potenciación e inhibición de las corrientes inducidas por ATP (Figura 7). Ambos efectos de suramina tienen diferente cinética de recuperación (Figura 8) y diferente dependencia de concentración (Figura 9), indicando que este efecto está mediado por al menos dos diferentes sitios de unión a suramina. Todo lo anterior indica que la población de receptores P2X mientéricos del cobayo son heterogéneos (Guerrero-Alba y Col).

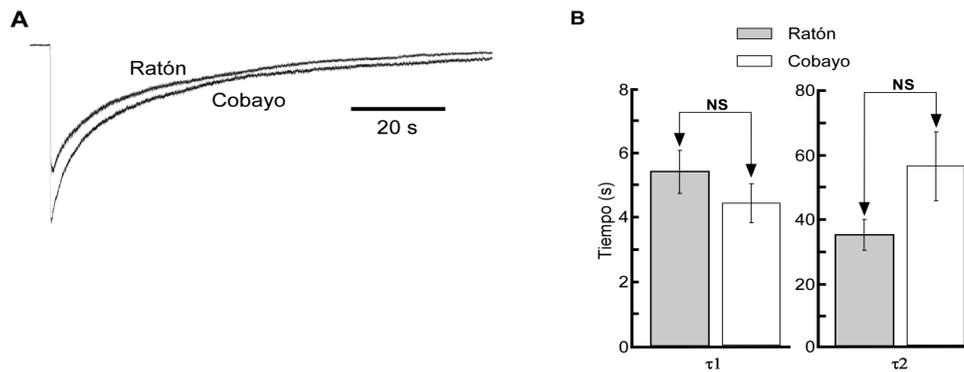


Figura 5. La cinética de desensibilización de las I_{ATP} en neuronas mientéricas de ratón y cobayo no son diferentes. A: Registros representativos de las corrientes inducidas por aplicaciones de larga duración (90 s) de ATP 1 mM de una neurona mientérica de ratón y cobayo. La cinética de desensibilización de las I_{ATP} para ambas especies se ajustó 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. (Guerrero-Alba y Col).

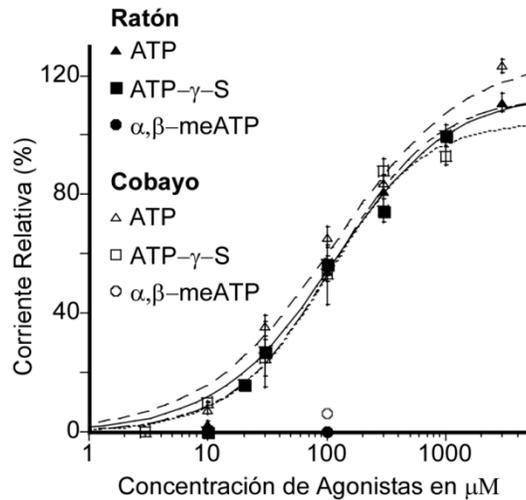


Figura 6. El orden de potencia de los agonistas para los P2XRs de neuronas mientéricas de ratón es similar que para los de cobayo. Curvas concentración-respuestas para ATP, ATP- γ -S y α,β -meATP. Los símbolos representan el valor promedio y las líneas verticales muestran los S.E.M. de datos obtenidos 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. (Guerrero-Alba y Col).

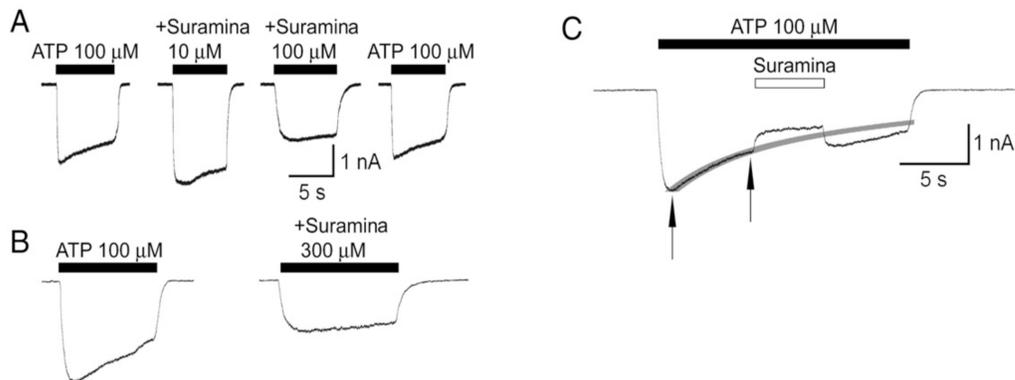


Figura 7. Suramina induce potenciación e inhibición en los receptores P2X mientérico de cobayo. (A) corrientes entrantes inducidas por ATP (I_{ATP}) en la misma célula de cobayo, antes (trazo izquierdo) durante dos concentraciones de Suramina y 5 minutos después de remover Suramina (trazo derecho). Suramina tiene un efecto inhibitorio sobre I_{ATP} durante la aplicación discreta (B) y secuencial (C) de ATP y Suramina. Sin embargo durante la aplicación secuencial de ATP y Suramina, se puede notar una potenciación transitoria justo después de la aplicación de Suramina, esto es demostrado por el sobrelapado de un trazo de la corriente esperada (indicada por una línea gris). La corriente esperada fue calculada buscando el mejor ajuste (una exponencial mas una constante) de los datos obtenidos entre las dos flechas de la corriente de desensibilización antes de la aplicación de Suramina. Las barras por encima de los trazos indican el tiempo de aplicación del ATP o Suramina o ambos. En A y B, Suramina fue preaplicada 15 segundos antes y después de la aplicación de ATP.

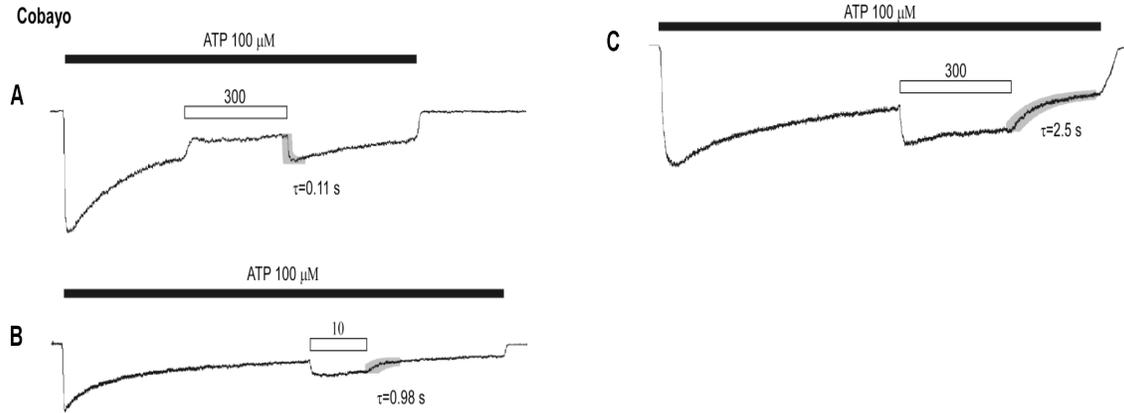


Figura 8. La inhibición y potenciación son mediadas por diferentes sitios de unión a suramina en los receptores P2X mientéricos de cobayo, como lo indican sus diferentes cinéticas. A – C: corrientes representativas en respuesta a aplicación secuencial de ATP 100 μ M en tres neuronas mientéricas de cobayo. Suramina inhibe las I_{ATP} en A y B pero potencia en B y C . El mejor ajuste para la recuperación de la inhibición y potenciación fue obtenido por una sola función exponencial (como lo indica la línea gris 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 agrego 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 (No se muestra).

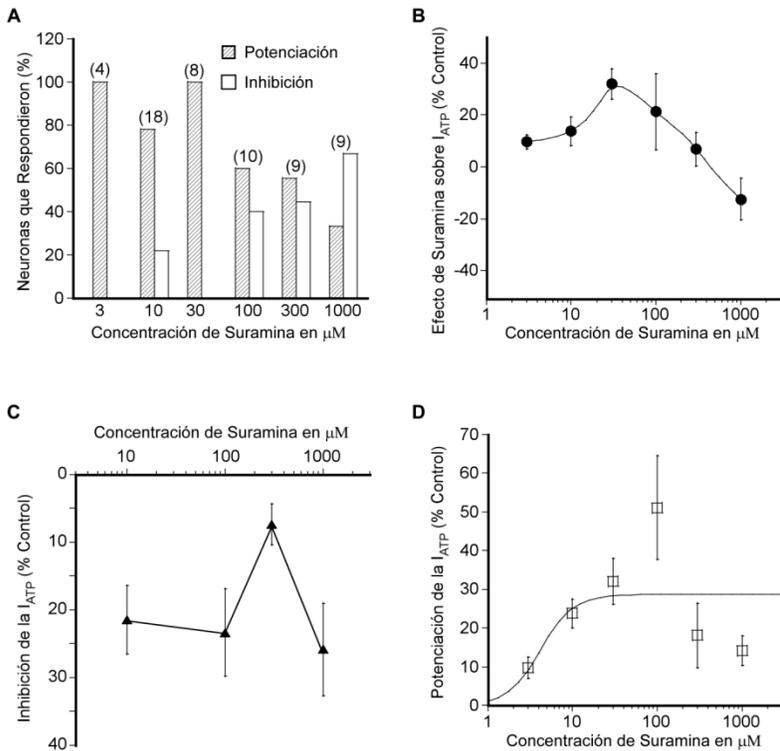


Figura 9. Suramina tiene efectos potenciador e inhibitorios sobre los receptores P2X de neuronas mientéricas de cobayo. A: Distribución de frecuencia del porcentaje de neuronas que mostraron inhibición y potenciación por suramina. A concentraciones $\leq 30 \mu$ M, suramina potencia las I_{ATP} en el 90% de las neuronas de cobayo. A concentraciones de 100 – 1000 μ 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 $\leq 30 \mu$ 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 ajustan a este modelo.

3.2 Receptor P2X₇

En cobayo, el gen de P2X₇ tiene un tamaño de 47.5 Kb, su marco abierto de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) mide 1,782 pb, consta de 13 exones separados por 13 intrones. P2X₇ es la subunidad con mayor número de aminoácidos comparado con las demás subunidades P2X. En ratón, rata y humano, tiene un total 595 aminoácidos, sin embargo, en cobayo la glutamina en la posición 77 está ausente, por lo que en esta especie el tamaño en aminoácidos de esta proteína es de 594. Tiene una homología con el P2X₇ de ratón, rata y humano de 70% (Fonfria, y Col 2008). Estructuralmente, es similar al resto de las subunidades P2X sólo que el dominio carboxilo terminal es mucho más largo, con 100 aminoácidos extra. Tiene baja afinidad por el ATP, el perfil de potencia de los agonistas es: 3'-O-(4-benzoyl) benzoic ATP (BzATP) >> ATP >> 2MeSATP > ATPgS > ADP, siendo el BzATP hasta 10 a 30 veces más potente que el ATP (en rata y humano) para inducir corrientes entrantes, (Revisado por Ralevic y Col., 1998). El receptor P2X₇ es antagonizado por el pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid (PPADS), y más selectivamente por el ATP oxidado (oATP), el derivado de isoquinolona KN-62, y Azul brillante G (BBG, por sus siglas en inglés Brilliant Blue G) que actúan como inhibidores no competitivos. (Chessell y Col., 1998).

El receptor P2X₇ bajo continua estimulación por ATP extracelular, resulta en la formación de un poro que facilita la entrada de cationes con peso molecular por encima de 900Da. Este receptor es expresado principalmente en células que median respuestas inmunitarias tales como, monocitos, macrófagos, microglia,

células dendríticas y linfocitos T y B, en donde tras la activación por ATP modulan múltiples funciones como la liberación y maduración de interleucinas (IL), IL-1 β e IL-18 y también regula eventos de fusión de membrana y apoptosis. En estudios hechos con ratones deficientes del receptor P2X₇ se ha encontrado que se suprime la habilidad del ATP extracelular para inducir la liberación de IL-1 β de macrófagos aislados (Solle y Col., 2001). Algunos estudios en estos ratones revelan que P2X₇ tiene un rol importante en enfermedades auto-inmunes como artritis reumatoides, donde la ausencia del receptor le confiere protección contra los síntomas, cuadro clínico y la destrucción del cartílago. (Labasi y Col., 2002). Por otra parte, la expresión y función alterada del receptor P2X₇ está altamente relacionada con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

En células gliales e inmunes, se ha visto que la activación por altas dosis de ATP provoca entradas importantes de Ca²⁺ extracelular así como la salida de K⁺ intracelular. Además, el receptor P2X₇ conduce a la activación de señales intracelulares como son las vías: ERK, p38, p44/42, c-Jun y NF- κ B. En neuronas del SNC y SNP, se ha encontrado la presencia del receptor P2X₇ en terminales presinápticas donde parece tener un papel importante en la modulación de la liberación de neurotransmisores, incluyendo los neurotransmisores ácido γ -aminobutírico y glutamato, sin embargo el papel de este receptor en neuronas permanece bajo estudio. Revisado por (Takenouchi y Col., 2010).

En el SNE, también se ha descrito inmunoreactividad abundante para la subunidad del receptor P2X₇ a lo largo de fibras nerviosas que atraviesan ganglios y en áreas que rodean los cuerpos neuronales del íleon (Figura 10) (Hu y Col. 2001). Sin embargo la presencia de inmunoreactividad para la pseudo proteína

P2X₇ presente en ratones knockout para el gen P2X₇ deja en duda la presencia del receptor P2X₇ limitado a neuronas. (Anderson & Nedergaard, 200

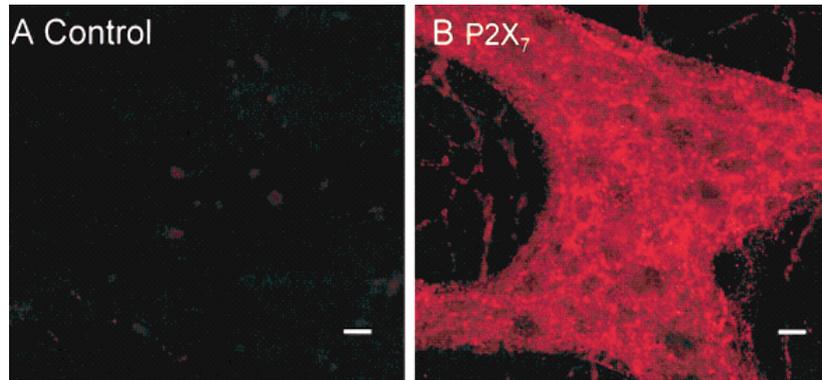


Figura 10. Localización del receptor P2X₇ el plexo mientérico de ileon de cobayo. La inmunoreactividad para receptor P2X₇ está marcada con rojo Cy3. A: Control pre-tratado con inmunógeno del receptor P2X₇; B: Inmunoreactividad del receptor P2X₇ (tomada de Hu y Col. 2001).

Se ha propuesto, que los canales P2X₇ contribuyen en las corrientes inducidas por ATP (I_{ATP}) en las neuronas mientéricas de cobayo (Hu y Col., 2001). Sin embargo los datos farmacológicos y electrofisiológicos reportados por Hu y Col. (2001) ha sido cuestionado por Galligan y North (2004) dejando una clara controversia respecto a las propiedades farmacológicas de los receptores P2X₇ recombinantes de cobayo. Hu y Col. (2001), utilizaron concentraciones de ATP $\leq 100 \mu\text{M}$ para caracterizar el efecto de varios antagonistas del receptor P2X₇, pero esta concentración de ATP no es suficiente para activar receptores recombinantes P2X₇ de cobayo (Fonfria, y Col 2008). Además ellos asumieron que el BzATP es un agonista específico para los receptores P2X₇ a pesar de que este agonista es inactivo en receptores recombinantes P2X₇ (Fonfria, y Col 2008).

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ha sido propuesto, que los canales P2X₇ contribuyen a las corrientes inducidas por ATP (I_{ATP}) en las neuronas mientéricas de cobayo (Hu y Col., 2001). Sin embargo los datos farmacológicos y electrofisiológicos previamente reportados han sido cuestionados por otros investigadores. Dicha controversia se incrementa si uno considera las propiedades farmacológicas de los receptores recombinantes P2X₇ de cobayo y las compara con las propiedades de los receptores P2X₇ mientéricos nativos. Como parte de nuestro esfuerzo para entender las propiedades nativas de los receptores P2X de las neuronas mientéricas de cobayo nosotros re-examinamos la posibilidad de que los receptores P2X₇ pudieran contribuir a las I_{ATP} .

V. HIPOTESIS

El receptor P2X₇ contribuye a la corriente inducida por ATP en neuronas mientéricas de cobayo.

VI. OBJETIVOS

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

Detectar el transcrito de la subunidad P2X₇ en neuronas mientéricas mediante la técnica de RT-PCR en célula única.

VII. MATERIALES Y METODOS

7.1. Preparación del cultivo neuronal primario

Cobayos (80 – 150 g) de cualquier sexo, fueron sacrificados por dislocación cervical y sangrados de la arteria carótida. Estos métodos han sido aprobados por el Comité de Cuidado de Animales del IPICYT, y están de acuerdo con los Principios Rectores publicados en el Cuidado y Uso de Animales, aprobada por la Sociedad Americana de Fisiología. 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 y 5% CO₂). La capa mucosa y submucosa de este segmento de intestino fueron disecadas y se removió la mayoría del músculo circular, quedando el plexo mientérico embebido en el músculo longitudinal.

El plexo mientérico fue disociado usando un tratamiento secuencial con dos soluciones enzimáticas, descrito por (Barajas-López y *Col.*, 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 colágena estéril de cola de rata. El medio de cultivo D-MEM contenía 97.5% de medio mínimo esencial, 2.5% de suero de cobayo, 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. Todos los experimentos se llevaron a

cabo durante los dos días consecutivos de la disociación para evitar problemas de fijación del voltaje debido al crecimiento de neuritas.

7.2. Registros de Patch Clamp

Se conoce que el ATP modula canales de potasio en la membrana de neuronas entéricas vía receptores unidos a proteínas G (Christofi y *Col.*, 1997; Barajas-Lopez y *Col.*, 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 y *Col.*, 1991). Esta configuración se logra después de obtener un Giga-sello 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 succión para romper la membrana que separa al citoplasma del interior de la pipeta, logrando así continuidad entre los componentes (configuración de célula completa). Esto nos ayuda a evaluar los cambios iónicos que nos generan las corrientes que registramos.

Las corrientes inducidas por ATP (I_{ATP}) fueron registradas con los amplificadores Axopatch 1D o Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Todos los registros se llevaron a cabo a temperatura ambiente (22-23°C). 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 $\text{M}\Omega$), el error de voltaje debido a la resistencia en serie fue inferior a 10 mV, y por lo tanto, no se realizó ninguna compensación. Durante los registros de célula completa, el potencial de membrana se fijo a -60 mV a menos que se indique lo contrario.

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 y GTPNa, 0.1; se ajustó el pH a 7.3 – 7.4 con CsOH. La solución externa (en mM): NaCl, 160; CaCl_2 , 2; glucosa, 11; HEPES, 5 y 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 μM , se reajustó el pH con NaOH. Las corrientes de célula completa fueron registradas en una PC usando los programas AXOTAPE y AxoScope 9 (Axon Instruments) y analizadas con los programas Clampfit 10.0 y Axograph X1.1 (Axon Instruments). La cámara de registro fue continuamente perfundida con solución externa a una velocidad de 2 ml/min aproximadamente. 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 al 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 sustancias experimentales fueron removidas por el regreso a la solución control. La solución externa fue liberada por gravedad y el nivel de las jeringas fue ajustado continuamente para minimizar los cambios en la velocidad de flujo. Los agonistas y antagonistas se aplicaron como se describió en el párrafo anterior.

En algunos experimentos, utilizamos una rampa de voltaje, la cual consiste en dar un salto de voltaje de -60 a 70 mV durante 400 ms, para inactivar las corrientes transitorias, seguido de una rampa de voltaje de 1100 ms que va de +70 a 110 mV. Las corrientes de membrana registradas durante esta rampa de voltaje fueron registradas antes (control) y en presencia de ATP. Las corrientes del control fueron entonces sustraídas de aquellas registradas en presencia de ATP o BzATP, con el fin de obtener solo las corrientes inducidas por el agonista. Los valores de las I_{ATP} se graficaron contra el potencial de membrana para construir las curvas corriente-voltaje (I/V) que se muestran en este estudio. Las corrientes de célula completa fueron registradas en una PC usando el programa CLAMPEX 6 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) y analizadas con el programa AXOGRAPH 4.9 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Los experimentos de rampas de voltaje se llevaron a cabo en presencia de 30 mM de tetraetilamonio (TEA) y 30 μ M de Cd^{2+} para bloquear la mayoría de las corrientes debidas a potasio y calcio activadas por voltaje.

7.3. RT-PCR de célula única

Utilizamos neuronas mientéricas únicas de cultivos primarios de cobayo. Cada neurona se cosechó bajo control visual con un microscopio (Eclipse TE200U,

Nikon) y mediante la aplicación de una ligera succión la neurona se depositó dentro de una pipeta de registro que contenía 6 μ l de buffer RT libre de RNAsas (20 U de inhibidor de RNAsa, 2.3 μ M de oligo (dT), 150 mM de dNTPs, 1.2 mM de DTT and 10X buffer RT SuperScript III first strand; Invitrogen). El contenido de la pipeta fue expulsado en un tubo de PCR que contenía 12 μ l de buffer RT libre de RNAsas y 0.5 μ l de NP40 1% para permitir la solubilización de la membrana celular. La reacción fue incubada a 65°C durante 1 min. Después se le agregó 0.5 μ l de SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) y se incubó a 37°C durante 15 min. La reacción se inactivó por calentamiento a 70°C durante 10 min y se colocó en hielo. Los controles negativos se realizaron sin templado; no se obtuvieron amplificaciones falsas.

Para detectar la expresión del ARNm de los receptores P2X₂ (control de la reacción) y P2X₇ en cada neurona mientérica se llevó a cabo un PCR anidado. Los siguientes oligos fueron utilizados; para el primer PCR de P2X₂ se usó el par de oligos; P2X₂ sentido 5'-CAG CCC GAG AGC AGG GTT CT-3' y P2X₂ antisentido 5'-GGA CTT CGC TCC TCA GAA CTC AG-3'. Para el PCR anidado de P2X₂ se utilizó 1 μ l de una dilución 1:10 del primer PCR y oligos adicionales fueron diseñados; P2X₂ anidado sentido 5'-TTCACAGAGCTGGCACACAG-3' y P2X₂ anidado antisentido 5'-ATGGTGGGAATCAGGCTGAA-3' produciendo un fragmento de 280 pb. El primer PCR de P2X₇ se llevo a cabo utilizando el siguiente par de oligos; P2X₇ sentido 5'-ATGCCAGGCTGCTCCTGCTG-3' y P2X₇ antisentido 5'- TCAGTAGGGACACCTGAAGCCAC-3'. Para el PCR anidado de P2X₇ se utilizo 1 μ l de una dilución 1:10 del primer PCR de P2X₇ y se utilizo un par de oligos anidados; P2X₇ anidado sentido 5'-GTCCGCTTTGACATCCTGGTGTTTC-

3' y P2X₇ anidado antisentido 5'-TCAGTAGGGACACCTGAAGCCAC-3', el producto amplificado fue de 845 pb.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador 2720 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA. USA) usando 500 U de GoTaq®Flexi DNA polimerasa (Promega, Madison, WI). El DNA genómico, controles negativos y positivos se incluyeron en cada reacción de PCR. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un ciclo de 94°C (5 min), seguido por 33 ciclos a 94°C (15 s), 63°C (60°C para el PCR anidado, 15 s) y 72°C (1 min 45 s para el primer PCR de P2X₂ o 1 min para el PCR anidado de P2X₇), y una extensión final a 72°C (5 min). Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio al 1%. Para verificar la identidad del producto amplificado se mando a secuenciar al servicio de secuenciación MCLAB DNA (San Francisco City, CA).

7.4. Fármacos y soluciones utilizadas

Medio L15, MEM, Solución Hanks, penicilina-estreptomina y L-glutamina fueron comprados en GIBCO, las enzimas colagenasa tipo I y la papaína fueron obtenidas de Worthington. La dispasa fue adquirida de Roche. A4338079 de TOCRIS, Bioscience. Las siguientes sustancias fueron adquiridas en Sigma: L-cisteína, ATP, α,β -meATP, ATP- γ -S, suramina, PPADS, CsCl, EGTA, HEPES, NaCl, ATPMg, GTPNa, CaCl₂, glucosa, CsOH, NaOH, NaH₂PO₄, MgCl₂, KCl, NaHCO₃. Azul brillante G, BzATP, ATP oxidado, KN-62.

Las soluciones stock (0.01 – 1 M) de ATP y otros fármacos se prepararon usando agua destilada y se almacenaron a -20°C. Excepto para la solución stock de KN62, la cual fue disuelta en Dimetilsulfoxido (DMSO) a una concentración final

de 0.1% v/v. Todos los fármacos fueron diluidos en solución extracelular a la concentración requerida para su aplicación.

7.5. Análisis de datos

Para normalizar las I_{ATP} , la corriente obtenida con ATP 1 mM fue considerada como el 100%, en cada célula, a menos que otra cosa se mencione. Los resultados fueron expresados en promedio \pm el error estándar de la media (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 prueba de t -Student adecuada para encontrar diferencias entre los valores promedio. El número de células usadas se representa como n y los datos de las curvas concentración-respuesta se ajustaron a una función logística, como lo describió (Kenakin, 1993).

VIII. RESULTADOS

8.1. La curva concentración-respuesta de ATP en neuronas mientéricas de cobayo es bifásica.

La aplicación rápida de ATP produjo corrientes entrantes (I_{ATP}) a un potencial de membrana de -60 mV en la mayoría de las neuronas mientéricas de cobayo analizadas en 158 de las 160 neuronas analizadas, que se sabe involucra la activación de los receptores P2X (Barajas-Lopez y Col., 1996a; Zhou and Galligan, 1996). A menos que otra cosa se mencione, el ATP se aplicó durante 5-10 s en intervalos de 5 min. Se utilizó un rango de concentraciones de ATP relativamente amplio (0.01-10 mM) y al hacer esto notamos dos fases en la curva concentración-respuesta de las neuronas mientéricas de cobayo, lo cual indica la presencia de al menos dos poblaciones diferentes de receptores P2X en estas neuronas. La primera fase fue mediada por los receptores P2X de alta sensibilidad (receptores hsP2X) que fueron activados a concentraciones de ATP entre 0.01-0.3 mM y la segunda mediada por los receptores P2X de baja sensibilidad (receptores lsP2X) activados en el rango de 0.3-10 mM de ATP.

Los datos de cada fase se ajustaron muy bien a un modelo logístico como se muestra en la figura 11. La primera fase generó un valor EC_{50} de $38 \pm 10 \mu\text{M}$, con un coeficiente de Hill de 1.5 ± 0.4 , y una respuesta máxima estimada de 86%, muy similar a la respuesta promedio obtenida con ATP 0.3 mM (84%). La segunda fase tuvo un valor EC_{50} de $1759 \pm 589 \mu\text{M}$, un coeficiente de Hill de 2 ± 1 , y una respuesta máxima estimada de 146%, muy similar a la respuesta promedio

obtenida con 5-10 mM de ATP (144%). Asumiendo que la mayoría de los receptores hsP2X son activados con concentraciones de ATP de 5-10 mM, la contribución de los receptores lsP2X activados sería de un 40% de la corriente inducida con 5-10 mM de ATP y el resto de la corriente (60%) sería atribuida a los receptores hsP2X. Usando un criterio similar, la contribución de los receptores lsP2X parece ser diferente entre las neuronas mientéricas. De este modo, en 3 de 11 neuronas individuales, hubo una contribución relativa promedio de $24 \pm 2\%$, mientras que la contribución de las otras 8 neuronas fue de $40 \pm 5\%$.

8.2. Las I_{ATP} de alta sensibilidad muestran una mayor rectificación entrante que las corrientes de baja sensibilidad.

Es probable que los receptores lsP2X estén conformados por subunidades P2X₇, ya que es el único receptor que se conoce que tiene baja sensibilidad por el ATP (Fonfria y Col., 2008; North, 2002). Con el fin de investigar más a fondo esta posibilidad, construimos curvas corriente-voltaje (I/V) usando un protocolo de rampas, aplicando 0.03 o 5 mM de ATP ($n=6$). Los valores promedios de estas curvas I/V se representan en la figura 12 y se observó la presencia de una fuerte rectificación entrante para los receptores hsP2X y una menor rectificación cuando los receptores lsP2X son activados. Medimos el grado de rectificación calculando la proporción entre la pendiente de la conductancia entre 30 y 60 mV sobre la pendiente de entre -30 mV y -60mV ($n=6$).

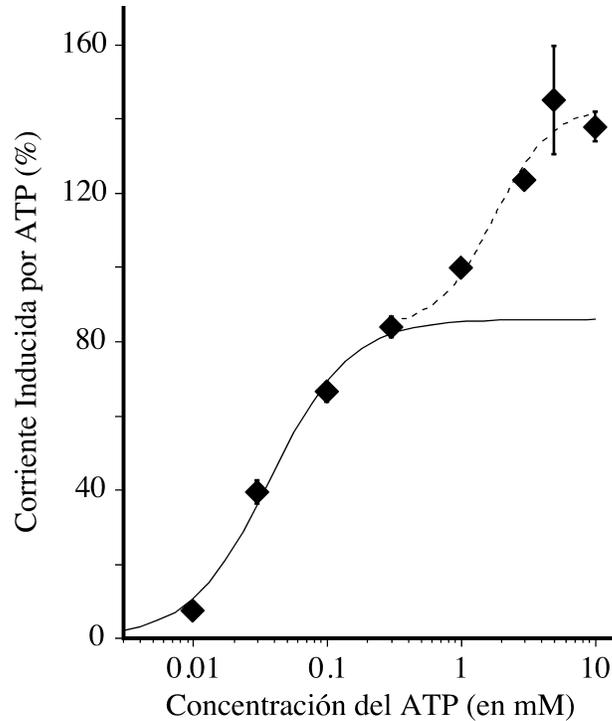


Figura 11. Se aprecian dos fases en la curva concentración respuesta de ATP en neuronas mientéricas de cobayo. El pico de amplitud (como porcentaje de la corriente inducida por ATP 1 mM) de la I_{ATP} se graficó contra la concentración de ATP. Análisis a ojo de estos datos indican un punto de inflexión entre 0.3 y 1 mM de ATP. De hecho, las respuestas obtenidas entre el rango de 0.01-0.3 mM (línea continua) y entre 0.3-10 mM de ATP (línea punteada) se fijan muy bien a dos curvas logísticas. Por lo tanto, nombramos a las corrientes de la primera fase como I_{ATP} de alta sensibilidad y a las de la segunda fase como I_{ATP} de baja sensibilidad. Los símbolos representan los promedios y las líneas verticales son los errores estándar de las medias (S.E.M.) de las corrientes relativas de 3 a 15 neuronas. Las diferentes concentraciones de ATP se aplicaron durante 5-10 s en intervalos de 5 min. Las curvas sigmoideas son el mejor ajuste obtenido con una función logística de tres parámetros. El ajuste para las I_{ATP} de baja sensibilidad fue hecha substrayendo la corriente promedio obtenida con 0.3 mM de ATP a aquellas corrientes registradas en respuesta a 0.3-10 mM de ATP. Después del ajuste de la misma corriente sustraída fue añadida y graficada. La presunción de que por encima de 0.3 mM se activa una corriente diferente fue fuertemente apoyada por el hecho de que el ajuste de las corrientes obtenidas con concentraciones ≤ 0.3 mM produce una respuesta máxima estimada del 86% muy similar a la respuesta experimental obtenida con 0.3 mM (84%).

Esta proporción de la conductancia tuvo un valor promedio de 0.18 ± 0.08 para los receptores hsP2X y 0.65 ± 0.08 para los receptores lsP2X. La diferencia entre estos valores fue estadísticamente significativa ($P < 0.05$). La relación I/V no fue totalmente lineal cuando los receptores lsP2X fueron estimulados con concentraciones máximas (5 mM de ATP), probablemente debido a que los

receptores hsP2X contribuyen fuertemente a las corrientes registradas con 5 mM de ATP, como lo indica la curva concentración respuesta.

8.3. Caracterización del efecto de varios inhibidores de los receptores P2X₇ sobre los receptores hsP2X y lsP2X.

Encontramos que el azul brillante G (BBG, 0.3 μ M) inhibió específicamente los receptores lsP2X ($14.5 \pm 4.5\%$; $n=7$; $P<0.05$), sin afectar los receptores hsP2X ($n=4$; Figura 13). Se sabe que a concentraciones nanomolares de BBG es específico sobre los receptores P2X₇ (Jiang y Col., 2000), lo que sugiere que los receptores lsP2X están formados por subunidades P2X₇. En tres de estas siete neuronas, BBG indujo solamente una inhibición marginal ($2.4 \pm 1\%$) de las corrientes inducidas por ATP 1 mM, mientras que en las otras cuatro neuronas el efecto inhibitorio fue mucho mayor ($23.6 \pm 2.3\%$), lo que sugiere que los receptores lsP2X están presentes en diferentes densidades entre las neuronas mientéricas.

Se sabe que el ATP oxidado inhibe los receptores P2X₇ y se ha reportado que su efecto es difícil de lavar (Michel y Col., 2000). En nuestras manos, una concentración de 0.3 μ M de este antagonista inhibió, de manera reversible y con igual magnitud (50%), las corrientes inducidas por 0.1 y 1 mM de ATP (Figura 13, $P\leq 0.001$), lo que indica que el ATP oxidado actúa sobre los receptores hsP2X.

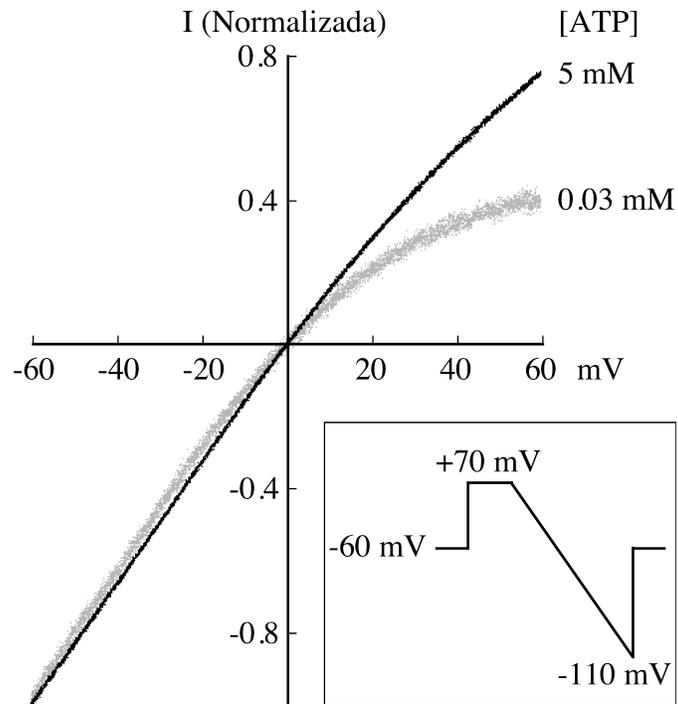


Figura 12. Una fuerte rectificación entrante se ve para las corrientes de alta sensibilidad que para las de baja sensibilidad. Curva corriente-voltaje obtenida en presencia de dos diferentes concentraciones de ATP, en la mismas neuronas mientéricas ($n=6$). El ATP se aplicó durante ~2 s cada 5 min. Los valores de las I_{ATP} se normalizaron con respecto a su amplitud observada a -60 mV para cada neurona y para cada concentración. Las I_{ATP} se registraron utilizando un protocolo de rampa de voltaje, como se describe en la sección de métodos

Debido a que los receptores hsP2X muy probablemente contribuyen a la mayor parte de la corriente inducida por ATP 1 mM (~86%), no podemos estar seguros de si el ATP oxidado también esté bloqueando a los receptores IsP2X.

Observamos efectos inhibitorios similares (~15%) con el A-438079 (0.3 μ M; Fig. 13; $P \leq 0.05$), otro conocido antagonista de los receptores P2X₇ (Nelson y Col., 2006). Estas observaciones muestran que el ATP oxidado y el A-438079, inhiben a los receptores hsP2X pero no estamos seguros de su efecto sobre los receptores IsP2X.

1-[N, O-bis (1,5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-1-tyrosyl]-4-piperazine (KN-62) solamente inhibió ligeramente la corriente inducida por 0.1 y 1 mM de ATP (Figura

13). Sin embargo, esta inhibición no fue diferente de la inducida por DMSO (el disolvente usado; 0.1%), lo que indica que KN-62 no afecta a los receptores hsP2X ni a los lsP2X. También se ha encontrado que KN-62 es inactivo sobre los receptores P2X₇ de rata (Hibell y Col., 2001; Humphreys y Col., 1998).

8.4. BzATP es un agonista parcial de los receptores hsP2X y es inactivo sobre los receptores lsP2X

El 2'-3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP (BzATP) es un agonista que tiene una afinidad de 10-30 veces mayor que el ATP por el receptor P2X₇ de humano (revisado por Anderson and Nedergaard, 2006) pero es inactivo sobre los receptores P2X₇ de cobayo (Fonfria y Col., 2008). En el presente estudio, BzATP (0.01 – 1 mM) evocó una corriente entrante (I_{BzATP}) en 45 de las 47 neuronas mientéricas de cobayo tratadas, esta respuesta fue dependiente de la concentración y al parecer es monofásica (Figura 14A y 14B), siendo su valor EC₅₀ de $142 \pm 21 \mu\text{M}$, un coeficiente de Hill de 1.39 ± 0.2 y una respuesta máxima estimada de $48 \pm 3 \%$ de la amplitud de la corriente inducida por ATP 1 mM. Si la I_{BzATP} es mediada por los receptores P2X₇ lo que esperamos es que esta corriente fuera aditiva a la corriente inducida por ATP mediada por los receptores hsP2X. Sin embargo, encontramos que estas corrientes no fueron aditivas, por lo contrario, el BzATP (0.1 mM) inhibió un $20 \pm 7 \%$ las corrientes inducidas por 0.1 mM de ATP (n=6; P<0.05; Figura 15). Además, la relación I/V para las I_{BzATP} revela una fuerte rectificación entrante con una proporción de conductancia de 0.05 ± 0.04 (Figura 11A; n=3), el BBG (0.3 μM) no afectó las I_{BzATP} , mientras que el ATP oxidado las inhibió (Fig 16B; P<0.05) y el KN-62 afectó las I_{BzATP} al igual que su disolvente, DMSO (Figura 16B).

Por último, el BBG a concentraciones $\geq 1 \mu\text{M}$ inhibió las I_{BzATP} , así como las I_{ATP} 20 μM mediadas por los receptores hsP2X (Figura 16C). Para ambas corrientes, esta inhibición fue dependiente de la concentración, con un valor IC_{50} de $2.7 \pm 0.04 \mu\text{M}$ y un coeficiente de Hill de 1.4 ± 0.03 para la I_{ATP} mediada por los receptores hsP2X , y un valor IC_{50} de $7.1 \pm 1.0 \mu\text{M}$ y un coeficiente de Hill de 1.3 ± 0.2 para la I_{BzATP} . En conjunto, estos experimentos indican que el BzATP es un agonista parcial de los receptores hsP2X pero es inactivo sobre los receptores lsP2X .

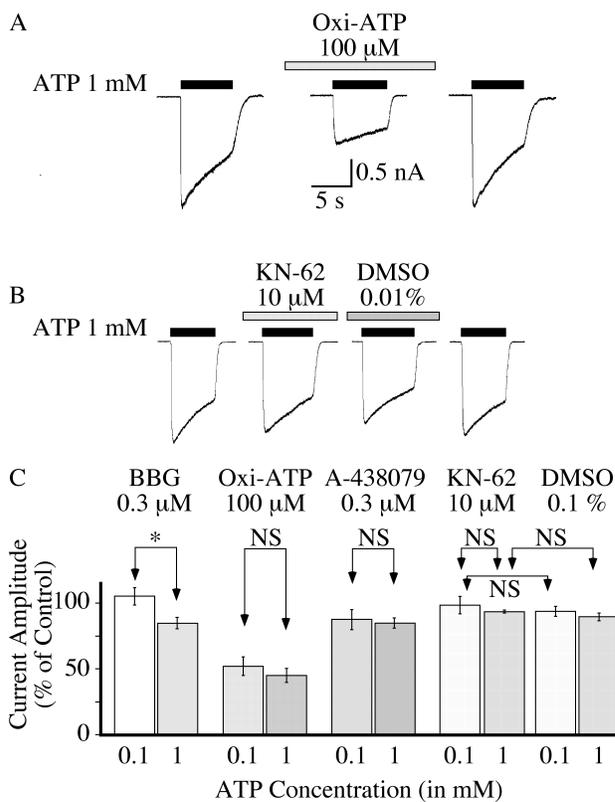


Figure 13. El BBG (0.3 μM) es el único antagonista que inhibió los receptores P2X de baja sensibilidad sin afectar los de alta sensibilidad. A, Corrientes de célula-completa de una neurona mientérica mostrando los efectos inhibitorios del ATP oxidado (OxiATP; registro central), efectos que son reversibles 5 min después de retirar este inhibidor (registro a la derecha). B, Corrientes de célula-completa de otra neurona mientérica mostrando que el KN-62 o solo su solvente (DMSO) inhibieron ligeramente las corrientes. Por lo que se concluye que el KN-62, por sí mismo, no afecta las corrientes inducidas por el ATP (I_{ATP}). C, Amplitud de las corrientes, como porcentaje de la I_{ATP} control, inducidas por una concentración baja y otra alta de ATP en la presencia de varios antagonistas de los receptores P2X: 0.3 μM BBG ($n = 4-7$), 100 μM ATP oxidado ($n = 6$), 0.3 μM A-438079 ($n = 4$), 10 μM KN-62 ($n = 5-9$) y 0.1% DMSO ($n = 5-9$). El ATP fue aplicado durante 5 s, cada 5 min. Todos los antagonistas fueron aplicados 2 min antes del ATP, excepto para el ATP oxidado, para el que se aplicó 30 min antes. El KN-62 fue

disuelto en DMSO y la concentración final del DMSO en la solución externa fue de 0.1% V/V. La barras y las líneas sobre ellas representan el promedio y el E.S.M; * representa un valor de $P < 0.05$; NS=Diferencias no significativas (se utilizó la prueba no pareada de t Student's).

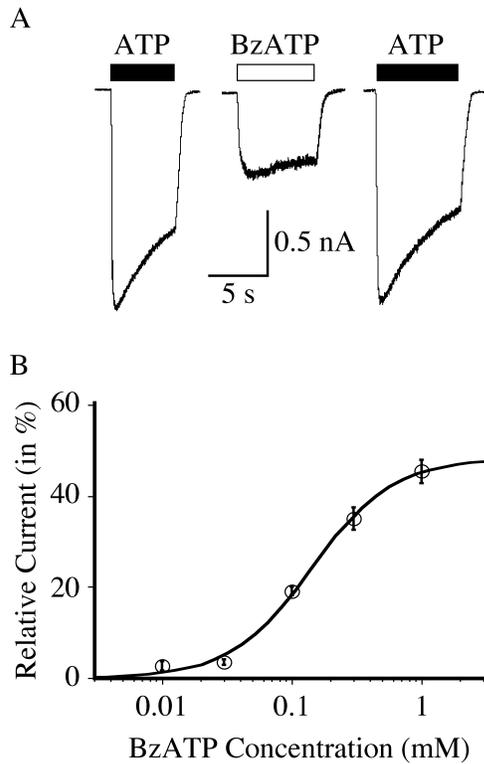


Figura 14. BzATP activa los receptores P2X mientéricos con aproximadamente la mitad de la eficiencia de ATP 1 mM. (A) Registros representativos de las corrientes entrantes inducidas por ATP 1 mM o BzATP 1mM en la misma neurona mientérica. Las barras horizontales arriba de los registros indican la aplicación del agonista. Los agonistas fueron aplicados durante 5-10 s en intervalos de 5 min. El potencial de membrana fue fijado en -60 mV. (B) Curva concentración-respuesta para BzATP en neuronas mientéricas de cobayo. Los símbolos representan los promedios y las líneas verticales son el S.E.M. de las corrientes relativas de 5 a 25 neuronas. BzATP fue aplicado durante ~5 s cada 5 min a diferentes concentraciones. Las respuestas inducidas por las diferentes concentraciones de BzATP fueron normalizadas con respecto a aquellas observadas con ATP 1 mM en cada célula. La curva sigmoidea es el mejor ajuste obtenido con una función logística de tres parámetros, siendo el valor EC_{50} de 142 μ M.

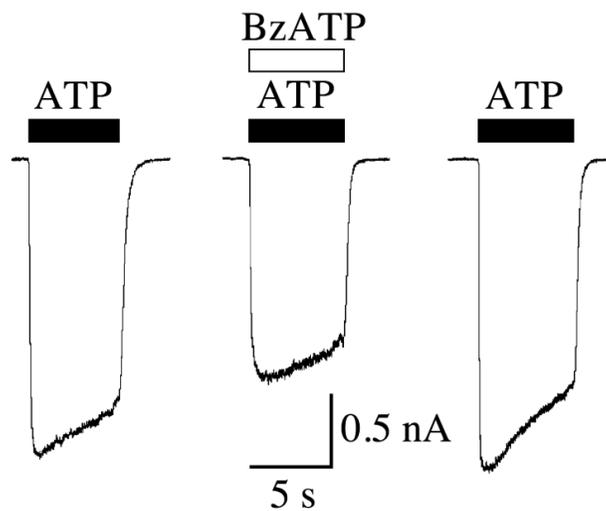


Figura 15. BzATP inhibió las corrientes inducidas por bajas concentraciones de ATP lo que sugiere que es un agonista parcial de los receptores P2X. Corrientes de célula completa inducidas por ATP (1 mM) antes, en presencia de BzATP (0.1 mM) y 5 min después de lavar el BzATP. BzATP inhibe la acción del ATP cuando se aplicaron de forma concomitante ($n = 7$). Las corrientes se obtuvieron de la misma neurona mientérica a un potencial de membrana de -60 mV.

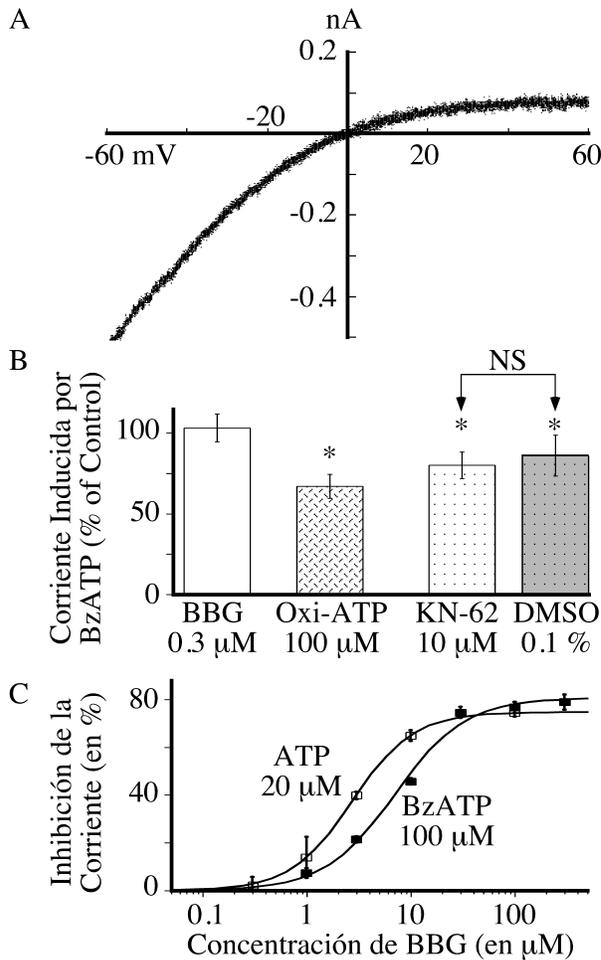


Figura 16. Los receptores P2X activados por BzATP muestran las mismas propiedades que las activadas por bajas concentraciones de ATP. (A) Curva corrientes-voltaje (I/V) de las respuestas inducidas por BzATP 100 μ M de tres neuronas mientéricas. La curva I/V reveló una fuerte rectificación entrante. Las corrientes fueron registradas usando el protocolo de rampas de voltaje como se describe en métodos. (B) Las barras y las líneas en la parte superior de éstas representan el promedio y el S.E.M. del porcentaje de la amplitud de la corriente inducida por 0.1 mM de BzATP en presencia de varios inhibidores: BBG 0.3 μ M ($n = 6$; no fue estadísticamente diferente de su control), ATP oxidado 100 μ M ($n = 4$; $P < 0.05$), KN-62 10 μ M ($n = 5$; $P < 0.05$) and 0.1 % DMSO ($n = 5$; $P < 0.05$). Todos los antagonistas fueron aplicados 2 min antes de la aplicación de BzATP, excepto el ATP oxidado, el cual fue aplicado 30 min antes del agonista. La I_{BzATP} fue inhibida por ATP oxidado pero no fue por BBG (0.3 μ M). El efecto de KN-62 y su disolvente, DMSO, fue prácticamente el mismo, lo cual indica que el KN-62 no tiene efecto por sí mismo. El * indica una $P < 0.05$. (C) Las concentraciones de BBG ≥ 1 μ M inhibieron las I_{BzATP} y I_{ATP} de alta sensibilidad de una manera dependiente de la concentración. Curvas concentración-respuesta para el efecto inhibitorio de BBG

(0.3-300 μ M) sobre las corrientes inducidas por 20 μ M ATP y 100 μ M BzATP. Los datos se ajustaron bien a una función logística de tres parámetros y los valores IC_{50} obtenidos fueron 2.7 ± 0.04 μ M (con un coeficiente de Hill de 1.4 ± 0.03) para el ATP y 7.1 ± 1.0 μ M (con un coeficiente de Hill de 1.3 ± 0.2) para BzATP. Cada punto representa los valores del promedio \pm S.E.M. de 3-7 neuronas.

8.5. Detección del ARNm del receptor P2X₇ mediante RT-PCR en neurona única.

También investigamos la presencia del ARNm de las subunidades P2X₇ y P2X₂ mediante el uso de RT-PCR en célula única. El ARNm del receptor P2X₇ fue encontrado en 7 de las 13 neuronas analizadas (54%; Figura 17), mientras que el ARNm del receptor P2X₂ se encontró en 13 de las 14 neuronas analizadas. Solamente las neuronas que resultaron positivas para P2X₂ fueron analizadas

para la detección del transcrito del receptor P2X₇. Estos productos fueron secuenciados y resultaron idénticos al subtipo P2X₇ y P2X₂ de cobayo. El tamaño de cada producto de PCR fue predicho por su correspondiente secuencia de ARNm. Es poco probable que la falta de ARNm del receptor P2X₇ en 6 neuronas pueda ser atribuida a razones metodológicas (por ejemplo, degradación total de ARNm durante la preparación), puesto que amplificamos el ARNm del receptor P2X₂ en todas estas neuronas. El ARNm del receptor P2X₂ fue encontrado en 13 de las 14 neuronas amplificadas. Sin embargo, no se descarta que la degradación del ARNm pudiera ser la causa de un falso negativo. Estos datos indican, que los receptores P2X₂ y P2X₇ están ampliamente distribuidos en las neuronas mientéricas de intestino de cobayo.

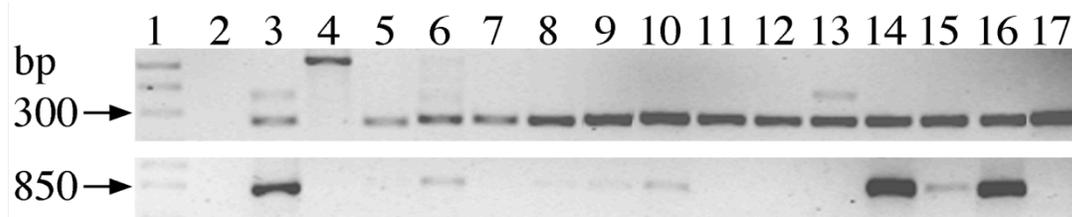


Figura 17. Detección de ARNm de la subunidad P2X₇ revelado por RT-PCR en célula única. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio al 1%. El producto de PCR de 280 pares de bases (pb) corresponde al cDNA de la subunidad P2X₂ (arriba) y el producto de 845 pb corresponde al cDNA del P2X₇ (abajo). El carril 1 corresponde al marcador de pesos molecular de 1 Kb, el carril 2 es el control negativo sin templado, el carril 3 es un control positivo usando tejido de intestino completo; el carril 4 es un producto de PCR de 500 pb correspondiente al ADN genómico de la subunidad P2X₂ y los carriles 5-17, son los productos de PCR de 13 neuronas mientéricas

IX. DISCUSION GENERAL

Varias de nuestras observaciones demuestran que las I_{ATP} en neuronas mientéricas de cobayo son mediadas por la activación, de al menos, dos poblaciones diferentes de canales P2X: 1) dos fases en la curva concentración-respuesta del ATP; la primera fase tiene una alta sensibilidad al ATP (EC_{50} 38 μ M) por lo que le llamamos receptores P2X de alta sensibilidad (hsP2X, por sus siglas en inglés) y la segunda fase tiene una baja sensibilidad al ATP (EC_{50} 1759 μ M) y los nombramos receptores P2X de baja sensibilidad (lsP2X, por sus siglas en inglés). 2) dos grados diferentes de rectificación de las I_{ATP} , una mediada por los receptores hsP2X y otra por los receptores lsP2X; 3) la inhibición específica de los receptores lsP2X por una concentración nanomolar de BBG; 4) la presencia del ARNm de las subunidades P2X₂ y P2X₇ en neuronas únicas y 5) la activación específica de los receptores hsP2X por BzATP.

Nuestros datos también muestran, al igual que en estudios previos (Barajas-Lopez y Col., 1993; Barajas-Lopez y Col., 1996a; Guerrero-Alba y Col., 2010; Hu y Col., 2001; Zhou and Galligan, 1996), propiedades farmacológicas y electrofisiológicas de los receptores hsP2X. Por ejemplo, las cinética de desensibilización es lenta, muestran la misma sensibilidad al ATP y ATP- γ -S, son insensibles a α,β -meATP, son inhibidos por PPADS, y al menos una subpoblación de canales parece tener un sitio de unión para suramina que media la inhibición. Estas propiedades farmacológicas, la amplia inmunoreactividad para la subunidad P2X₂ en la gran mayoría de las neuronas mientéricas (Castelucci y Col., 2002) y la presencia abundante del ARNm de la subunidad P2X₂ (en el 93% de las neuronas

mientéricas; presente estudio), apoyan fuertemente la hipótesis de que esta subunidad forma parte de los canales P2X de alta sensibilidad.

Es importante aclarar, que el mecanismo de acción de la suramina sobre las I_{ATP} mediadas por los receptores hsP2X mientéricos de cobayo es complejo, 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, que a veces es enmascarado por un efecto inhibitorio (Guerrero-Alba y Col., 2010). Ambos efectos son dependientes de la concentración. De este modo, la suramina principalmente potencia las I_{ATP} a concentraciones micromolares bajas pero un efecto inhibitorio aparece a concentraciones altas. Además, el efecto inhibidor y potenciador son mediados por dos diferentes sitios de unión a suramina. Observaciones como éstas sugieren que los receptores hsP2X son canales P2X₂ heteroméricos, por su combinación con otras subunidades P2X (por ejemplo: P2X₆, P2X₅ o P2X₃). También es posible que los receptores hsP2X estén conformados por diferentes variantes de P2X₂. En apoyo a esta posibilidad, se conoce la expresión de tres variantes funcionales de la subunidad P2X₂ en la cóclea de cobayo, las cuales tienen diferentes sensibilidades a la suramina (Chen y Col., 2000). Otra interpretación sería que el efecto potenciador de suramina observado a concentraciones bajas de ATP en cobayo sea a través de una subunidad diferente que este formando parte de los canales hsP2X. Al respecto, se ha observado el efecto potenciador de suramina, también 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 y Col.,

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 y Col., 2001), lo que sugiere que otra subunidad o un subtipo de la subunidad P2X₄ muy diferente puede ser responsable del efecto potenciador reportado en nuestro trabajo previo (Guerrero-Alba y Col., 2010). Está claro que para entender la base molecular de las propiedades de los receptores hsP2X y lsP2X, tienen que ser clonadas las diferentes subunidades (y sus variantes) y analizarlas en un sistema de expresión heterólogo.

Muy probablemente, en estudios previos (Barajas-Lopez y Col., 1993; Barajas-Lopez y Col., 1996a; Guerrero-Alba y Col., 2010; Hu y Col., 2001; Zhou and Galligan, 1996) se caracterizaron las propiedades farmacológicas y electrofisiológicas de los receptores hsP2X debido a las siguientes razones: 1) En estos estudios fueron usadas concentraciones de ATP $\leq 300 \mu\text{M}$ para caracterizar las I_{ATP} , 2) Fue descrita una fuerte rectificación entrante para las I_{ATP} , y 3) Se encontraron valores de EC_{50} de 40 a 114 μM para el ATP y otros nucleótidos que se comportan como agonistas completos (Barajas-Lopez y Col., 1996a; Guerrero-Alba y Col., 2010; Hu y Col., 2001; Zhou and Galligan, 1996). Nuestras observaciones también extienden la caracterización farmacológica previa de los receptores hsP2X, demostrando que el BzATP es un agonista parcial de estos receptores, el BBG es un antagonista a concentraciones micromolar, el KN-62 no es activo, y el A-438079 y ATP oxidado son antagonistas reversibles para los receptores hsP2X.

Las propiedades farmacológicas y electrofisiológicas de los receptores IsP2X , y la presencia del ARNm (presente estudio), así como la inmunoreactividad para la subunidad P2X_7 reportada previamente (Hu y Col., 2001), indican que los receptores IsP2X están constituidos por subunidades P2X_7 , y que son probablemente homoméricos. Este es el primer estudio que describe la contribución de los receptores P2X_7 a las corrientes de células completa en neuronas mientéricas de cobayo.

Las siguientes evidencias experimentales demuestran que los receptores IsP2X están formados por subunidades P2X_7 . En primer lugar, la baja potencia del ATP para activar estas corrientes es similar a la que reportan trabajos previos con receptores P2X_7 recombinantes de cobayo (EC_{50} 602 μM ; Fonfria y Col., 2008) y otras especies (EC_{50} 220-1200 μM ; Fonfria y Col., 2008; North, 2002). Segundo, la reducción en la rectificación entrante cuando los receptores IsP2X fueron activados, lo cual está de acuerdo con reportes previos que indican que la relación I/V es lineal para los receptores P2X_7 (North, 2002; Surprenant y Col., 1996). Tercero, los receptores IsP2X son inhibidos por concentraciones nanomolares de BBG, que se sabe inhibe específicamente los receptores P2X_7 a estas concentraciones (Jiang y Col., 2000). Cuarto, BzATP no activó a los receptores IsP2X , lo cual está en acuerdo con lo reportado, de que este agonista es inactivo sobre los receptores recombinantes P2X_7 de cobayo (Fonfria y Col., 2008)

La falta de efecto del KN-62 sobre los receptores IsP2X parece estar en contra de nuestra interpretación, de que los receptores IsP2X están formados por subunidades P2X_7 , debido a que se esperaba que este antagonista fuera activo, como se ha reportado en receptores recombinantes P2X_7 de cobayo (Fonfria y

Col., 2008). Sin embargo, ha sido reportado que las propiedades farmacológicas (incluyendo su sensibilidad al KN-62) de este receptor ha sido reportado que dependen en gran medida de los protocolos experimentales usados (Hibell y Col., 2001). Es importante destacar que en el presente estudio, medimos corrientes de membrana mediadas probablemente por “canales”, mientras que para los receptores recombinantes P2X₇, los autores midieron acumulación de bromuro de etidio, una función dependiente del “poro” (Fonfria y Col., 2008), y es posible que el KN-62 afecte de manera diferente estas dos formas funcionales del receptor P2X₇. En apoyo a esta explicación, discrepancias similares han sido reportadas para varias sustancias (KN-62, ATP oxidado) que al parecer esta relacionadas con las formas de “canal” y poro del receptor P2X₇ (Michel y Col., 2000). Una explicación alternativa es que las neuronas mientéricas de cobayo expresen una variante alternativa del receptor P2X₇ resistente a KN-62.

Ha sido reportado previamente inmunoreactividad para la subunidad P2X₇ en terminales nerviosas y cuerpos neuronales mientéricos del intestino de cobayo, además, las propiedades farmacológicas de los supuestos receptores P2X₇ se describen también en el mismo estudio (Hu y Col., 2001). Sin embargo, la evidencia presentada aquí y las propiedades farmacológicas del receptor recombinante P2X₇ de cobayo (Fonfria y Col., 2008), indican que las características reportadas por Hu y Col. (2001) no son las mismas del receptor P2X₇ y que se asemejan más a los descritos aquí para los receptores hsP2X. De este modo, estos autores usaron 100 μ M de ATP o BzATP para activar y caracterizar las propiedades farmacológicas de los supuestos receptores P2X₇. Sin embargo, los receptores P2X₇ recombinantes no son activados por 100 μ M de

ATP o por BzATP, en presencia de buffer de NaCl (Fonfria y Col., 2008). En el presente estudio, hemos demostrado que la segunda fase de la curva concentración-respuesta de ATP se produce por encima de 300 μM y que muy probablemente el BzATP este activando a los receptores hsP2X, ya que su efecto no se ve alterado por concentraciones nanomolares de BBG. Además, las I_{BzATP} y los receptores hsP2X son ambos inhibidos por este antagonista a concentraciones en el orden de micromolares. Por último, es poco probable que los receptores hsP2X sean heterómeros formados por subunidades P2X₇, debido a que esta subunidad al parecer no forma receptores heteroméricos con otras subunidades P2X (North, 2002).

En nuestras manos, BzATP fue un agonista parcial para activar las corrientes neuronales de membrana y sus efectos parecen estar mediados por la activación de los receptores hsP2X más que por los receptores lsP2X. Por lo tanto, I_{BzATP} fue inhibida sólo con BBG a concentraciones micromolares, de manera similar que a los receptores hsP2X. Por otra parte, las I_{BzATP} y I_{ATP} mediadas por los receptores hsP2X no fueron aditivas en los experimentos de aplicación conjunta, lo que indica que estos agonistas actúan en la misma población de receptores, de hecho, BzATP parece comportarse como un agonista parcial sobre los receptores hsP2X debido a la inhibición I_{ATP} mediadas por estos receptores. Además, las I_{BzATP} también muestran una fuerte rectificación entrante, similar a los receptores hsP2X. Nuestra interpretación es apoyada también por el hecho de que BzATP también está inactivo en el receptor recombinante P2X₇ de cobayo (Fonfria y Col., 2008).

Nuestros datos farmacológicos indican que los canales P2X₇ pueden contribuir con un 40% del total de la I_{ATP} en el 73% de las neuronas. Además, el 57% de las neuronas tuvo I_{ATP} sensibles al BBG. Estas observaciones se correlacionan bien con la detección del ARNm de la subunidad P2X₇ que fue alrededor del 54% en las neuronas analizadas, y con la inmunoreactividad abundante en el plexo mientérico de la subunidad P2X₇ (Hu y Col., 2001).

X. CONCLUSIONES

Nuestras observaciones demuestran que al menos dos poblaciones de receptores P2X median las I_{ATP} en las neuronas mientéricas del intestino de cobayo, que tienen una sensibilidad muy diferente al ATP. Los receptores P2X de alta sensibilidad están constituidos probablemente, por lo menos de manera parcial, por subunidades P2X₂. Los receptores de baja sensibilidad probablemente están conformados por subunidades P2X₇. Se requieren estudios adicionales para investigar el papel funcional de los receptores P2X₇ en neuronas mientéricas.

XI. REFERENCIAS

Anderson, C.M., Nedergaard, M., 2006. Emerging challenges of assigning P2X7 receptor function and immunoreactivity in neurons. *Trends Neurosci.* 29, 257-262.

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.

Barajas-Lopez, C., Espinosa-Luna, R., Gerzanich, V., 1994. ATP closes a potassium and opens a cationic conductance through different receptors in neurons of guinea pig submucous plexus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268, 1397-1402.

Barajas-Lopez, C., Huizinga, J.D., Collins, S.M., Gerzanich, V., Espinosa-Luna, R., Peres, A.L., 1996a. P2x-purinoceptors of myenteric neurones from the guinea-pig ileum and their unusual pharmacological properties. *Br. J. Pharmacol.* 119, 1541-1548.

Barajas-Lopez, C., Peres, A.L., Espinosa-Luna, R., 1996b. Cellular mechanisms underlying adenosine actions on cholinergic transmission in enteric neurons. *Am. J. Physiol.* 271, C264-275.

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.

Burnstock, G., 2006. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 166-176.

Castelucci, P., Robbins, H.L., Poole, D.P., Furness, J.B., 2002. The distribution of purine P2X(2) receptors in the guinea-pig enteric nervous system. *Histochem. Cell Biol.* 117, 415-422.

Chen, C., Parker, M.S., Barnes, A.P., Deininger, P., Bobbin, R.P., 2000. Functional expression of three P2X(2) receptor splice variants from guinea pig cochlea. *J. Neurophysiol.* 83, 1502-1509.

Chessell, I. P., J. Simon, et al. (1998). "Cloning and functional characterisation of the mouse P2X7 receptor." *FEBS Lett* 439(1-2): 26-30.

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.

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.

Cooke, H. J. (1998). "'Enteric Tears": Chloride Secretion and Its Neural Regulation." *News Physiol. Sci.* 13: 269-274.

Costa M, Brookes SJ & Hennig GW. (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 47 Suppl 4, iv15-19; discussion iv26.

Fonfria, E., Clay, W.C., Levy, D.S., Goodwin, J.A., Roman, S., Smith, G.D., Condreay, J.P., Michel, A.D., 2008. Cloning and pharmacological characterization of the guinea pig P2X7 receptor orthologue. *Br. J. Pharmacol.* 153, 544-556.

Furness JB. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81, 87-96.

Galligan, J.J., Bertrand, P.P., 1994. ATP mediates fast synaptic potentials in enteric neurons. *J. Neurosci.* 14, 7563-7571.

Galligan, J.J., North, R.A., 2004. Pharmacology and function of nicotinic acetylcholine and P2X receptors in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil.* 16 Suppl 1, 64-70.

Gillis KD, Pun RY & Mislis S. (1991). Single cell assay of exocytosis from adrenal chromaffin cells using "perforated patch recording". *Pflugers Arch* 418, 611-613.

Goodman, L. S., L. L. Brunton, et al. (2011). *Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics*. New York, McGraw-Hill.

Guerrero-Alba, R., Valdez-Morales, E., Juarez, E.H., Miranda-Morales, M., Ramirez-Martinez, J.F., Espinosa-Luna, R., Barajas-Lopez, C., 2010. Two suramin binding sites are present in guinea pig but only one in murine native P2X myenteric receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 626, 179-185.

Hibell, A.D., Thompson, K.M., Xing, M., Humphrey, P.P., Michel, A.D., 2001. Complexities of measuring antagonist potency at P2X(7) receptor orthologs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296, 947-957.

Hu, H.Z., Gao, N., Lin, Z., Gao, C., Liu, S., Ren, J., Xia, Y., Wood, J.D., 2001. P2X(7) receptors in the enteric nervous system of guinea-pig small intestine. *J. Comp. Neurol.* 440, 299-310.

Humphreys, B.D., Virginio, C., Surprenant, A., Rice, J., Dubyak, G.R., 1998. Isoquinolines as antagonists of the P2X7 nucleotide receptor: high selectivity for the human versus rat receptor homologues. *Mol. Pharmacol.* 54, 22-32.

Jiang, L.H., Mackenzie, A.B., North, R.A., Surprenant, A., 2000. Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. *Mol. Pharmacol.* 58, 82-88.

Kenakin R. (1993). *Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction*. Raven Press, Ltd., New York, N.Y.

Khakh, B.S., Burnstock, G., Kennedy, C., King, B.F., North, R.A., Seguela, P., Voigt, M., Humphrey, P.P., 2001. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol. Rev.* 53, 107-118.

Kunze, W. A. and J. B. Furness (1999). "The enteric nervous system and regulation of intestinal motility." *Annu. Rev. Physiol.* 61: 117-142.

Labasi, J. M., N. Petrushova, et al. (2002). "Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response." *J. Immunol.* 168(12): 6436-6445.

Michel, A.D., Kaur, R., Chessell, I.P., Humphrey, P.P., 2000. Antagonist effects on human P2X(7) receptor-mediated cellular accumulation of YO-PRO-1. *Br. J. Pharmacol.* 130, 513-520.

Nelson, D.W., Gregg, R.J., Kort, M.E., Perez-Medrano, A., Voight, E.A., Wang, Y., Grayson, G., Namovic, M.T., Donnelly-Roberts, D.L., Niforatos, W., Honore, P., Jarvis, M.F., Faltynek, C.R., Carroll, W.A., 2006. Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X7 antagonists. *J. Med. Chem.* 49, 3659-3666.

North, R.A., 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 82, 1013-1067.

Ochoa-Cortes, F., Garcia-Hernandez, L.M., Espinosa-Luna, R., Miranda-Morales, M., Montano, L.M., Barajas-Lopez, C., 2010. Functional interactions between nicotinic and P2X receptors in celiac ganglia neurons. *Auton. Neurosci.* 154, 59-65.

Poole, D.P., Castelucci, P., Robbins, H.L., Chiocchetti, R., Furness, J.B., 2002. The distribution of P2X3 purine receptor subunits in the guinea pig enteric nervous system. *Auton. Neurosci.* 101, 39-47.

Ralevic, V. and G. Burnstock (1998). "Receptors for purines and pyrimidines." *Pharmacol. Rev.* 50(3): 413-492.

Solle, M., J. Labasi, et al. (2001). "Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors." *J. Biol. Chem.* 276(1): 125-132.

Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R.A., Buell, G., 1996. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272, 735-738.

Takenouchi, T., K. Sekiyama, et al. (2010). "P2X7 receptor signaling pathway as a therapeutic target for neurodegenerative diseases." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 58(2): 91-96.

Van Nassauw, L., Brouns, I., Adriaensen, D., Burnstock, G., Timmermans, J.P., 2002. Neurochemical identification of enteric neurons expressing P2X(3) receptors in the guinea-pig ileum. *Histochem. Cell Biol.* 118, 193-203.

Ward, S. M. (2000). "Interstitial cells of Cajal in enteric neurotransmission." *Gut* 47 Suppl 4: iv40-43; discussion iv52.

Xiang, Z., Burnstock, G., 2004. Development of nerves expressing P2X3 receptors in the myenteric plexus of rat stomach. *Histochem. Cell Biol.* 122, 111-119.

Xiang, Z., Burnstock, G., 2005. Distribution of P2Y2 receptors in the guinea pig enteric nervous system and its coexistence with P2X2 and P2X3 receptors, neuropeptide Y, nitric oxide synthase and calretinin. *Histochem. Cell Biol.* 124, 379-390.

Zhou, X., Galligan, J.J., 1996. P2X purinoceptors in cultured myenteric neurons of guinea-pig small intestine. *J. Physiol.* 496 (Pt 3), 719-729.

ANEXO 1

Valdez-Morales E. E., Guerrero-Alba R., Liñan-Rico A, Espinosa-Luna R., Zarazua-Guzman S., Miranda-Morales M., Montañó LM., Barajas-López C. (2011). P2X7 receptors contribute to the currents induced by ATP in guinea pig intestinal myenteric neurons. *Eur. J. Pharmacol.* <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299911007941>



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar

Molecular and Cellular Pharmacology

P2X7 receptors contribute to the currents induced by ATP in guinea pig intestinal myenteric neurons

Eduardo Valdez-Morales^{a,1}, Raquel Guerrero-Alba^{a,1}, Andrómeda Li n n-Rico^a, Rosa Espinosa-Luna^a, Sergio Zarazua-Guzman^a, Marcela Miranda-Morales^a, Luis M. Monta o^b, Carlos Barajas-L pez^{a,*}^a División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, SLP, M xico^b Departamento de Farmacolog a, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 February 2011

Received in revised form 29 June 2011

Accepted 14 July 2011

Available online xxxxx

Keywords:

Small intestine

Enteric neurons

Myenteric plexus

P2X receptors

P2X2 receptors

Patch-Clamp

RT-PCR

(Guinea pig)

ABSTRACT

The whole-cell configuration, several pharmacological tools, and single-cell RT-PCR were used to investigate the contribution of P2X7 subunits to the ATP-induced currents (I_{ATP}) in guinea pig myenteric neurons. I_{ATP} was recorded in the great majority of tested neurons. ATP concentration-response curve (0.01–10 mM) showed two phases, the first mediated by high-sensitive P2X receptors (hsP2X receptors), observed between 0.01–0.3 mM and the second mediated by low-sensitive P2X receptors (lsP2X receptors). The calculated EC_{50} values of these phases were 38 and 1759 μ M, respectively. 2'-3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP (BzATP) concentration-response curve was monophasic (0.01–1 mM), and less potent (EC_{50} 142 μ M) than ATP to activate hsP2X receptors. A strong inward rectification was noticed when hsP2X receptors were activated with ATP (0.1 mM) and for BzATP-induced currents (0.1 mM; I_{BzATP}) but a significant lower rectification was noticed when lsP2X receptors were activated (5 mM). Brilliant blue G (BBG) at a concentration of 0.3 μ M (known to inhibit only P2X7 receptors) reduced I_{ATP} when lsP2X receptors contributed to it but neither affect hsP2X receptors nor I_{BzATP} . However, hsP2X receptors and I_{BzATP} were both inhibited by concentrations \geq 1 μ M of this antagonist. BzATP inhibited hsP2X receptors and therefore, it behaves as partial agonist on these receptors. Using the single-cell RT-PCR technique P2X7 mRNA was detectable in 7 out of 13 myenteric neurons exhibiting P2X2 mRNA. Altogether, our results show that low-sensitive P2X receptors are likely P2X7, whereas, the high-sensitive P2X channels are probably constituted, at least in part, by P2X2 subunits.

  2011 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Adenosine 5'-triphosphate (ATP) has excitatory effects in central and peripheral neurons (see (Burnstock, 2006; Galligan and North, 2004; North, 2002; Ochoa-Cortes et al., 2010)) including enteric neurons (Barajas-Lopez et al., 1994; Barajas-Lopez et al., 1996a; Galligan and Bertrand, 1994), via the activation of membrane ion channels named P2X receptors. Seven P2X (P2X1–P2X7) subunits have been cloned, which appear to be organized as trimers to form functional channels (Khakh et al., 2001). P2X channels can be formed by the same (homomeric) or different (heteromeric) subunits giving origin to specific pharmacological and physiological properties for each combination, which is further complicated by species differences and alternative splicing (Anderson and Nedergaard, 2006). The properties of P2X receptors have been determined mainly in studies using recombinant receptors but the detailed knowledge of P2X

native receptors has been hampered by the lack of selective agonists and antagonists for each receptor subtype (Anderson and Nedergaard, 2006; Khakh et al., 2001; North, 2002).

Immunoreactivity for three different P2X subunits has been reported in myenteric neurons of guinea pig small intestine: including for P2X2 (Castelucci et al., 2002; Xiang and Burnstock, 2004), P2X3 (Poole et al., 2002; Van Nassauw et al., 2002), and P2X7 (Hu et al., 2001). P2X2 subunit is widely distributed in most myenteric neurons of the small intestine whereas P2X3 subunit was reported to be less frequent. Immunoreactivity for the P2X7 subunit was described to be abundant in nerve fibers running through the ganglia and in areas surrounding the membrane of myenteric neuronal cell bodies of the ileum (Hu et al., 2001).

It has been proposed that P2X7 channels contribute to the whole-cell currents induced by ATP (I_{ATP}) in myenteric neurons of guinea pig (Hu et al., 2001). However, the electrophysiological and pharmacological data reported in that study have been questioned by Galligan and North (2004) and are in clear controversy with the pharmacological properties recently reported for guinea-pig P2X7 recombinant receptors (Fonfria et al., 2008). Thus, in the former study (Hu et al., 2001), ATP concentrations \leq 100 μ M were consistently used to determine the effect of various P2X7 receptor antagonists but a

* Corresponding author at: Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4a Sección, SLP, SLP, CP78216, México. Tel.: +52 444 834 2000x2033; fax: +52 444 834 2010.

E-mail address: cbarajas@ipicyt.edu.mx (C. Barajas-López).

¹ Shared first author.

ANEXO 2

Guerrero-Alba R., Valdez-Morales E. E., Juárez E. H., Miranda-Morales M., Ramírez-Martínez J. F., Espinosa-Luna R., Barajas-López C. (2010). Two suramin binding sites are present in guinea pig but only one in murine native P2X myenteric receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 626: 179-185.



Molecular and Cellular Pharmacology

Two suramin binding sites are present in guinea pig but only one in murine native P2X myenteric receptors

Raquel Guerrero-Alba^a, Eduardo Valdez-Morales^a, Esri H. Juárez^a, Marcela Miranda-Morales^a, Juan F. Ramírez-Martínez^a, Rosa Espinosa-Luna^a, Carlos Barajas-López^{a,b,*}^a División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, SLP, Mexico^b Department of Anatomy and Cell Biology, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 July 2009

Received in revised form 8 September 2009

Accepted 28 September 2009

Available online 8 October 2009

Keywords:

Myenteric neuron

P2X receptor

Enteric neuron

Gastrointestinal tract

ATP

Suramin

PPADS

(mouse)

(guinea pig)

ABSTRACT

Whole-cell patch clamp recordings were used to characterise the physiological and pharmacological properties of P2X receptors 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 μ M) yielded EC₅₀ values of 114 and 115 μ M 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 of unity. α,β -methylene ATP (100 μ M) was virtually inactive in both species. Pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulphonic acid (0.01–30 μ M) inhibited the ATP-induced currents (I_{ATP}) with a different potency; being the IC₅₀ 0.6 and 1.8 μ M 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 P2X receptors in these two species have different pharmacological properties.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

P2X receptors are a family of ionotropic cation channels, activated by extracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP). To date, seven P2X subunits have been cloned (P2X_{1–7}), and the subunits may assemble as trimers to form functional P2X receptors (Torres et al., 1999). All P2X subunits, except P2X₆, have been reported to form functional homomeric receptors and all of them can combine with others to form heteromeric functional receptors with an unknown stoichiometry but with specific biophysical and pharmacological properties (Bo et al., 1995; Brake et al., 1994; Chen et al., 1995; Surprenant et al., 1995; Valera et al., 1994). These properties, defined in heterologous expression systems, are helpful to propose putative subunit combinations of P2X native receptors of a given tissue. However, pharmacological profiles of these recombinant P2X receptors do not always match those of the endogenous P2X receptors, thus it is plausible that some native receptors are hetero-multimeric channels composed of

different P2X subunits or different subtypes of subunits produced by alternative splicing (Evans et al., 1995; North, 2002).

Experimental evidence for the existence of at least three different P2X subunits has been found in myenteric neurons of the guinea pig small intestine. Thus, immunoreactivity has been shown for P2X₂ (Castelucci et al., 2002), P2X₃, (Poole et al., 2002; Van Nassauw et al., 2002) and P2X₇ subunits (Hu et al., 2001). In murine myenteric neurons, immunoreactivity for P2X₂ (Ren et al., 2003), P2X₃ and P2X₅ (Ruan and Burnstock, 2005) has been demonstrated. Lack of immunoreactivity for P2X₁, P2X₄ nor P2X₆ subunits has been reported in mouse (Ruan and Burnstock, 2005) and guinea pig (Hu et al., 2001) myenteric neurons.

There are controversial findings regarding the pharmacological properties of myenteric P2X receptors, which could reflect the existence of different receptor subtypes and interspecies differences. For instance, suramin, an antagonist for many P2X receptors was reported to potentiate (Barajas-Lopez et al., 1993, 1996a), to inhibit (Galligan and Bertrand, 1994), or have not effect (Glushakow et al., 1998) on responses mediated by myenteric P2X receptors of guinea pig small intestine. A more recent study, reports that suramin can both potentiate and inhibit these receptors in these neurons (Hu et al., 2001). In rat myenteric neurons, the inhibitory effect of suramin on P2X receptors has been the only described effect (Ohta et al., 2005). Therefore, we carried out a comparative study in murine and guinea pig

Abbreviations: α,β -meATP, α,β -methylene ATP; I_{ATP} , ATP-induced currents; PPADS, Pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulphonic acid.

* Corresponding author. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4a Sección, SLP, SLP, CP78216, Mexico. Tel.: +52 444 834 2000x2033; fax: +52 444 834 2010.

E-mail address: cbarajas@ipicyt.edu.mx (C. Barajas-López).