



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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“Concentraciones fisiológicas de zinc tienen un efecto dual sobre  
los receptores P2X de las neuronas mientéricas del cobayo”**

Tesis que presenta

**Liliana Hortencia Méndez Barredo**

Para obtener el grado de

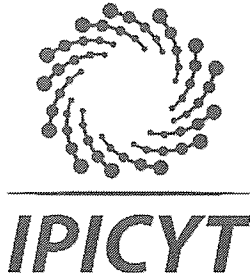
**Doctora en Ciencias en Biología Molecular**

**Codirectores de la Tesis:**

**Dr. Carlos Barajas López**

**Dra. Laura Yáñez Espinosa**

San Luis Potosí, S.L.P., febrero de 2019



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Concentraciones fisiológicas de Zinc tienen un efecto dual sobre los receptores P2X de las neuronas mientéricas del cobayo**" presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Liliana Hortencia Méndez Barredo** y aprobada el veintisiete de febrero del dos mil diecinueve 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.

**Dra. Laura Yáñez Espinosa**  
Codirectora de la tesis

**Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa**  
Miembro del Comité Tutorial

**Dr. Rubén Hipólito López Revilla**  
Miembro del Comité Tutorial

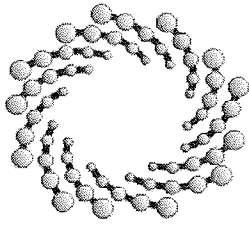
**Dr. Sergio Zarazua Guzmán**  
Miembro del Comité Tutorial



## **Créditos institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Neurobiología de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Carlos Barajas López (Proyecto Número 81409).  
(CONACYT).

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 231811) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



**IPICYT**

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

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 106 del Libro Segundo 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 27 días del mes de febrero del año 2019, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Rubén Hipólito López Revilla</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Laura Yáñez Espinosa</b>	<b>Secretaria</b>	<b>UASLP</b>
<b>Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Sergio Zarazúa Guzmán</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>UASLP</b>

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

**DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Liliana Hortencia Méndez Barredo**

sobre la Tesis intitulada:

*Concentraciones fisiológicas de Zinc tienen un efecto dual sobre los receptores P2X de las neuronas mientéricas del cobayo*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Carlos Barajas López**  
**Dra. Laura Yáñez Espinosa (UASLP)**

El Jurado, después de deliberar, determinó

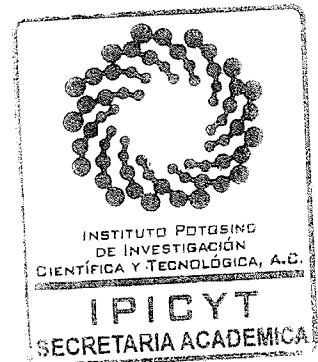
**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 17:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 27 días del mes de febrero de 2019.

**Mtra. Yvonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

**Dr. Horacio Flores Zúñiga**  
Secretario Académico



## **Dedicatorias**

A mis padres, Alonso Méndez Santiz y María Guadalupe Barredo, por haberme dado educación, un hogar donde crecer, equivocarme, desarrollarme, aprender y donde adquirí los valores que hoy definen mi vida.

A mi hermano Luis Alonso Méndez Barredo, por sus consejos y su apoyo incondicional.

# Agradecimientos

*Cuando bebas agua, recuerda la fuente*

**Doctor Carlos Barajas López**, por su apoyo ante las adversidades, su confianza incondicional en el desarrollo de este trabajo, por aclarar mis dudas en todo momento, por su carácter tan humano, la capacidad y bondad de compartir todos sus conocimientos, por su paciencia, por su interés en impulsarnos a aprender a analizar, buscar, y seguir adelante. Le agradezco cada una de las oportunidades que me brindó en cada etapa del doctorado y su apoyo hasta el final.

Siempre lo recordaré y le estaré muy agradecida.

Técnico de laboratorio Rosy Espinosa Luna, por su apoyo técnico en la realización de este trabajo, con los cultivos primarios. Por la capacitación que me brindó en microdissección, cultivos primarios, cuidado de animales experimentales y registros electrofisiológicos para realizar cada uno de los experimentos, sobre todo por sus consejos y amistad.

Doctora Marcela Miranda Morales porque desde el inicio estuvo al pendiente de aclarar mis dudas, por su asesoría, por su amistad.

Doctor Samuel Lara González, por su apoyo y comprensión, y sobre todo por ayudarme a continuar, porque a pesar de conocerme poco confió en mí.

Doctora Alma Rosa Barajas Luna, porque dedicó su tiempo a la revisión de la tesis, y contribuyó a mejorar el trabajo, gracias a su experiencia en el tema y el idioma.

Doctora Laura Yáñez, por darme la oportunidad de trabajar con ella desde la maestría, su asesoría, su consejos y ejemplo, por alentarme a seguir estudiando, por su amabilidad, bondad y siempre tener una sonrisa para mí.

Doctora Ana Paulina Barba de la Rosa, por permitirme y darme todas las facilidades de trabajar en su laboratorio para seguir aprendiendo y sobre todo por su valioso tiempo en sus muy acertados comentarios

Doctor Sergio Zarazúa Guzmán. Por su tiempo en la revisión, y por el conocimiento que me brindó en cada evaluación,

Maestra en Ciencias Jessica Gabriela Rodríguez Meléndez, por su dedicación a los experimentos y su habilidad para realizar registros y analizar datos.

Al personal que labora en el IPICYT, porque cada día deja los mejor de sí mismo en cada una de sus labores, pero en especial a Ivonne Cuevas Vélez por todo su esfuerzo y su capacidad con la que desempeña sus actividades para que día a día nuestro instituto sea el mejor.

# Contenido

<b>Constancia de aprobación de la tesis</b>	<b>ii</b>
<b>Créditos institucionales</b>	<b>iii</b>
<b>Dedicatorias</b>	<b>v</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>vi</b>
<b>Lista de tablas</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>x</b>
<b>Anexos</b>	<b>xi</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>xii</b>
<b>Resumen</b>	<b>xiii</b>
<b>Abstract</b>	<b>xiv</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 El sistema nervioso autónomo	1
<i>Sistema nervioso entérico</i>	2
<i>Anatomía y fisiología del sistema nervioso entérico</i>	2
1.2 Las neuronas entéricas y los principales neurotransmisores	3
<i>Neuronas motoras</i>	4
<i>Neuronas sensoriales</i>	4
<i>Interneuronas</i>	5
1.3 Transmisión sináptica en el SNE	5
<i>Canales ionotrópicos</i>	6
1.4 Receptores P2X	7
1.5 El receptor P2X2 en neuronas mientéricas	10
1.6 El gen del receptor P2X2	11
1.7 El zinc como nutriente esencial	13
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>18</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>18</b>
<b>4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>18</b>
<b>5. ANÁLISIS DE DATOS</b>	<b>19</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>19</b>
6.1 Equipo y material de laboratorio	19
6.2 Reactivos	19
6.3 Medio de cultivo y otras soluciones	20
6.4 Preparación de los cultivos primarios	21
6.5 Registros de Patch Clamp	23
6.1 Expresión heteróloga	24
6.1.1 <i>Análisis de secuencia genómica de los receptores P2X2</i>	24
6.1.2 <i>Preparación de ovocitos de Xenopus laevis</i>	25
6.1.3 <i>Registros electrofisiológicos en ovocitos</i>	25
6.1.4 <i>Soluciones y reactivos de aplicación</i>	26
6.1.5 <i>Aplicación de sustancias</i>	26

<b>7. RESULTADOS</b>	<b>28</b>
Las corrientes mediadas por ATP actúan en receptores P2X nativos de neuronas mientéricas de cobayo	28
Efectos del zinc en los receptores P2X nativos de neuronas mientéricas	28
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>31</b>
<b>9. FIGURAS</b>	<b>37</b>
<b>10. REFERENCIAS</b>	<b>53</b>



## Lista de tablas

Tabla 1. Manifestaciones clínicas de la deficiencia de zinc

15

## Lista de figuras

Figura 1. Esquema de un corte transversal de un segmento de intestino	37
Figura 2. Vías aferentes y eferentes de los sistemas simpático y parasimpático	38
Figura 3. Tipos de neuronas del intestino de cobayo	39
Figura 4. Esquema estructural representativo de los tres grupos de canales iónicos regulados por ligando	40
Figura 5. Topología y registro típico de los P2Xr	41
Figura 6. Presencia de P2X2 en neuronas mientéricas	42
Figura 7. Formas de edición alternativa	43
Figura 8. Variantes de P2X2 intestinales, modelo de estructura génica	44
Figura 9. Paciente de siete meses de edad con diagnóstico de acrodermatitis enteropática	45
Figura 10. Instrumentos utilizados para la aplicación de sustancias	46
Figura 11. El zinc tiene un efecto potenciador e inhibidor en neuronas de plexo mientérico de cobayo	47
Figura 12. El zinc tiene acciones potenciadoras e inhibitorias en la misma neurona de plexo mientérico de cobayo con diferentes concentraciones de ATP	48
Figura 13. Gráficas de la respuesta de células a la aplicación de concentraciones crecientes de zinc	49
Figura 14. Inhibición por zinc de receptores P2X de neuronas de plexo mientérico por antagonismo competitivo	50
Figura 15. El efecto del zinc sobre los heterómeros P2X21-1a y P2X2-2b	51
Figura 16. Respuesta del zinc en homómeros de P2X2-1a; P2X2-2b	52

# Anexos

1.Articulo publicado

59

## Abreviaturas

5-HT <sub>3</sub>	5-hidroxitriptamina, o serotonina
ACh	Acetilcolina
ATP	Adenosín-5'-trifosfato
CAZ	Canales activados por zinc
EPSPs	Potenciales postsinápticos excitatorios (siglas en inglés)
ERM	Elemento de respuesta a metal
FTM	Factor de transcripción de unión al metal
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
IPANs	Neuronas aferentes primarias intrínsecas
LGIC	Canales iónicos activados por ligando
NMDA	N-metil-D-aspartato
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema nervioso central
SNE	Sistema nervioso entérico
SNS	Sistema nervioso somático
SPS	Sistema parasimpático
SS	Sistema simpático

## Resumen

### “Concentraciones fisiológicas de zinc tienen un efecto dual sobre los receptores P2X de las neuronas mientéricas del cobayo”

En este trabajo caracterizamos los efectos farmacológicos de las concentraciones fisiológicas de zinc sobre los receptores mientéricos nativos del intestino delgado del cobayo y las isoformas P2X2 presentes en la mayoría de las neuronas mientéricas. Este es el primer estudio que describe efectos opuestos —inhibitorio y potenciador del zinc en estos receptores P2X. No fue posible determinar si ambos efectos dependen de la concentración, aunque el efecto inhibitorio parece ser mediado por antagonismo competitivo y depende de la concentración. El efecto potenciador parece ser mediado por los cambios alostéricos inducidos por el zinc en los canales mientéricos P2X y se observa con mayor frecuencia en las neuronas mientéricas con bajas concentraciones de zinc. El efecto inhibitorio es más común en las variantes P2X2-1 y P2X2-2 que en los canales mientéricos. Sin embargo, en las variantes el efecto potenciador es de igual magnitud que el efecto inhibitorio. Es probable que el efecto inhibitorio y potenciador sean mediados por diferentes sitios de unión que parecen estar presentes en ambas variantes de P2X. En conclusión, en los receptores P2X nativos mientéricos el zinc tiene efectos farmacológicos cuantitativamente diferentes en comparación con los observados en los canales en los canales homoméricos P2X2-1 Y P2X2-2. Los efectos potenciadores e inhibitorios del zinc sobre estos receptores son mediados por dos sitios de unión diferentes. Todos nuestros datos sugieren que los receptores P2X mientéricos tiene una farmacología más compleja que los de los receptores P2X2 recombinantes, lo que probablemente esté relacionado con otras subunidades que se expresan en las neuronas mientéricas. Debido a que estos efectos duales ocurren a concentraciones fisiológicas de zinc, sugerimos que podrían participar en procesos fisiológicos y patológicos.

**Palabras clave:** Neuronas mientéricas; tracto gastrointestinal; ATP; Zinc; receptores P2X recombinantes; receptores P2X nativos.

## Abstract

### **“Physiological concentrations of zinc have dual effects on myenteric P2X guinea pig receptors”**

We hereby characterized the pharmacological effects of physiological concentrations of zinc on native myenteric P2X receptors from guinea-pig small intestine and on P2X2 isoforms present in most myenteric neurons. This is the first study describing opposite —inhibitory and potentiating— effects of zinc on these P2X receptors. It was not possible to determine whether both effects were concentration dependent, yet the inhibitory effect was mediated by competitive antagonism and was concentration dependent. The potentiating effect appears to be mediated by allosteric changes induced by zinc on P2X myenteric channels, which is more frequently observed in myenteric neurons with low zinc concentrations. In P2X2-1 and P2X2-2 variants, the inhibitory effect is more common than in P2X myenteric channels. However, in the variants, the potentiatory effect is of equal magnitude as the inhibitory effect. Inhibitory and potentiatory effects are likely mediated by different binding sites that appear to be present on both P2X2 variants. In conclusion, in myenteric native P2X receptors, zinc has quantitatively different pharmacological effects compared to those observed on homomeric P2X2-1 and P2X2-2 channels. Potentiatory and inhibitory zinc effects upon these receptors are mediated by two different binding sites. All our data suggest that myenteric P2X receptors have a more complex pharmacology than those of the recombinant P2X2 receptors, which is likely related to other subunits known to be expressed in myenteric neurons. Because these dual effects occur at zinc physiological concentrations, we suggest that they could be involved in physiological and pathological processes.

**Key words:** Myenteric neurons; gastrointestinal tract; ATP; Zinc; P2X2 recombinant receptors; P2X native receptors

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 El sistema nervioso autónomo

A lo largo de nuestra vida realizamos una gran cantidad de acciones, muchas de las cuales son voluntarias, como saltar, correr, hablar, etc. Sin embargo, otras muchas acciones que realizamos las llevamos a cabo de manera automática, algunas de las cuales nos mantienen con vida tales como la frecuencia cardíaca, la digestión, la frecuencia respiratoria, la salivación, la sudoración. A nivel neurológico, estos dos tipos de acciones se llevan a cabo por dos sistemas del sistema nervioso; las acciones voluntarias se llevan a cabo por el sistema nervioso somático (SNS) y las involuntarias por el sistema nervioso autónomo o vegetativo (SNA). Este último está constituido por circuitos neuronales localizados preferentemente en el hipotálamo, tallo cerebral y médula espinal y controla funciones corporales relacionadas con el mantenimiento de la homeostasis (Purves 2004).

El SNA inerva el corazón, los pulmones, el tracto gastrointestinal, sistema urinario, los vasos sanguíneos, glándulas, etc. Las conexiones con los diferentes órganos diana del sistema son tanto motores como sensoriales. El sistema nervioso vegetativo, en conjunto con el sistema endócrino, mantienen los ajustes químicos continuos en la sangre, respiración, circulación, digestión, y respuestas del sistema inmune que mantienen la integridad dinámica del medio interno (Squire et al. 2008; Purves 2004).

La porción motora del sistema autónomo o vegetativo se divide en dos componentes: el sistema simpático **SS**, también conocido como sistema autónomo toracolumbar y el sistema parasimpático **SPS** cuyas fibras salen por nervios

craneales y sacros. Una tercera división del sistema nervioso vegetativo es la contenida dentro de la pared de las vísceras abdominales, llamado sistema nervioso entérico (**SNE**): que se encarga de regular el sistema gastrointestinal (Purves 2004)

### ***Sistema nervioso entérico***

El SNE se encuentra bajo la influencia de los sistemas simpáticos y parasimpáticos. Los somas o cuerpos neuronales entéricos se encuentran dentro de dos plexos ganglionares, el plexo mientérico y el submucoso (**Figura 1**). Estos plexos se interconectan por una compleja red de fibras nerviosas y se localizan desde la parte inferior del esófago hasta el esfínter anal, en humanos se calcula que las neuronas son alrededor de  $10^7$  a  $10^8$ , número similar a las neuronas de la médula espinal (Kandel et al. 2000).

### ***Anatomía y fisiología del sistema nervioso entérico***

Las funciones gastrointestinales requieren del funcionamiento coordinado e integrado de varios componentes del tubo digestivo como son: el epitelio mucoso, submucoso, la musculatura lisa, vasos sanguíneos, ganglios linfáticos y glándulas anexas como son: glándulas salivales, páncreas o la vesícula biliar (Furness and Costa 1980) . El SNE integra motilidad, secreciones, flujo sanguíneo y respuestas inmunes a través de una red neural cuyos cuerpos celulares se encuentran en la pared del tubo digestivo (*inervación intrínseca*) y que está comunicado con el SNC (*inervación extrínseca*).

El **plexo mientérico** (**Figura 1**) está situado entre la capa muscular longitudinal y circular, y se extiende a lo largo de todo el tubo digestivo, del esófago hasta el recto. El **plexo submucoso** se ubica entre la capa muscular circular y la mucosa y se localiza solo en el intestino delgado y grueso. En general, el plexo



mientérico controla la contracción y relajación del músculo liso intestinal, mientras que el plexo submucoso se ocupa del control de las funciones de absorción y secreción del epitelio gastrointestinal, flujo sanguíneo local y respuestas. Los dos plexos están conectados entre sí y contienen neuronas motoras que inervan tanto al músculo liso como a las células secretoras de la mucosa, así como a las neuronas sensitivas que responden a la distensión, a la tonicidad y a señales químicas específicas (Furness 2000; Wood 2007).

El SNE controla la musculatura lisa, la microcirculación local y el transporte transepitelial, es responsable del reflejo peristáltico y del complejo motor migratorio (MMC). Aunque es autónomo, el SNE mantiene estrechas conexiones con el SNC. Posee una doble inervación extrínseca a través de los sistemas simpático y parasimpático. Ambos plexos contienen fibras aferentes, sensoriales que transmiten información a otras neuronas entéricas, las cuales pueden ser interneuronas motoras. Estas últimas son inhibitorias como excitatorias, dependiendo del efecto que ocasionen en el músculo liso intestinal. Las fibras

preganglionares parasimpáticas proyectan hacia los ganglios entéricos del estómago, el colon y el recto a través de los nervios vagos y pélvicos. Las fibras simpáticas se originan fundamentalmente en los ganglios paravertebrales, aunque algunas lo hacen en los ganglios prevertebrales y se proyectan fundamentalmente a los plexos mientérico y submucoso (**Figura 2**). (Kandel et al. 2000; Saladin 2014).

## **1.2 Las neuronas entéricas y los principales neurotransmisores**

Al igual que el sistema nervioso central, el sistema nervioso entérico tiene tres clases de neuronas y se clasifican de acuerdo con su funcionalidad:

### ***Neuronas motoras***

Representan la conexión final motora con las células musculares lisas de las capas circular y longitudinal. Se pueden sub-clasificar en motoneuronas (excitatorias e inhibitorias), según los neurotransmisores que codifican y también se pueden subclasificar según la capa muscular.

Por sus características electrofisiológicas se les clasifica como neuronas 'S', que al ser estimuladas eléctricamente se generan potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs) rápidos. Dentro de las motoneuronas podemos encontrar un pequeño subgrupo, las neuronas secreto motoras y vasomotoras (**Figura 3**), que son neuronas que se proyectan a mucosa y a vasos sanguíneos locales (Furness 2000; Costa et al. 2000).

### ***Neuronas sensoriales***

Llamadas también neuronas aferentes primarias intrínsecas (IPANs), tienen sus cuerpos celulares tanto en los ganglios del plexo mientérico como en los del plexo submucoso y proyectan sus terminales hacia la mucosa intestinal. Responden a estímulos químicos, deformación mecánica de la mucosa y otros estímulos como el estiramiento radial y la tensión muscular. Presentan varios receptores unidos a proteínas G que cuando se activan también producen despolarizaciones similares a EPSPs lentos, en particular receptores activados por 5-HT, colecistoquinina (CCK), prostaglandina PGE<sub>2</sub>, histamina y ATP, éste último actuando a través de los receptores P2Y inhibitorios. Las IPANs están interconectadas formando redes y reciben entradas de otras IPANs, además se conectan con interneuronas y con motoneuronas. Por lo general, no es frecuente que las neuronas sensoriales intrínsecas reciban entradas sinápticas rápidas pero se ha encontrado que poseen

muchos de los receptores que median estas entradas como son los receptores nicotínicos a ACh, 5-HT<sub>3</sub>, GABA<sub>A</sub> y P2X (Costa et al. 2000).

### ***Interneuronas***

Se han identificado en todas las regiones del tracto gastrointestinal, posiblemente, son las neuronas que más varían entre regiones. Las interneuronas forman cadenas en dirección oral y aboral. Por lo tanto, se pueden diferenciar en interneuronas ascendentes y descendentes (Furness 2000). Investigaciones farmacológicas de transmisión de neurona a neurona en el intestino delgado han revelado dos EPSPs rápidos no colinérgicos, uno mediado por ATP y el otro por 5-HT. La transmisión por ATP es en una vía descendente, sin embargo, ésta al parecer, no es una vía para el control de la motilidad a través de reflejos locales. Así pues, el ATP podría ser un neurotransmisor de las interneuronas o ChAT/SOM o ChAT/5-HT. Otra posibilidad es que el ATP sería un neurotransmisor de un subgrupo de neuronas aferentes primarias, las cuales tienen axones largos analmente dirigidos. Al igual que las motoneuronas, se clasifican como neuronas 'S' (Furness 2000).

## **1.3 Transmisión sináptica en el SNE**

La sinapsis es el sitio donde una neurona se comunica con otra. Dos elementos pueden ser identificados en todas las sinápsis, el presináptico y el postsináptico. La transmisión sináptica puede ser de dos tipos: una *eléctrica* debido a que la comunicación se establece a través de canales intercelulares (uniones comunicantes) que se caracterizan por una baja resistencia eléctrica, y otra *química* debido a que utilizan sustancias llamadas neurotransmisores, las cuales son liberadas del elemento presináptico y activan proteínas receptoras en el

postsináptico. En ambos tipos de comunicación sináptica se modula el potencial de membrana en reposo del elemento postsináptico. En la transmisión sináptica química, estos cambios de potencial suceden por la activación de receptores que modifican el flujo iónico a través de la membrana plásmatica (Kandel et al. 2000). La transmisión sináptica en el SNE se realiza mediante receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) o receptores metabotrópicos y receptores directamente asociados a canales iónicos mejor conocidos como canales ionotrópicos o canales iónicos activados por ligando (LGIC).

### ***Canales ionotrópicos***

Estos canales son proteínas integrales de membrana que son de gran importancia para todos los organismos vivos, ya que proporcionan una barrera de baja energía para que iones y algunas moléculas hidrofílicas logren atravesar las membranas celulares hidrofóbicas con velocidades de transporte cercanas a los límites de difusión y participan en la comunicación, señalización celular, estrés osmótico, contracción muscular, entre otros. Los canales iónicos se dividen en tres grandes grupos: Los receptores Cys-loop formados por asociaciones de 5 subunidades (Nicotínicos ACh) constituida por los receptores ACh nicotínicos, 5HT<sub>3</sub>, GABA<sub>A</sub>, GLICINA y canales activados por zinc, por otro lado, se encuentra la familia de los receptores a glutamato conformados por tetrámeros: NMDA, AMPA, Kainato y la familia de los receptores purinérgicos o P2X los cuales están formados por trímeros (**Figura 4**).

El esquema de cada categoría muestra la ubicación de los extremos extracelulares e intracelulares, la cantidad de dominios transmembranales (cilindros de colores) y los residuos de cisteína que participan en la formación de enlaces

disulfuro (círculos amarillos) los cilindros rojos indican regiones  $\alpha$ -helicoidales que participan en la conducción iónica selectiva. (Modificado de Collingridge *et al.*, 2009).

## 1.4 Receptores P2X

Los receptores P2X son canales iónicos permeables que responden a la unión de ATP (adenosin 5'-trifosfato) extracelular, en vertebrados los receptores P2X son trímeros formados por subunidades individuales codificados por siete genes distintos (P2X1-7, de acuerdo con el orden histórico de clonación), los cuales son de 40% a 50% idénticos en su secuencia de aminoácidos, la mayoría de los subtipos son permeables a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y permeabilidad variable al  $\text{Ca}^{2+}$ . Cada subunidad posee dos dominios transmembranales, un dominio extracelular rico en cisteína de aproximadamente 280 aminoácidos y uno intracelular que posee un amino y un carboxilo terminal (**Figura 5 A**), cada canal del receptor P2X se compone de tres subunidades, las cuales se pueden ensamblar formando complejos homoméricos (P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X7) o heteroméricos (P2X<sub>1/2</sub>, P2X<sub>1/4</sub>, P2X<sub>1/5</sub>, P2X<sub>2/3</sub>, P2X<sub>2/5</sub>, P2X<sub>2/6</sub>, P2X<sub>4/6</sub>), hasta ahora no se ha descrito que los receptores P2X6 formen canales homoméricos funcionales (North and Surprenant 2000; Gevers *et al.* 2006).

Cada receptor P2X homomérico muestra propiedades funcionales distintas, en general la activación de estos consiste en tres fases; una fase de entrada de corriente que permite la activación del receptor inducida por el agonista (fase de activación) una disminución de esta respuesta en presencia del agonista (fase de desensibilización) y una caída variable de la corriente al remover el agonista hasta

alcanzar la línea base, indicando la finalización del efecto (fase de desactivación; **Figura 5 B**).

Los receptores P2X están distribuidos en el organismo, y su respuesta funcional ha sido observada en células musculares, en células neuronales y no neuronales, dada su extensa distribución juegan un papel importante en una gran variedad de funciones fisiológicas, incluyendo transmisión sináptica, contracción de músculo liso e inflamación (Gever et al. 2006).

La composición funcional de las subunidades ha sido estudiada especialmente en sistemas recombinantes junto con una comprensión de algunas de sus características biofísicas, tales como selectividad iónica, permeabilidad y cinética de activación y desactivación, aunque en muchas células y tejidos aún no se ha logrado establecer que formas homoméricas y heteroméricas de los canales P2X transmiten las respuestas a ATP por la escasez de herramientas farmacológicas potentes y selectivas (North and Surprenant 2000).

Los receptores P2X se encuentran ampliamente distribuidas en el sistema nervioso periférico y central, se sabe que están involucrados en la transmisión sináptica rápida (North 2002). Los receptores P2X<sub>1</sub>- P2X<sub>6</sub> contienen de 379-472 aminoácidos de longitud mientras que el receptor P2X<sub>7</sub> contiene 595, esto debido al incremento en la longitud del carboxilo terminal, la secuencia de los aminoácidos de los receptores P2X difiere del restos de las demás canales iónicos activados por ligando, en sus propiedades fisiológicas y farmacológicas (Burnstock 2013).

Los principales receptores P2X expresados por células neuronales entéricas son P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>2/3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>7</sub>, distribuidos en ambos plexos tanto mientérico

como submucoso, y parecen estar involucrados en actividades de reflejo incluyendo modulación y reflejo peristáltico.

La importancia de los receptores P2X reside en su amplia participación en la comunicación celular y su impacto en la función de varios órganos.

El estudio de las propiedades recombinantes de los receptores permite el entendimiento las combinaciones de las subunidades en canales P2X nativos. Si embargo debido a estos perfiles farmacológicos de los P2X recombinantes no siempre coinciden con los de los receptores nativos, hipotetizamos que algunos receptores nativos son proteínas heteroméricas formadas por subunidades producidas por splicing alternativo o con diferente estequiometría. (North and Surprenant 2000; Burnstock 2013).

En neuronas de plexo mientérico de intestino de cobayo, existe evidencia experimental que demuestra la presencia de diferentes P2X2 funcionales. Dos variantes de P2X2 funcionales han sido reportadas una canónica (P2X2-2b) y una segunda variante de splicing (P2X2-1a). También existe la prueba de inmunoreactividad y mRNA para P2X3, mientras tanto la evidencia molecular y electrofisiológica indica la presencia de subunidades de P2X7 (Liñan-Rico et al. 2012).

Los purinoreceptores P2X se activan principalmente por ATP extracelular, y aunque están básicamente modulados por este, también pueden ser modulados por varios metales traza y particularmente por el zinc.

## 1.5 El receptor P2X2 en neuronas mientéricas

El P2X2 se expresa en el sistema nervioso periférico y central, donde juega un rol importante en la transmisión sináptica mediada por ATP, tanto en terminales nerviosas como sinapsis, esta subunidad es la única de las demás subunidades en la que se han identificado distintas variantes de splicing (P2X2 mRNA) en humano (Lynch et al. 1999) rata (Simon et al. 1997) cobayo (Liñan-Rico et al. 2012), se ha identificado que estas variantes tienen la capacidad de formar canales con diferentes propiedades funcionales. Diversos estudios presentan evidencia que el receptor P2X2 es predominante en neuronas de plexo mientérico, además de que contribuye de manera importante en la respuesta de corrientes inducidas por ATP (Liñan-Rico et al. 2012) nuestro grupo de trabajo en estudios previos ha sugerido que en la neuronas mientéricas de cobayo existe una gran población de receptores P2X que tiene un alta sensibilidad al ATP y que probablemente constituida por la subunidad P2X2, ya que se detectó mRNA para P2X2 en un porcentaje de neuronas mientéricas mayor al 90% (Valdez-Morales et al. 2011; Liñan-Rico et al. 2012). En este sentido también se ha reportado la expresión del receptor P2X2 en subtipos específicos de neuronas mientéricas de cobayo, entre las que se encuentran neuronas motoras inhibitorias, neuronas secretomotoras no colinérgicas y neuronas aferentes primarias, sin embargo, se distinguieron dos poblaciones de células unas con inmureactividad fuerte y otras con una débil (**Figura 6**), aunque no se reporta la cantidad de neuronas que presentan una inmunoreactividad débil, pareciera que 30% de la neuronas presentan una inmunoreactividad fuerte (Castelucci et al. 2002).



## 1.6 El gen del receptor P2X2

Se considera que el gen del P2X2 de mamíferos posee 11 exones y 10 intrones (Brändle et al. 1997) y está localizado en el cromosoma 5 en el ratón y cromosoma 12 en rata y humano, en todas las especies de mamíferos, los genes del receptor P2X2 se caracterizan por contener solo intrones cortos de 100 a 300 pb (en otras especies, los intrones pueden tener hasta 20 kb). El producto proteínico de este gen consiste en 471 aminoácidos para la isoforma completamente procesada y se encuentra bien conservada entre sus ortólogos con una identidad proteica del 75%-95%. (Liñan-Rico et al. 2012). El proceso de retirada de los intrones y conexión de los exones se conoce como edición (en inglés, splicing). A veces un mismo transcrito primario o pre-ARNm se puede editar de diversas maneras, y permite que con un solo gen se obtengan varias proteínas diferentes; a este fenómeno se le llama variante de edición (splicing alternativo), este se clasifica en cuatro diferentes tipos de ediciones; omisión de exón; sitios de edición alternativo 5' o 3'; exones mutuamente excluyentes y de retención de intrones (**Figura 7**).

En el órgano cortical de cobayo se ha clonado la subunidad P2X2 completamente procesada y dos variantes de edición alternativas, P2X2-1, P2X2-2 y P2X2-3, en donde las primeras dos difieren en la longitud del extremo C-terminal y la tercera tiene 2 aminoácidos adicionales en el dominio extracelular, todas son capaces de formar receptores homoméricos con diferentes propiedades funcionales (Parker et al. 1998), también se han registrado otras variantes en ratón (Koshimizu et al. 2006) y rata (Brändle et al. 1997). Recientemente en nuestro grupo de trabajo se logró secuenciar dos subtipos de P2X2 (P2X2-1a; P2X2-2b), conocidos como canónico y variante de edición respectivamente. Sin embargo, nuestros estudios no

han demostrado que ambas se encuentran presentes en intestino de cobayo y que presentan farmacologías distintas; en la **Figura 8** se describe la organización de las dos subunidades.

No se conoce agonistas o antagonistas que reconozcan selectivamente los receptores P2X2 homoméricos, pero se ha reportado que el único receptor de la familia P2X en que la respuesta al ATP aumenta acidez de la solución extracelular, así como por la aplicación de zinc (North and Surprenant 2000) sin embargo se han reportado efectos opuestos dependiendo de la especie en el caso de la modulación por zinc.

A pesar de amplios efectos reportados para el zinc en varios canales P2X, su efecto modulador sobre las variantes funcionales de los receptores P2X2 (P2X2-1a y P2X2-2b) encontrados en neuronas de plexo mientérico de cobayo aún son desconocidos.

Un estudio reciente reporta que en las neuronas del sistema nervioso entérico el transportador del zinc número 3 (ZnT3) se encuentra presente en la mayoría de las neuronas y se encuentra co-localizado con un amplio espectro de neurotransmisores sugiriendo que el zinc podría desempeñar un papel importante fisiológico y fisiopatológico (Wojtkiewicz et al. 2012). No se han reportado efectos del zinc en varios canales P2X (P2X2-1a; P2X2-2b) encontrados en neuronas mientéricas de cobayo, pero aún existe mucha información por conocer. Esto es importante debido a que se ha demostrado que los receptores a ATP median la transmisión rápida y se sabe que los receptores P2X modulan otros canales activados por ligando en las neuronas entéricas (Barajas-López et al. 1998, 2002) y

que podrían estar involucrados en procesos patológicos no descritos. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar los efectos de este ion, utilizando concentraciones fisiológicas, en neuronas nativas de plexo mientérico de cobayo y sobre canales homoméricos recombinantes de P2X2 (P2X2-1a; P2X2-2b).

## **1.7 El zinc como nutriente esencial**

El zinc es esencial para múltiples aspectos del metabolismo, la deficiencia del zinc y sus efectos fisiológicos están más relacionados con diversos cambios bioquímicos que con una función específica (King 2011), dada su amplia distribución se sugiere que cumple tres funciones básicas (King and Cousins 2006); la primera es la catalítica como la fosfatasa alcalina, una enzima dependiente de zinc, cuya actividad disminuye con bajas ingestas de zinc; la segunda es una función estructural; los dedos de zinc tienen cisteínas en la estructura general de la proteína que permite que el zinc tenga la facilidad de unirse a otros complejos. La tercera función es la regulación de la expresión genética; los componentes incluyen un factor de transcripción de unión al metal (FTM) y un elemento de respuesta al metal (ERM) en el promotor del gen regulado. El FTM adquiere el zinc en el citosol o núcleo y después interactúa con el ERM para estimular la transcripción (Eide 2006; King and Cousins 2006; Mohommad et al. 2012). Los transportadores de zinc también juegan un papel importante, en el movimiento de este a varios organelos, y de esta manera la regulación de la función celular, como la liberación de neurotransmisores tales como el glutamato de las vesículas sinápticas, que explica la relación entre el zinc y la función cognitiva (King and Cousins 2006), debido a que el zinc es el segundo elemento traza más abundante en el cuerpo y un nutriente esencial para la vida, con

una concentración en de plasma de que va de 10  $\mu\text{M}$  hasta 30  $\mu\text{M}$ , en el cerebro puede alcanzar concentraciones hasta de 10  $\mu\text{g Zn/g}$  de tejido fresco y su concentración intracelular se calcula como 150  $\mu\text{M}$ .

La mayoría de los nutrientes son necesarios para funciones metabólicas, cuando se produce una deficiencia con funciones específicas, las concentraciones tisulares disminuyen y se produce un defecto en una o varias vías metabólicas específicas lo que puede generar la aparición de síntomas clínicos o bioquímicos específicos, lo que es fácil conocer, midiendo las concentraciones de zinc en el tejido apropiado o identificar los signos clínicos específicos, a estos se le consideran nutrientes de tipo 1. Los nutrientes de tipo 2 son necesarios para múltiples funciones metabólicas generales, por lo que responden a ingestas insuficientes de manera diferente por lo que, si se produce una deficiencia, se observa en una caída importante en las concentraciones endógenas y posiblemente una adaptación metabólica para reducir la necesidad de funciones que tienen una gran demanda, entre este tipo de nutrientes se encuentra el zinc (Golden and Golden 1981; King 2011).

El conocimiento de las funciones metabólicas conocidas del zinc, están derivadas de las manifestaciones de su deficiencia (**Tabla 1**), por ejemplo en pacientes con acrodermatitis enteropática (enfermedad hereditaria asociada a una absorción alterada del zinc (**Figura 9**), y las manifestaciones clínicas que se presentan cuando se ejerce cierto estrés en el organismo como las enfermedades hepáticas, que sugiere un cambio en la permeabilidad intestinal, infecciones como peritonitis, liberación de hormonas de estrés, los efectos de la deficiencia son

particularmente obvios en la piel con erupciones eritematosas o placas escamosas (Mohammad et al. 2012).

**Tabla 1. Manifestaciones clínicas de la deficiencia de zinc**

1	Lesiones en la piel
2	Funciones mentales disminuidas, encefalopatía
3	Deterioro de la visión nocturna, metabolismo alterado de la vitamina A
4	Anorexia (Posibles alteraciones en la gusto y olfato)
5	Hipogonadismo
6	Disminución en la curación de heridas
7	Alteración inmune de la función aguda del olfato

(Modificada de Mohammad et al., 2012)

El sistema gastrointestinal es el principal sitio de la regulación de homeostasis del zinc, el mecanismo implica los procesos de absorción del zinc exógeno y la excreción endógena por medio de heces (King et al. 2000).

Se considera al zinc un modulador atípico de canales ionotrópicos en el sistema nervioso central, la noción de que el zinc se almacena y se libera en las neuronas después de una despolarización eléctrica, resalta la importancia en la excitabilidad cerebral con grandes implicaciones farmacológicas y fisiológicas, el zinc se libera desde terminales nerviosas junto con neurotransmisores en el cerebro y tiene el potencial de modular los canales iónicos y activar neurotransmisores (Coddou et al. 2007), como es común para otros canales iónicos activados por ligando, se ha encontrado que los canales P2X pueden ser regulados por sustancias endógenas, en el caso del zinc se ha encontrado que modula las corrientes inducidas por ATP y que su acción depende en gran medida de la composición de la subunidad presente en el receptor y en menor medida de la concentración del metal, son dos los efectos que este metal presenta, ya sea la potenciación o inhibición (Wildman et al. 1999; Huidobro-Toro et al. 2008).

Las subunidades P2X recombinantes ha facilitado el estudio dirigidos a las caracterizaciones de los efectos regulatorios de varios componentes de estos receptores, por instancia el zinc a concentraciones mayores a 100  $\mu\text{M}$  es conocido por su efecto inhibitorio en los receptores P2X1 y P2X7, pero con un efecto bifásico sobre los receptores homoméricos del P2X2 (P2X2-1a previamente conocido como el canónico hasta lo reportado por Liñan-rico, 2012 potencia P2X3 y P2X4 (Nakazawa and Ohno 1997; Virginio et al. 1997; Wildman et al. 1999; King et al. 2000; Clyne et al. 2002).

En receptores nativos el zinc potencia las corrientes inducidas por ATP en neuronas de ganglio nodoso de ratas, pero inhibe las neuronas en ganglios de la raíz dorsal de la rana toro y en neuronas del ganglio pélvico en cobayo (Li et al. 1997; Liu et al. 1999; Zhong et al. 2001)

## **2. JUSTIFICACIÓN**

En el sistema nervioso entérico se ha mostrado la existencia del transportador 3 del zinc, así como en la mayoría de las neuronas y se co-localiza con un amplio número de sustancias involucradas como neurotransmisores (Wojtkiewicz *et al.*, 2012). Lo apoya la hipótesis de que este metal podría jugar un papel importante en la fisiología y patofisiología. A pesar de que los efectos del zinc sobre varios receptores P2X han sido reportados no se conocen sus efectos, a concentraciones fisiológicas, sobre los receptores P2X nativos de neuronas mientéricas y sobre los receptores P2X2 (P2X2-1a y P2X2-2b) expresados por estas neuronas. Esto es importante porque los receptores P2X mientéricos participan en neurotransmisión y pueden interaccionar con otros receptores activados por ligando (Barajas-Lopez *et al.*, 1998; Barajas-Lopez *et al.*, 2002).

## **3. HIPÓTESIS**

Los efectos moduladores del zinc sobre varios receptores P2X apoyan la idea de que este ion modula también los receptores nativos mientéricos del cobayo.

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Caracterizar los efectos de las concentraciones fisiológicas del Zinc en los receptores mientéricos P2X nativos y en los canales recombinantes homoméricos P2X2-1a; P2X2-2b siendo estos los más comunes en neuronas mientéricas de cobayo.



## **5. ANÁLISIS DE DATOS**

Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media. El número de células es representado por la  $n$ , y las curvas concentración respuesta se ajustaron a una función logística.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Equipo y material de laboratorio**

1. Caja de petri Pyrex (Sigma-Aldrich, CLS3160102) con el fondo cubierto con una capa de 5 mm de Sylgard® 184 (Dow Corning Co., Auburn MI).
2. Tijeras rectas de iris (World Precision Instruments).
3. Pinzas suizas rectas #5 (WPI).
4. Microscopio de disección (Nikon, SMZ645).
5. Centrifuga Biofuge, (Cat. Primo R, from Haeraus).
6. Pipetas Pasteur de cuello largo (Corning cat # 7095B-9).
7. Placas de cultivo celular con 24 pozos (Eppendorf, cat # 0030722019)
8. Cubre objetos redondeados de 12 mm (Bellco Glass, Inc. Vineland, NJ).

### **6.2 Reactivos**

1. Suero de cobayo (obtenido en el laboratorio)
2. Colágeno estéril de cola de rata (obtenido en el laboratorio).
3. Hidrobromuro de Poli-D-lisina (Sigma # P-7280)
4. Medio Esencial Mínimo (MEM; Cat. #11700-077-1x10L) de GIBCO Lab (Life Technologies Inc., Grand Island, NY).
5. Se prepararon y almacenaron soluciones de los siguientes reactivos: 200

mM L-glutamina (Sigma cat # G-8540), 1000U/mL penicilina con 1 mg/mL estreptomicina (Sigma, Cat. #P-4333) y 1.5 M glucosa (Sigma, Cat #G-7528).

6. Medio Leibovitz's L-15 (GIBCO Lab, Cat. #41300-039-10x1L).
7. Suero fetal bovino (American Type Culture Collection, Cat #30-2020).
8. Papaína (Worthington Biochemical Co., 35.6 mg P/mL).
9. Colagenasa (Worthington Biochemical Co., 244 U/mg).
10. Dispasa II (Proteasa neutral, Roche cat #164859).
11. L-cisteína (Sigma, Cat #C-7880).
12. Otras sustancias utilizadas: ATP (SIGMA), Zinc (SIGMA). Las soluciones madre fueron preparadas en solución externa. Las concentraciones finales fueron obtenidas por la dilución de estas soluciones con la solución del baño. Fueron almacenadas a -4°C.

### **6.3 Medio de cultivo y otras soluciones**

1. Solución de Krebs modificada, compuesta de con lo (mM): 126 NaCl, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 2.4 CaCl<sub>2</sub>, 4.5 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 11 glucosa; la solución se mantuvo oxigenada constantemente con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>.
2. El medio de crecimiento fue 94.5% MEM adicionado con suero de cobayo (2.5% v/v), L-glutamina (2 mM), penicilina (10 U/mL), estreptomicina (10 µg/mL), glucosa (15 mM) y ARA c/FudR (10 µM).
3. Medio L-15 modificado. Para preparar 100 ml de medio se agrega 87 ml de Leibovitz's L-15 (GIBCO, Cat. #41300-039-10x1L), 10 ml de suero fetal bovino, 1 ml de cada solución madre descrita antes. Así las concentraciones

finales fueron: 2 mM L-glutamina, 15 mM glucosa, 10 U/mL penicilina and 10µg/mL estreptomina.

4. Solución salina balanceada de Hanks'-Colagenasa (libre de calcio/magnesio, GIBCO), adicionado con colagenasa (1 mg/mL) y dispasa (4 mg/ml).
5. Solución salina balanceada Hanks'-Papaina (libre de calcio/magnesio, GIBCO), adicionado con papaína (9 U/mL) activado con L-cisteina (0.4 mg/mL) NaHCO<sub>3</sub> 1 mM (9 U/mL).
6. ATP sal disódica (Sigma-Aldrich) se preparó una solución madre a una concentración de 10 mM en solución externa y se almacenó. Las soluciones de ATP fueron hechas por dilución de la solución madre en solución de registro, se ajustó el pH entre 7.3-7.4.
7. Solución interna, para electrodos de registro (en mM): 140 CsCl; 5.5 NaCl; 10 EGTA; 5 HEPES; 4.5 MgCl<sub>2</sub>; 4.5 ATP-Na 4.5; 0.1 GTP.
8. Cloruro de zinc (Sigma-Aldrich) se preparó una solución madre a una concentración de 10 mM en solución externa y se almacenó. Las concentraciones finales de zinc para los experimentos fueron hechas por dilución de la solución madre en solución de registro, se verificó el pH entre 7.3-7.4.
9. Solución externa de registro (en mM):160 NaCl; 10 Glucosa 5 HEPES; 3 CsCl; 2 CaCl<sub>2</sub> y ajustar el pH a 7.5.

#### **6.4 Preparación de los cultivos primarios**

Cobayos jóvenes de la cepa Hartley (150-250 g) hembra y/o machos, fueron sacrificados por dislocación cervical y desangrados inmediatamente después,

cortando los principales vasos sanguíneos del cuello, los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de cuidado de animales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) y fueron tratados bajo las especificaciones técnicas de producción, cuidado y uso de animales de laboratorio establecidas en la norma oficial NOM-062-ZOO-1999 y sacrificio humanitario de acuerdo a la NOM-033-ZOO-1995.

Se retiró un segmento proximal de yeyuno (aproximadamente 6 cm de longitud), se lavó el contenido y se colocó en solución Krebs modificada y continuamente oxigenada en una placa de petri Pyrex con la parte inferior cubierta con Sylgard® 184, donde el tejido fue fijado con alfileres para ser abierto longitudinalmente con las tijeras de iris y a continuación cortar de manera cuidadosa los bordes para mantener la preparación plana y ligeramente distendida para evitar el desgarre del tejido. Las capas mucosa y submucosa del segmento fueron disecadas, para después retirar la mayor parte de la capa muscular circular, dejando la capa longitudinal con el plexo mientérico integrado en ella.

La preparación mientérica se disoció usando dos tratamientos secuenciales con soluciones enzimáticas (Barajas-López et al. 1996). En ambos casos se incubaron durante 10 minutos a 37° C; el primer tratamiento consistió en la combinación de papaína activada con L-cisteína y 1 mM NaHCO<sub>3</sub>; el segundo consistió el tratamiento de colagenasa tipo 1-dispasa II, las enzimas se inactivaron y centrifugaron a 800 rpm con medio de Leibovitz's L-15 modificado, se desechó el sobrenadante y se conservó la pastilla, este paso se repitió dos veces, a la pastilla se le agregó Medio Mínimo Esencial y se colocó sobre cubreobjetos redondeados previamente tratados con poli-D-lisina o colágena de cola de rata estéril en cajas

Petri de 24 pozos. Los experimentos se llevaron a cabo a partir de las 24 h después de la disociación neuronal hasta dos días después para evitar el crecimiento de neuritas. Los experimentos se realizaron en presencia de Cs<sup>+</sup> para disminuir la activación de las corrientes de los canales de potasio durante la aplicación de los compuestos.

## **6.5 Registros de Patch Clamp**

Se sabe que el ATP modula los canales de membrana moduladas por potasio, de las neuronas por la vía de activación de las proteínas G (Barajas-López et al. 2000), esto para disminuir la participación de las corrientes de membrana distintas a las mediadas por la activación de los receptores P2X, utilizamos Cs<sup>+</sup> (un bloqueador de los canales de potasio) durante los experimentos que a continuación se describen.

Se realizaron registros electrofisiológicos a partir de las 24 h de cultivo, se utilizó la técnica de patch clamp en la configuración de célula completa. Las corrientes de membrana fueron registradas usando un amplificador Axopatch 1D; todos los experimentos se realizaron con una fijación de voltaje de -60 mV.

El voltaje se ajustó usando pipetas de vidrio para Patch clamp de 100  $\mu$ M y una resistencia de 1-4 M $\Omega$ . Para todos los experimentos, las pipetas se llenaron con solución interna, las corrientes inducidas fueron grabadas en una computadora personal con el software Axoscope (Molecular Devices Corporation 1311 Orleans Drive Sunnyvale, California 94089), estas corrientes fueron inducidas por el cambio rápido de la solución externa alrededor de la célula, utilizando un dispositivo de ocho tubos, cada uno de ellos conectado a una jeringa conteniendo la solución de lavado

o la solución experimental, este movimiento rápido usando un micromanipulador (WR-88, Narishigue, Scientific Instruments Lab, Tokio, Japón).

La cámara de registro se perfundió continuamente con solución externa con un caudal de 2 mL por minuto aproximadamente, las soluciones experimentales se aplicaron utilizando un sistema de multi-jeringas que permiten cambios rápidos entre soluciones control y experimentales, las neuronas se perfundieron constantemente colocando los tubos con solución control frente a la célula que está siendo registrada y la aplicación externa de sustancias experimentales se consiguió cambiando rápidamente la ubicación de los tubos frente a la célula, la duración de cada aplicación fue de 5 s aproximadamente, se ajustaron los volúmenes para evitar la variación de la velocidad de flujo. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (aproximadamente 23° C).

## **6.1 Expresión heteróloga**

### ***6.1.1 Análisis de secuencia genómica de los receptores P2X2***

La secuencia genómica y cDNA que codifican para los receptores P2X2 fueron obtenidos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y de la base de datos del Ensembl (<http://www.ensembl.org>).

Las estructuras del exón-intron del gen del P2X2 se derivó de la alineación de la secuencia del cDNA genómico u obtenido directamente del NCBI.

Los receptores P2X2-2b (canónico) y el P2X2-1a (variante de splicing) fueron obtenidos como se reporta previamente (Liñan-Rico et al. 2012). El intrón 11 se conserva en el último receptor, del cual se ha observado es el responsable de diferentes propiedades farmacológicas y fisiológicas entre estos receptores. Estas

secuencias de cDNA fueron enviadas al GenBank como P2X-1a (ID:FJ641871) y P2X2-2b (ID:FJ641872).

### **6.1.2 Preparación de ovocitos de *Xenopus laevis***

Las ranas fueron anestesiadas por inmersión en solución de 10 mM de Tricaina (3-etil éster ácido aminobenzoico; sigma aldrich, MX) y los ovocitos fueron removidos por disección. Los ovocitos en etapa V-VI fueron manualmente desfoliculados y colocados en una solución salina de almacenamiento conteniendo solución Barth's (en mM): 88 mM NaCl; 0.33mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 1mM KCl; 0.41 mM CaCl<sub>2</sub>; 0.82 mM MgSO<sub>4</sub>; 2.4 mM NaHCO<sub>3</sub> y 10mM HEPES, a un pH entre 7.2 y 7.4 ajustado con una solución de 5N NaOH. La cola de poliA del mRNA de P2X2 fue sintetizada con T7 mensajero y mMachine (Life Technologies, Texas, USA). El mRNA fue disuelto en agua libre de RN-asas a una concentración final de aproximadamente 1 µg/µL, alícuotado y almacenado a -70°C hasta su uso. Las células fueron inyectadas en diferentes grupos de ovocitos por cada experimento. La inyección de P2X2-1a/P2X2-2b se realizó en una proporción 1:1.

### **6.1.3 Registros electrofisiológicos en ovocitos**

Las corrientes inducidas por ATP ( $I_{ATP}$ ) en ovocitos fueron registrados usando fijación de voltaje con dos electrodos con un amplificador Axoclamp 2B (Molecular Devices Corporation Sunnyvale, California 94089). Las pipetas de cristal fueron usadas como electrodos de registro (0.3-0.8 MΩ de resistencia) las cuales fueron llenadas con solución interna de 2M KCl y 10 mM de EGTA. Las  $I_{ATP}$  (corrientes generadas por ATP) fueron registradas con una fijación de voltaje de -60 mV y a temperatura ambiente (21°-24° C).

#### **6.1.4 Soluciones y reactivos de aplicación**

Las soluciones de ATP se realizaron en concentraciones de (1-100 mM), estas fueron preparadas diariamente en solución Krebs modificada (Ver medio de cultivo y otras soluciones). La solución de cloruro de zinc (1-10 mM) fue preparada usando agua desionizada y almacenada a -20°C. La concentración final de aplicación fue obtenida por medio de la dilución de las soluciones antes descritas, previamente a su aplicación. El pH fue ajustado a 7.3 con NaOH 5N cuando se requirió.

#### **6.1.5 Aplicación de sustancias**

El ATP fue aplicado generalmente de 5 a 15 s hasta alcanzar la corriente máxima y fue lavado entre aplicaciones de al menos 3 minutos. Para cada maniobra experimental usamos al menos tres lotes de ovocitos de diferentes ranas. Cada ovocito fue colocado en la cámara de registro, la cual era perfundida de manera continua, con solución externa estandarizada para ovocitos, con un flujo de 3 mL/min: 88 mM NaCl 88; 2mM KCl ; 1mM CaCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub> y 5 mM HEPES; el pH fue ajustado entre 7.2 – 7.4 con una solución de 5N NaOH entre 7.2-7.4.

Durante la aplicación de sustancias, la solución para perfundir la célula era cambiada de manera continua por medio de un dispositivo de ocho tubos, cada uno de estos tubos conectados a una jeringa la cual contenía un control y la solución experimental. El tubo contenido con la solución control fue colocada al frente de la célula registrada, y la aplicación externa de las sustancias fue aplicada por el movimiento rápido hacia otro de los tubos en frente de la célula estudiada, el cual había drenado previamente la solución.

Los tubos fueron colocados frente a la célula utilizando un micromanipulador **Figura 10 A** (WR-88; Narishigue Scientific Instrument Lab., Tokyo Japan). Las



sustancias fueron removidas por lavado mediante el movimiento de los tubos de aplicación rápida **Figura 10 B**, regresando al tubo control, la solución externa fue aplicada por gravedad y los niveles de las jeringas ajustados regularmente con la finalidad de mantener los niveles de fluido **Figura 10 C**.

## 7. RESULTADOS

### **Las corrientes mediadas por ATP actúan en receptores P2X nativos de neuronas mientéricas de cobayo**

Las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas de las corrientes activadas por ATP ( $I_{ATP}$ ) en modo célula completa en neuronas entéricas ha sido caracterizada previamente y son mediadas por la activación de canales catiónicos no específicos (Barajas-Lopez, 1993) Usando la solución interna estándar, el ATP indujo entradas de corriente en 65 (87%) de las 75 neuronas registradas. Los valores de  $EC_{50}$  para el ATP fueron de 28  $\mu$ M. La amplitud de las corrientes inducidas por 300  $\mu$ M de ATP varió de célula a célula, pero la amplitud se mantuvo alrededor de 1-3 nA. EL pico medio de la amplitud de estas corrientes fue de  $-1.7 \pm 0.24$  nA respectivamente.

### **Efectos del zinc en los receptores P2X nativos de neuronas mientéricas**

El zinc inhibió de 1-30  $\mu$ M de las corrientes inducidas por ATP (**Figura 11 A y 11 C**) o las potenció (**Figura 11 B y 11 D**) a concentraciones de 10  $\mu$ M de ATP. Efectos potenciadores como inhibidores fueron observados en aplicaciones secuenciales como se muestra en la **Figura 11 C y 11 D**, la aplicación consistió en el siguiente orden y se realizó con el movimiento rápido de los tubos de aplicación; ATP > ATP + Zinc > ATP y también cuando las neuronas fueron pretratadas de 15 a 60 s con zinc se observaron respuestas como las que se muestran en las **Figura 11 C y 11 D**. Sin embargo, a bajas concentraciones (10  $\mu$ M) ambos efectos llegaron a ser igual de evidentes, como se puede observar en la **Figura 12 A**, sin embargo, a concentraciones de 30  $\mu$ M solamente se observa el efecto inhibitorio. Ambos efectos

fueron vistos en la misma neurona con diferentes concentraciones de ATP (Figuras 11 a y b).

Tales efectos del zinc no fueron dependientes de la concentración (Los datos no se muestran). Sin embargo, cuando graficamos la corriente observada en función de concentración de zinc (**Figura 12 B**) existió una correlación entre la amplitud del efecto inhibitorio y la concentración de zinc. Debido a que el efecto inhibitorio fue observado únicamente con 30  $\mu\text{M}$  de zinc, nosotros investigamos si esta inhibición era dependiente de la concentración.

La **Figura 14** muestra las corrientes inducidas por ATP como una función de la concentración de ATP (100-300  $\mu\text{M}$ ) en la ausencia y la presencia de 30  $\mu\text{M}$  de zinc, como puede notarse, el efecto inhibitorio prácticamente desaparece a 300  $\mu\text{M}$  de ATP.

Estas curvas de concentración respuesta de ATP producen una  $EC_{50}$  de 24 (control) y 450 (en Zn 30  $\mu$ M) cuando se ajusta a una función sigmoideal. Ambos efectos del zinc fueron completamente reversibles al removerse del tubo de aplicación.

### **Efectos del zinc en heterómeros de P2X2-1a y P2X2-2b**

Los efectos de Zn 1-10  $\mu$ M en corrientes inducidas por ATP 10  $\mu$ M fueron estudiados en ovocitos expresando canales heterómeros de P2X2-1a (n=25) o P2X2-2b (n=48).

La **Figura 15** muestra los efectos inhibidores, potenciadores o no efecto sobre las corrientes inducidas por ATP tales que fueron observadas en todos los canales.

En los resultados se pudieron obtener dos de los efectos, las **Figuras 16 A y C** se muestran los más comunes, en donde se observó la potenciación en 20% e inhibición en un rango entre 50% - 80% de los ovocitos evaluados que expresaban los canales heteroméricos. El efecto inhibitorio parece ser el más prominente cuando las concentraciones de zinc estuvieron en concentraciones que iba de 3  $\mu$ M hasta 10  $\mu$ M y parece ser dependiente de la concentración. Mientras que el efecto potenciador se mostró como una forma de campana las cual pareciera ser dependiente de la concentración (**Figuras 16 B y D**). El zinc no tuvo efecto en menos de 20% de los ovocitos como se muestra en las Figuras 16 A y C.

## 8. DISCUSIÓN

Este es el primer trabajo que describe el efecto bifásico del zinc en receptores nativos P2X en neuronas de plexo mientérico de cobayo, y en las dos variantes de P2X2 homoméricos funcionales presentes en neuronas mientéricas. Aunque no fue posible determinar si ambos efectos fueron dependientes de la concentración pudimos concluir que el efecto inhibitorio estaba mediado por antagonismo competitivo y que parece ser dependiente de la concentración de zinc.

Es probable que el efecto potenciador este mediado por cambios alostéricos inducidos por el zinc en los receptores P2X de células mientéricas, efecto que se observó con mayor frecuencia a concentraciones bajas.

Para ambas variantes del P2X2, el efecto inhibitorio fue el predominante. Si embargo la magnitud del efecto potenciador sobre las variantes del P2X2 es igual al efecto inhibitorio. Ambos efectos reportados probablemente estén mediados por diferentes sitios de unión presentes en ambas variantes del P2X2.

Aunque se ha descrito que el zinc potencia los efectos de ATP en receptores P2X mientéricos nativos de ratones no hay evidencia que demuestre inhibición en estas en neuronas de guinea pig (Wildman et al. 1998). El zinc inhibe virtualmente los seis receptores homoméricos funcionales y potenciación únicamente para P2X2 (en ratas, pero no en humanos) P2X3, P2X4 Y P2X5 (Coddou et al. 2011). Similar a lo que observamos con las variantes de P2X2, el zinc indujo la potenciación con mayor frecuencia a bajar concentraciones mientras que la inhibición ocurrió con mayor frecuencia a altas concentraciones.

No fue posible determinar el mecanismo de potenciación, pero demostramos que el efecto inhibidor probablemente este mediado por un antagonismo competitivo

y que depende de la concentración. Por lo tanto, los efectos inhibitorios del zinc incrementaron con el aumento de las concentraciones de Zinc o ATP. Considerando que solo se observó inhibición a concentraciones de ATP  $\geq 100\mu$  cuando el ATP cuando el ATP podría estar activando diferentes conjuntos de receptores mientéricos P2X.

De acuerdo con esta hipótesis se ha propuestos que las actividades moduladoras del Zinc en los receptores P2X dependen principalmente de la composición de la subunidad P2X y en menor medida de la concentración del Zinc (Huidobro Toro et al. 2008).

Por lo tanto, nuestros hallazgos, indican que la acción moduladora del zinc en los receptores P2X depende principalmente de la composición de la subunidad del receptor P2X y en menor medida de la concentración de Zinc (Huidobro-Toro et al. 2008). En ratas el efecto modulador del zinc más reportado es la potenciación, que aumenta las  $I_{ATP}$  hasta 20 veces (Wildman et al. 1998) la cual puede ser eludida mediante ciertas mutaciones únicas de histidina y alanina (His120A o His213A) (Clyne et al. 2002). Sin embargo, en los receptores P2X humanos el efecto más común es la inhibición un efecto que se atenúa por mutaciones individuales (H204A e H209A) y una mutación puntual (R225C) el cuál es suficiente para otorgarle al receptor potenciación (Tittle and Hume 2008).

Una mutante triple de estos receptores puede generarse por un grupo de histidinas (H204A / H209A / H330A) la cual puede disminuir drásticamente, en aproximadamente 100 veces la inhibición por Zinc en receptores hP2X2 (Punthambaker et al. 2012). Además, el P2X1 de rata es inhibido por Zinc, mientras que el receptor rP2X3 se encuentra potenciado (Wildman et al. 1999).

Estos hallazgos apoyan nuestra hipótesis de que el efecto dual del Zinc está siendo mediado por sitios de unión independientes, es este sentido existe otra sustancia que tiene una modulación dual de los receptores P2X mientéricos de cobayo, la suramina que tiene la propiedad de activar dos diferentes sitios de unión, en este mismo ensayo los autores también informan que las respuestas de la suramina solo tienen efectos inhibidores sobre los receptores P2X mientéricos murinos (Guerrero-Alba et al. 2010).

A bajas concentraciones ( $\mu\text{M}$ ) el efecto inhibitorio en ambas variantes de P2X2 es más frecuente que la potenciación cuando los canales fueron estimulados con  $10 \mu\text{M}$  de ATP, lo que nos sugiere que el sitio de unión que media la inhibición es más sensible. Dichos hallazgos contrastan con los observados en las neuronas mientéricas donde las mismas concentraciones bajas de Zinc inducían una potenciación más frecuente en las  $I_{\text{ATP}}$ , lo que nos sugiere que en los receptores nativos P2X están involucradas otras subunidades, por ejemplo, P2X3 y P2X4, que como previamente hemos demostrado se encuentran presentes en estas neuronas (Castelucci et al 2002; Linan-Rico 2012; Nieto-Pescador et al 2013; Loera Valencia et al 2014). En este sentido con la interpretación se ha propuesto que la acción moduladora del Zinc de los receptores P2X depende principalmente de la composición de la subunidad del receptor (Huidobro-Toro et al 2008), ya que se sabe que el Zinc tiene efectos bifásicos en los receptores tanto en P2X3 como en P2X4 (Wildman et al 1999; Coddou et al 2007). De acuerdo con la hipótesis de que los receptores mientéricos P2X no solo están constituidos no solo por los P2X2, el hecho de que la suramina inhibe ambas variantes recombinantes P2X2, sino que también tiene un efecto dual sobre los sobre los receptores mientéricos P2X

(Guerrero-Alba et al 2010). La inmunoreactividad para P2X5 (Ruan y Busnstock 2005) y P2X6 (Yu et al. 2010) fue reportada en neuronas entéricas de roedores y es probable que al menos uno de los efectos de Zinc mostrados en este trabajo esté mediados por estas subunidades. Sin embargo, también es posible que existan diferentes sitios de unión para ATP en una subunidad determinada y que estos sitios estén modulados de manera diferencial por el Zinc. De esta manera nuestro grupo ha informado que los receptores P2X1 tienen dos sitios de unión de ATP que se distinguen claramente a través de su afinidad con el ATP y los diferentes tipos de corrientes generadas (Lopez-Lopez et al 2016). Los receptores P2X7 también están presentes en las neuronas mientéricas pero debido a que estos receptores se activan a concentraciones de ATP mayores de 300  $\mu$ M, es poco probable contribuyan a las  $I_{ATP}$ , descritas en este trabajo.

Debido a que los receptores nativos P2X a menudo muestran propiedades farmacológicas complejas es probable que se formen canales heteroméricos en las neuronas mientéricas y que genere como resultado muchas conformaciones. Con el hecho que, las herramientas farmacológicas son aún escasas y que a menudo dependen y se diferencian en cada especie hace difícil determinar con precisión la población de canales que podrían estar mediando los efectos del Zinc en los canales P2X nativos. Además, diferentes estequiometrias podrían conferir nuevas propiedades a los canales, como se mostró anteriormente en nuestro grupo de trabajo (Jaramillo-Polanco et al 2016), lo que dificulta aún más la tarea. Nuestras observaciones, sin embargo, sugieren que en los receptores P2X2, están mediando al menos en parte los efectos del Zinc en las  $I_{ATP}$  en las neuronas mientéricas, la cual nos ha generado la posibilidad de estudiarlos en estudios futuros.



El hecho de que los efectos del Zinc se observan a bajas concentraciones ( $\mu\text{M}$ ) sugiere que es tenga implicaciones fisiológicas o fisiopatológicas reales.

La evidencia fisiológica indica que el sistema nervioso entérico, los receptores P2X2 se expresan en las neuronas, donde desempeñan un papel en la neurotransmisión sináptica rápida (Galigan y Bertrand 1994). Con una concentración plasmática de 10-30  $\mu\text{M}$  el Zinc podría ser capaz de modular la transmisión mediada por ATP, sin embargo la concentración plasmática de Zinc libre podría ser mucho menor (Huidobro-Toro; Toth 2011). Sin embargo, en la hendidura sináptica se cree que el Zinc alcanza concentraciones por encima de 10  $\mu\text{M}$  (Sindreu y Storm 2011).

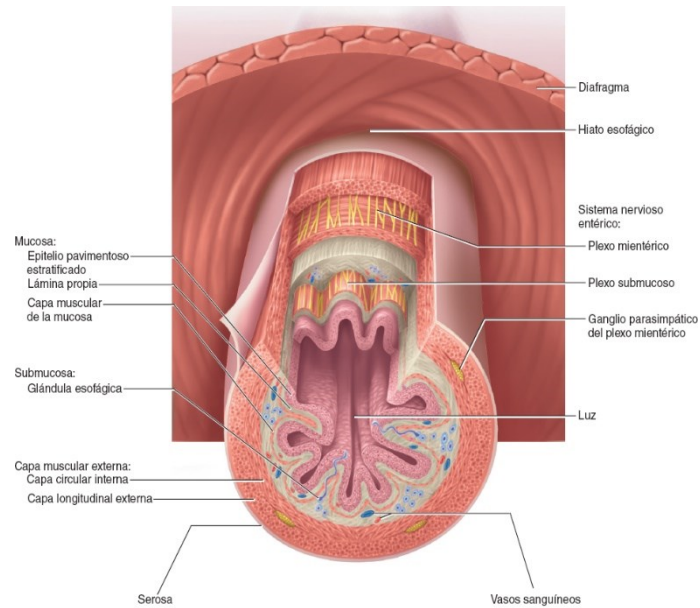
La evidencia de que el Zinc se puede liberar de las neuronas entéricas proviene del hecho de que la proteína específica de que el transportador de Zinc 3 está presente en muchas neuronas entéricas (Wojtkiwicz et al 2012). Esta proteína transfiere el Zinc del espacio citoplasmático a las vesículas sinápticas, cuyo contenido se libera durante la neurotransmisión. La inmunoreactividad del transportador de Zinc 3 incrementa las condiciones inflamatorias que apoyan la idea de que esta proteína desempeña un papel en estas condiciones patológicas.

De acuerdo con esta hipótesis, la suplementación con Zinc se ha probado contra la diarrea aguda en modelos animales, sin embargo, los estudios de control en humanos indican que se requiere una mejor comprensión de las bases mecánicas de los efectos del Zinc en la diarrea aguda (Kulkarni et al 2012).

En conclusión, el Zinc tiene propiedades farmacológicas distintivas en los receptores nativos P2X de neuronas entéricas de cobayo en comparación con los canales homoméricos P2X2-1a y P2X2-1b. El zinc tiene efectos inhibidores y

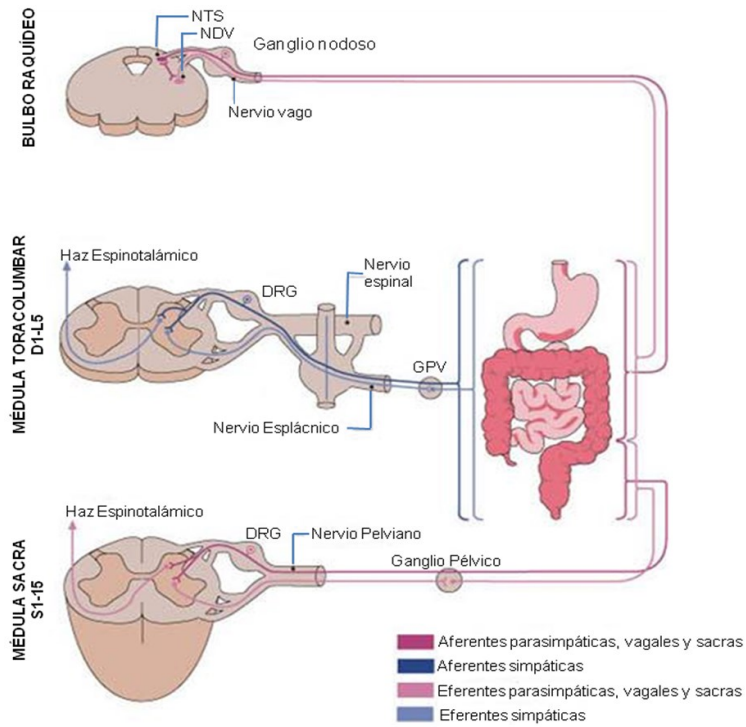
potenciadores sobre estos receptores recombinantes que podrían estar mediados por dos sitios de unión distintos. Todos nuestros datos indican que los receptores P2X mientéricos de cobayo tienen una farmacología más compleja que la de los receptores P2X2 recombinantes lo que probablemente esté relacionado con la presencia de otras subunidades en las neuronas mientéricas de guinea pig.

## 9. FIGURAS



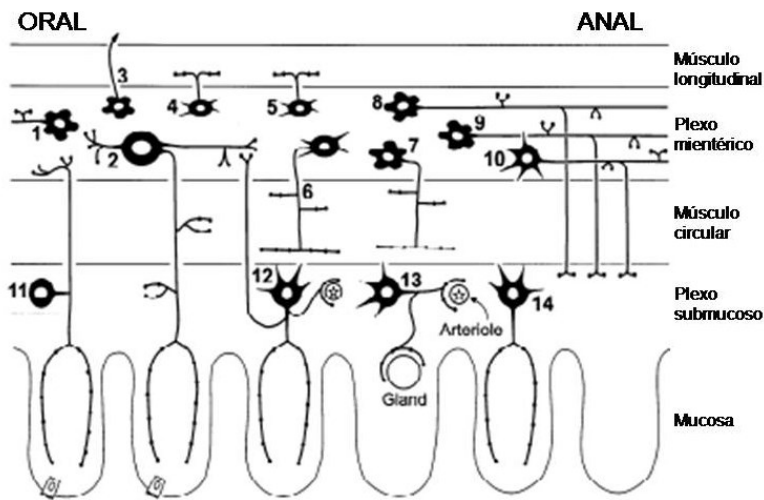
**Figura 1. Esquema de un corte transversal de un segmento de intestino**

Localización de los plexos mientérico y submucoso entre las capas de la pared intestinal (Modificada de Saladin, 2014).



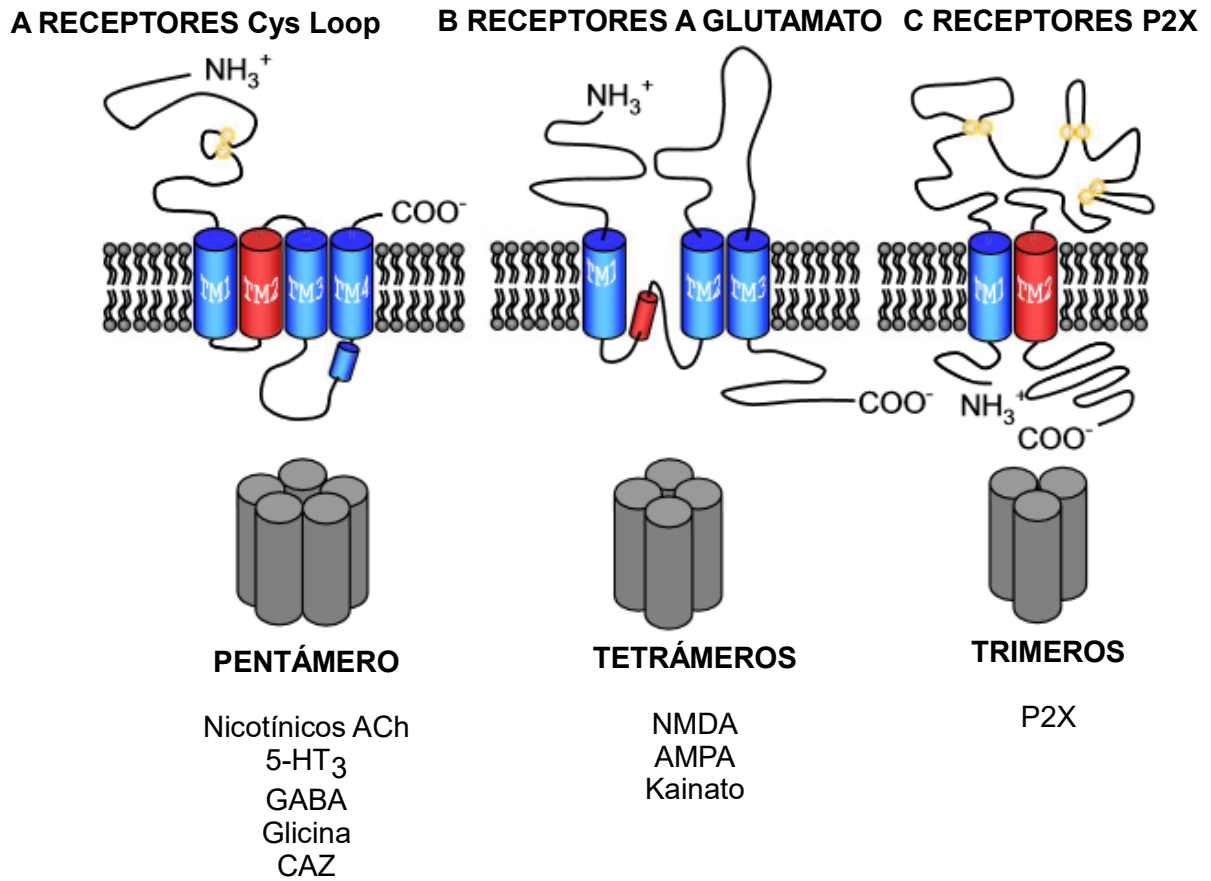
**Figura 2. Vías aferentes y eferentes de los sistemas simpático y parasimpático**

NTS: núcleo del tracto solitario. DRG: ganglio de la raíz dorsal. NDV: núcleo dorsal del vago. GPV: ganglios prevertebrales (celíaco, m. superior, m. inferior, pélvico). (Modificado de Kandel et al., 2000).



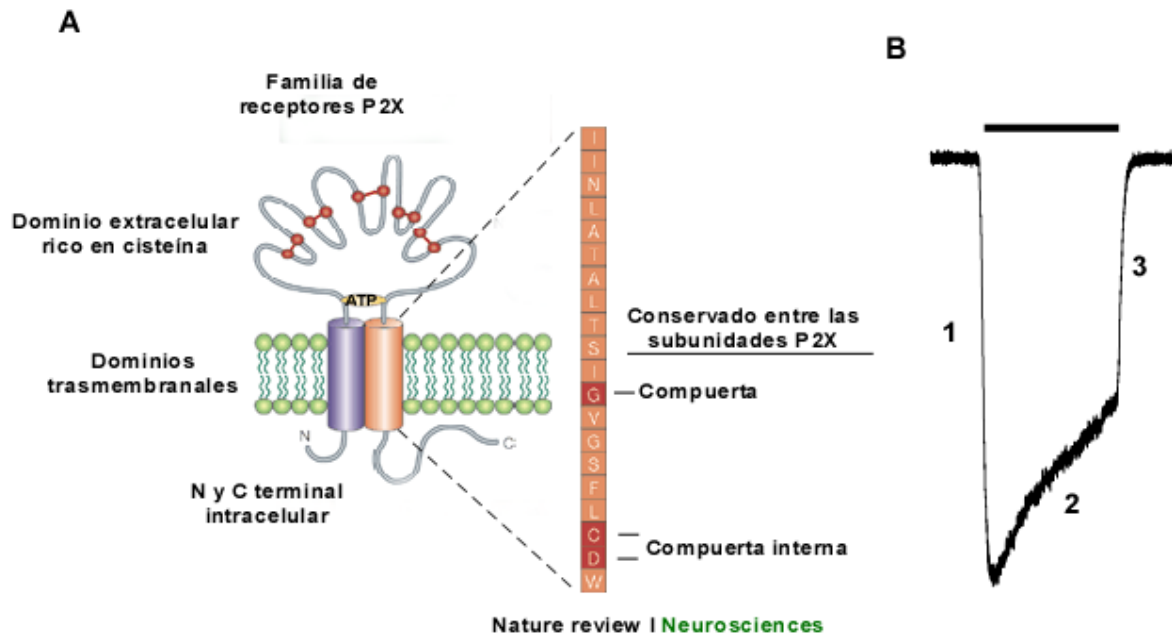
**Figura 3. Tipos de neuronas del intestino de cobayo**

(1) interneuronas ascendentes; (2) IPAN mientérica; (3) neurona intestinofugal; (4) motoneurona longitudinal excitatoria; (5) motoneurona longitudinal inhibitoria; (6) motoneurona circular excitatoria; (7) motoneurona circular inhibitoria; (8) interneurona descendente (reflejo local); (9) interneurona descendente (reflejo secretomotor); (10) interneurona descendente (MMC); (11) IPAN submucosa; (12) neurona secretomotora y vasodilatadora no colinérgica; (13) neurona secretomotora y vasodilatadora colinérgica; (14) neurona secretomotora (no vasodilatadora) colinérgica (Furness 2000).



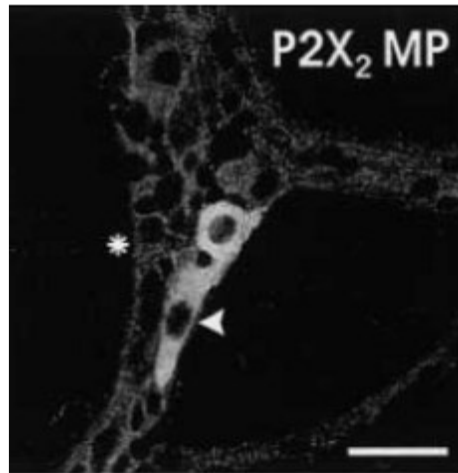
**Figura 4. Esquema estructural representativo de los tres grupos de canales iónicos regulados por ligando**

A. La familia de receptores pentaméricos Cys-Loop, que comprende a los receptores nicotínicos, 5-hidroxitriptamina, ácido gama-aminobutírico, a glicina, y los canales activados por zinc. B. Familia de receptores a glutamato, que incluye a los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y kainato. C. Familia de receptores purinérgicos conformada por trímeros, los receptores P2X.



**Figura 5. Topología y registro típico de los P2Xr**

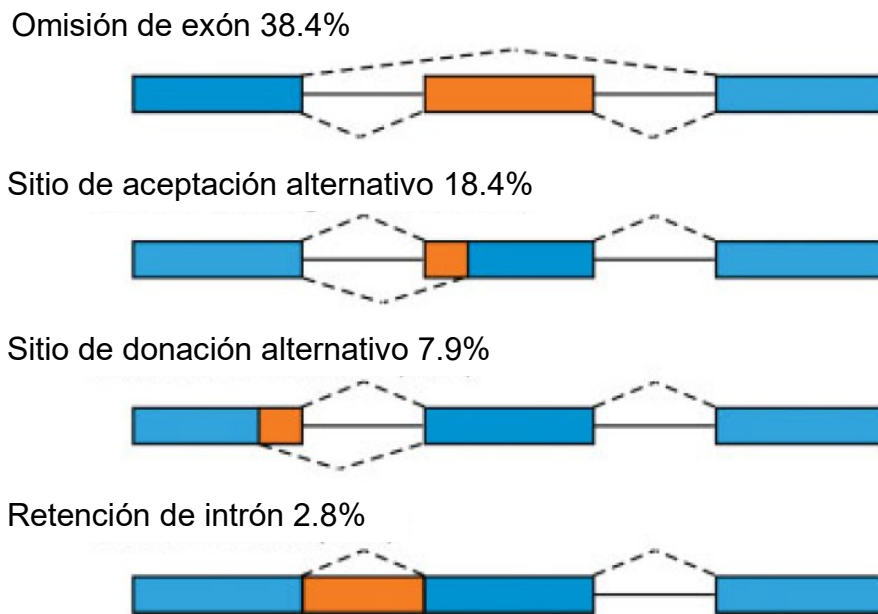
A. Todas las subunidades comparten la misma topología, poseen dos dominios transmembranales (TM1 y TM2) y un dominio extracelular con 10 cisteínas conservadas, en la parte intracelular un amino y un carboxilo. B. Registro de una corriente típica de los P2XR, activación de los canales por la aplicación rápida de la agonista seguida de una desensibilización en presencia de este, y una caída de la corriente al retirar el agonista.



**Figura 6. Presencia de P2X2 en neuronas mientéricas**

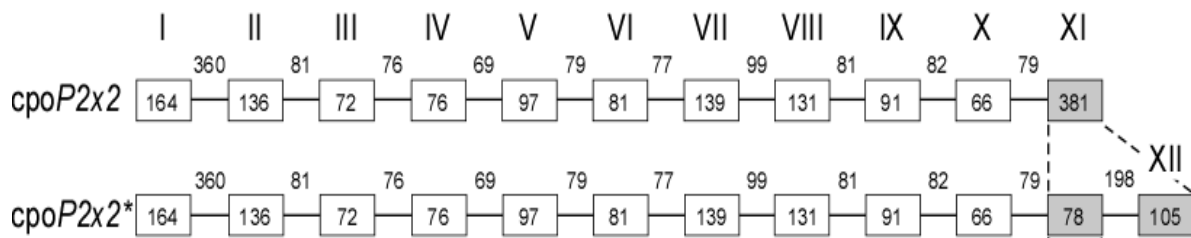
Inmunoreactividad observada por medio de imágenes confocales de ganglios mientérico de íleon. Se muestran neuronas con inmunorreactividad fuerte (flecha) y débil (asterisco). La barra representa una escala de 25  $\mu\text{m}$  (Castelucci *et al.*, 2002).





**Figura 7. Formas de edición alternativa**

Los cuatro tipos de edición alternativa más comunes. La prevalencia de cada tipo está conservada en humanos y ratones y se muestran entre paréntesis, el restante representa ediciones alternativas ms complejas. Los exones constitutivos se muestran en azul; las regiones empalmadas en naranja, los intrones con líneas continuas, y las discontinuas indican las opciones de empalme (Modificado de Kim, *et al.*, 2008).



**Figura 8. Variantes de P2X2 intestinales, modelo de estructura génica**

Representación esquemática de la organización exón-intrón del gen del P2X2. Superior: primera organización canónica descrita del P2X2 de cobayo (*cpoP2X2*), que consta de 11 exones y 10 intrones. Los exones e intrones de la región ORF se representan como cajas y líneas respectivamente. Los números indican la longitud (pb) en cada caso. Inferior Nuevo modelo de organización genómica del P2X2 propuesto por Liñan-Rico et al., 2012 (*cpoP2X2\**) en el que el exón XI (marcado en gris) se divide en los exones XI y XII, separados por el intrón 11 (Modificado de Liñan-Rico et al., 2012).



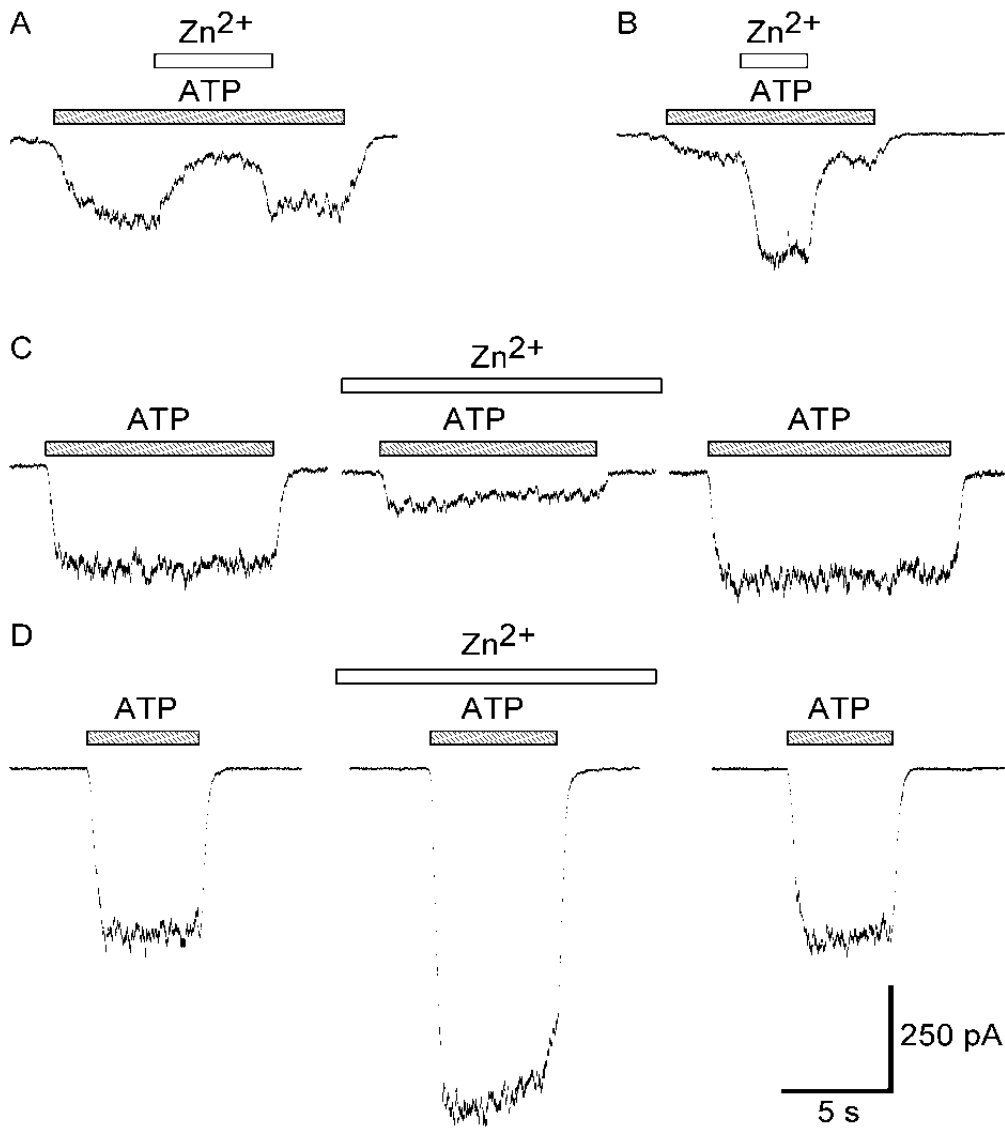
**Figura 9. Paciente de siete meses de edad con diagnóstico de acrodermatitis enteropática**

Dermatosis en párpados superiores, región perioral, pabellón auricular izquierdo, como resultado de deficiencia de zinc (Martínez-Bustamante et al. 2017).



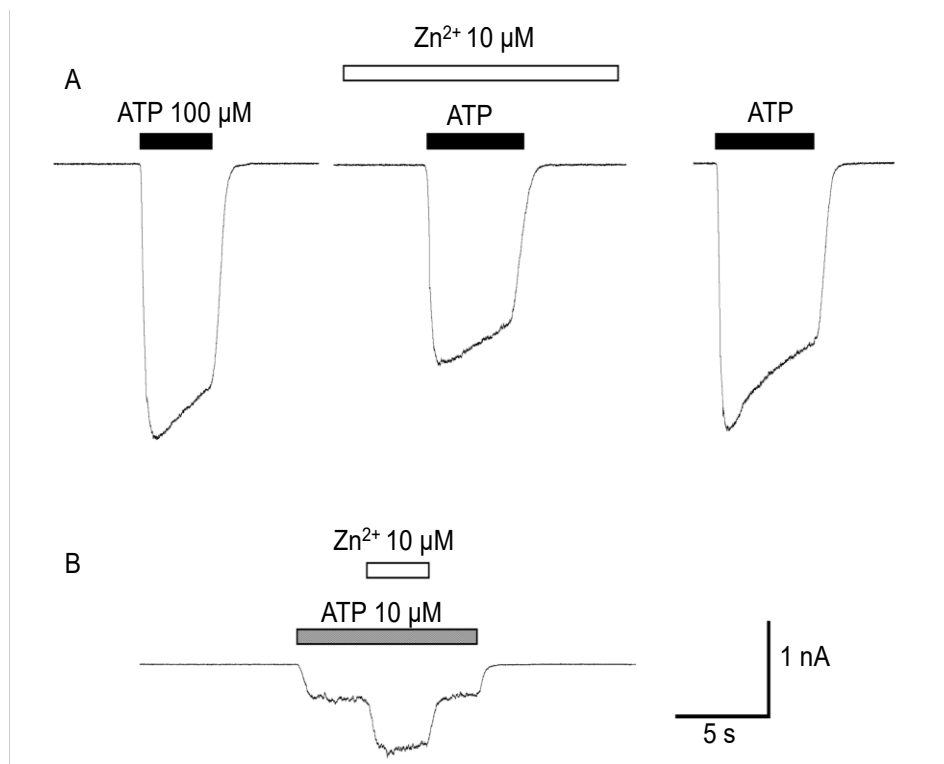
**Figura 10. Instrumentos utilizados para la aplicación de sustancias**

A) micro manipuladores para el movimiento fino de las mangueras con las sustancias a aplicar. B) Tubos de aplicación rápida de sustancias, cada uno se usa para las distintas aplicaciones. C) jeringas para contener y medir el flujo de las sustancias aplicadas.



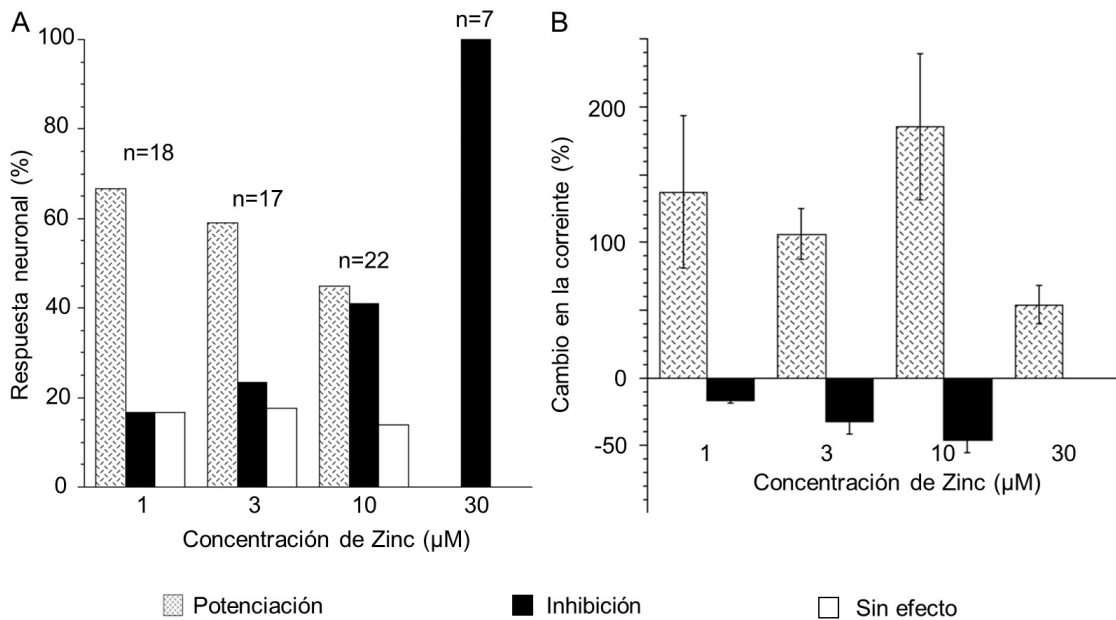
**Figura 11. El zinc tiene un efecto potenciador e inhibitor en neuronas de plexo mientérico de cobayo**

Figuras A y B. Las aplicaciones secuenciales (ATP > ATP+Zinc > ATP) inducen efectos opuestos en diferentes neuronas. Figuras C y D. El pretratamiento de 15 a 60 segundos también tiene efectos opuestos en diferentes neuronas. Fueron inducidas corrientes por ATP 10  $\mu$ M y zinc a la misma concentración.



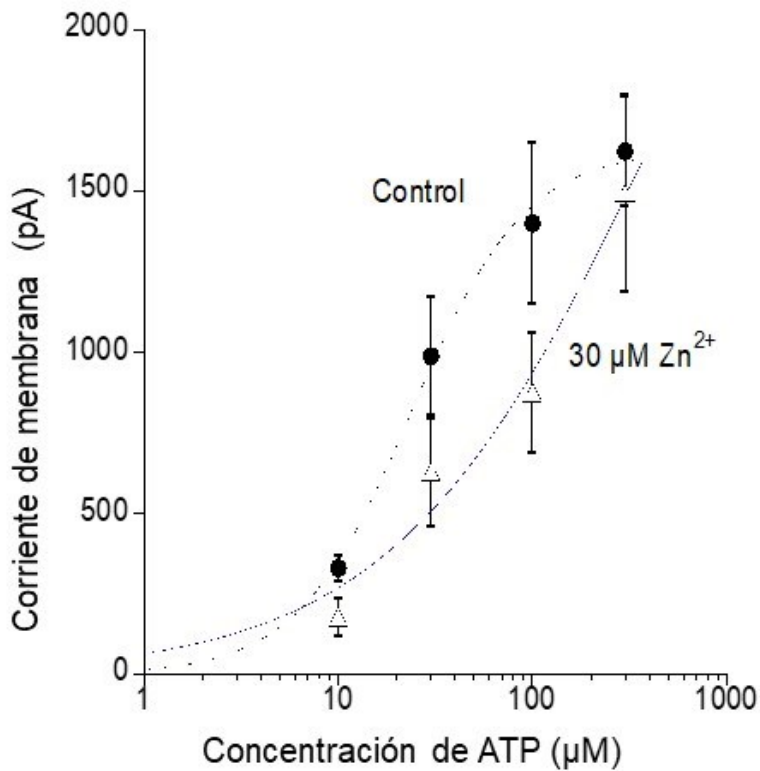
**Figura 12. El zinc tiene acciones potenciadoras e inhibitorias en la misma neurona de plexo mientérico de cobjayo con diferentes concentraciones de ATP**

La figura A muestra el registro de una neurona con un tratamiento previo con zinc el cual inhibe las corrientes inducidas por ATP (100  $\mu\text{M}$ ) de manera reversible. Sin embargo, en esta misma neurona la activación de las corrientes inducidas por ATP con el agonista en más bajas concentraciones (10  $\mu\text{M}$ ) resulta en una potenciación de la corriente mediada por el zinc (Figura B). Cada neurona se fijó a un potencial de membrana de -60 mV (n=6).



**Figura 13. Gráficas de la respuesta de células a la aplicación de concentraciones crecientes de zinc**

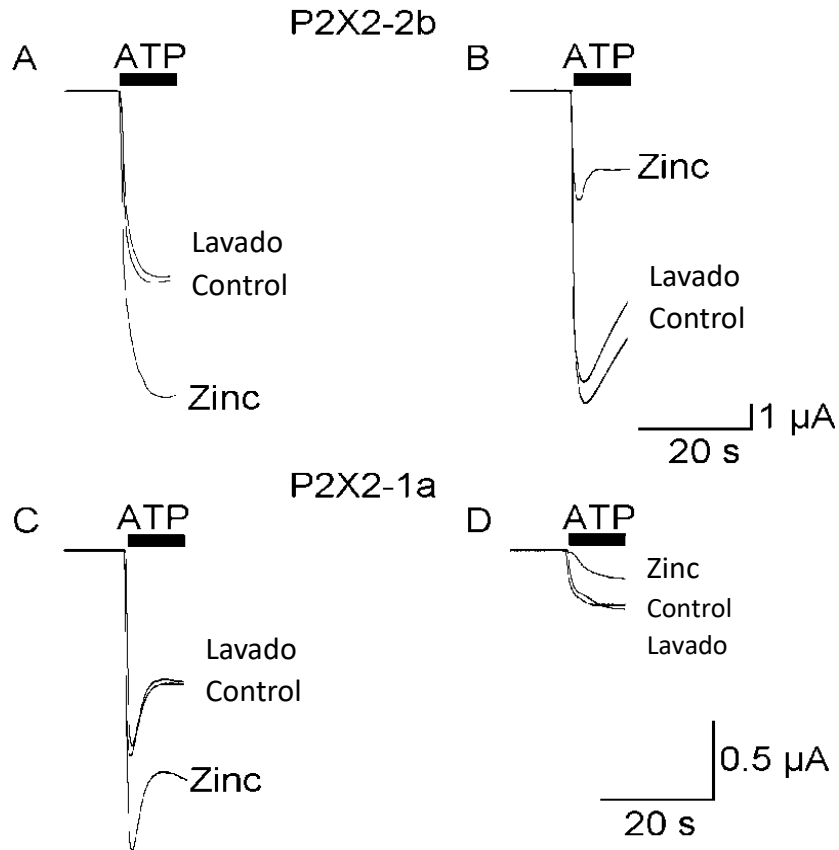
Las células se fijaron a un potencial de membrana de -60 mV. A. La proporción de neuronas mientéricas que responden a zinc. A bajas concentraciones el zinc con mayor frecuencia una potenciación de las corrientes inducidas por ATP, pero a 30  $\mu\text{M}$  induce corrientes de inhibición. La figura B muestra el cambio de magnitud producido por las diferentes concentraciones de zinc en corrientes inducidas por ATP.



**Figura 14. Inhibición por zinc de receptores P2X de neuronas de plexo mientérico por antagonismo competitivo**

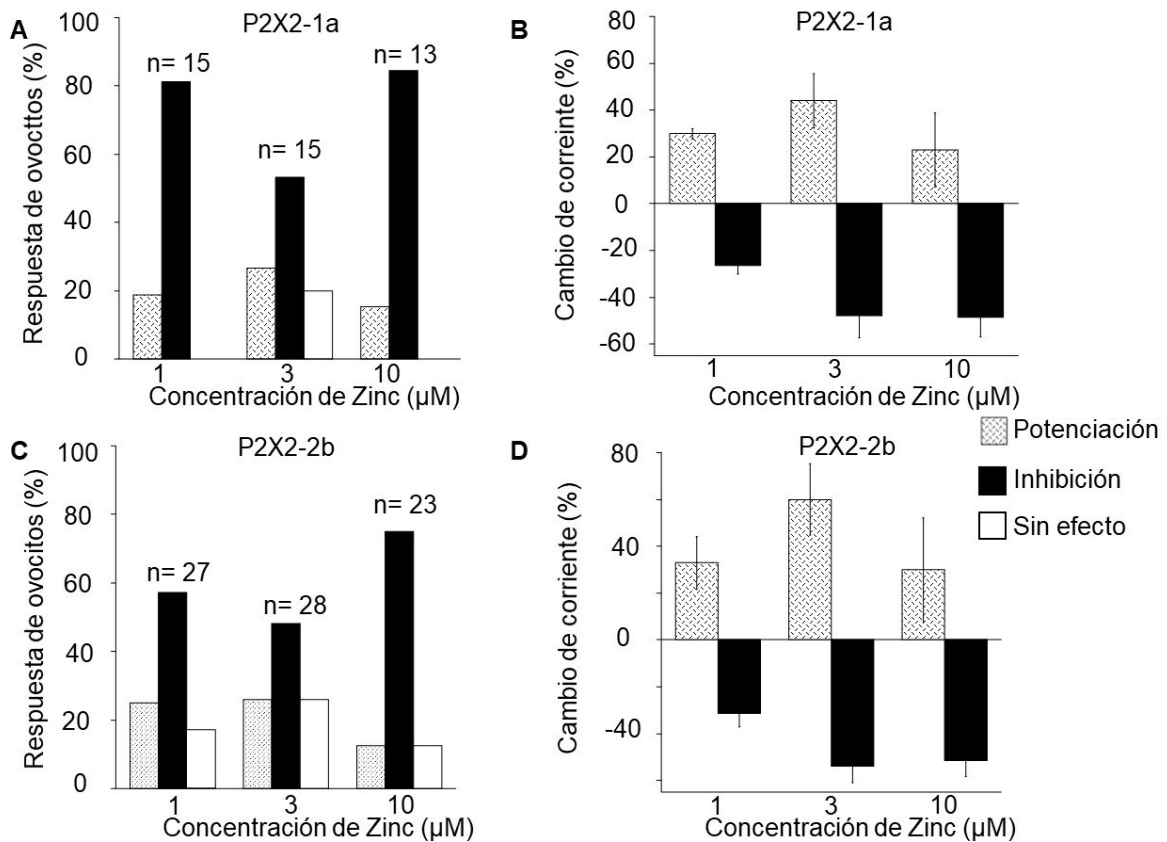
La curva concentración-respuesta en ausencia y presencia de Zn 30 µM. La inhibición por zinc en neuronas de plexo mientérico de cobayo fue abolida al aumentar la concentración de ATP, lo que sugiere que este efecto está mediado por antagonismo competitivo. Cada marca es el promedio de 4-neuronas. El potencial de membrana fue fijado a -60 mV.





**Figura 15. El efecto del zinc sobre los heterómeros P2X2-1a y P2X2-2b**

Los efectos son similares a los observados en los P2X de las neuronas de plexo mientérico de cobayo. Rastros representativos de corrientes inducidas por ATP de las corrientes registradas en ovocitos de *Xenopus laevis* expresando los receptores P2X2-2b (Figuras A y B) o P2X2-1a (Figuras C y D). El potencial de membrana fue fijado a -60 mV.



**Figura 16. Respuesta del zinc en homómeros de P2X2-1a; P2X2-2b**

Las barras horizontales sobre la línea indican la aplicación de 10  $\mu\text{M}$  de ATP. (A) y (C) muestran la distribución de frecuencias del porcentaje de neuronas que mostraron inhibición y potenciación por zinc. Las figuras (B) y (D) muestran la magnitud del cambio producido por diferentes concentraciones de zinc en corrientes inducidas por ATP.

## 10. REFERENCIAS

- Barajas-López C, Espinosa-Luna R, Christofi FL (2000) Changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> by activation of P2 receptors in submucosal neurons in short-term cultures. *Eur J Pharmacol* 409:243–257. doi: 10.1016/S0014-2999(00)00848-7
- Barajas-López C, Espinosa-Luna R, Zhu Y (1998) Functional interactions between nicotinic and P2X channels in short-term cultures of guinea-pig submucosal neurons. *J Physiol* 513:671–683. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.671ba.x
- Barajas-López C, Montañó LM, Espinosa-Luna R (2002) Inhibitory interactions between 5-HT<sub>3</sub> and P2X channel in submucosal neurons. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 283:
- Barajas-López C, Peres AL, Espinosa-Luna R (1996) Cellular mechanisms underlying adenosine actions on cholinergic transmission in enteric neurons. *Am J Physiol* 271:C264--C275
- Brändle U, Spielmanns P, Osteroth R, et al (1997) Desensitization of the P2X<sub>2</sub> receptor controlled by alternative splicing. *FEBS Lett* 404:294–298. doi: 10.1016/S0014-5793(97)00128-2
- Burnstock G (2013) Introduction and perspective, historical note. *Front Cell Neurosci* 7:. doi: 10.3389/fncel.2013.00227
- Castelucci P, Robbins HL, Poole DP, Furness JB (2002) The distribution of purine P2x<sub>2</sub> receptors in the guinea-pig enteric nervous system. *Histochem Cell Biol* 117:415–422. doi: 10.1007/s00418-002-0404-4
- Clyne JD, Lapointe LD, Hume RI (2002) The role of histidine residues in modulation of the rat P2X<sub>2</sub> purinoceptor by zinc and pH. *2*:347–359. doi:

10.1013/jphysiol.2001.013244

- Coddou C, Acuña-Castillo C, Bull P, Huidobro-Toro JP (2007) Dissecting the facilitator and inhibitor allosteric metal sites of the P2X<sub>4</sub> receptor channel: Critical roles of CYS132 for zinc potentiation and ASP138 for copper inhibition. *J Biol Chem* 282:36879–36886. doi: 10.1074/jbc.M706925200
- Coddou C, Yan Z, Obsil T, et al (2011) Activation and Regulation of Purinergic P2X Receptor Channels. *Pharmacol Rev* 63:641–683. doi: 10.1124/pr.110.003129
- Costa M, Brookes SJ, Hennig GW (2000) Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 47 Suppl 4:iv15–9; discussion iv26. doi: 10.1136/GUT.47.SUPPL\_4.IV15
- Eide DJ (2006) Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1763:711–722
- Frederickson CJ, Koh JY, Bush AI (2005) The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6:449–462
- Furness JB (2000) Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81:87–96
- Furness JB, Costa M (1980) Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience* 5:1–20. doi: 10.1016/0306-4522(80)90067-6
- Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, et al (2006) Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 452:513–537
- Golden MHN, Golden BE (1981) Effect of zinc supplementation on the dietary intake, rate of weight gain, and energy cost of tissue deposition in children recovering from severe malnutrition. *Am J Clin Nutr* 34:900–908
- Huidobro-Toro JP, Lorca RA, Coddou C (2008) Trace metals in the brain: Allosteric

- modulators of ligand-gated receptor channels, the case of ATP-gated P2X receptors. *Eur Biophys J* 37:301–314. doi: 10.1007/s00249-007-0230-7
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000) *Principles of Neural Science*
- King J, Cousins R (2006) Zinc. In: *Modern Nutrition in Health and Disease*. p 2069
- King JC (2011) Zinc: An essential but elusive nutrient. *Am J Clin Nutr* 94:679–684. doi: 10.3945/ajcn.110.005744
- King JC, Shames DM, Woodhouse LR (2000) Zinc and Health : Current Status and Future Directions Zinc Homeostasis in Humans 1. *J Nutr* 130:1360–1366
- Koshimizu T, Kretschmannova K, He ML, et al (2006) Carboxyl-terminal splicing enhances physical interactions between the cytoplasmic tails of purinergic P2X receptors. *Mol Pharmacol* 69:1588–1598. doi: 10.1124/mol.105.019802
- Li C, Peoples RW, Weight FF (1997) Inhibition of ATP-activated current by zinc in dorsal root ganglion neurones of bullfrog. *J Physiol* 505:641–653. doi: 10.1111/j.1469-7793.1997.641ba.x
- Liñan-Rico A, Jaramillo-Polanco J, Espinosa-Luna R, et al (2012) Retention of a new-defined intron changes pharmacology and kinetics of the full-length P2X2 receptor found in myenteric neurons of the guinea pig. *Neuropharmacology* 63:394–404. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.04.002
- Liu M, Dunn PM, King BF, Burnstock G (1999) Rat chromaffin cells lack P2X receptors while those of the guinea-pig express a P2X receptor with novel pharmacology. *Br J Pharmacol* 128:61–68. doi: 10.1038/sj.bjp.0702790
- Loera-Valencia R, Jimenez-Vargas NN, Villalobos EC, et al (2014) Expression of P2X3 and P2X 5 myenteric receptors varies during the intestinal postnatal development in the guinea pig. *Cell Mol Neurobiol* 34:727–736. doi:

10.1007/s10571-014-0055-8

Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, et al (1999) Molecular and functional characterization of human P2X(2) receptors. *Mol Pharmacol* 56:1171–81. doi: 10.1124/MOL.56.6.1171

Nieto-Pescador et al (2013) P2X4 subunits are part of P2X native channels in murine myenteric neurons. *Eur J Pharmacol* 709:93–102. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.03.045

Martínez-Bustamante ME, Peña-Vélez R, Almanza-Miranda E, et al (2017) Acrodermatitis enteropática. *Bol Med Hosp Infant Mex* 74:295–300. doi: 10.1016/j.bmhmx.2017.05.002

Mohammad MK, Zhou Z, Cave M, et al (2012) Zinc and liver disease. *Nutr Clin Pract* 27:8–20. doi: 10.1177/0884533611433534

Nakazawa K, Ohno Y (1997) Effects of neuroamines and divalent cations on cloned and mutated ATP-gated channels. *Eur J Pharmacol* 325:101–108. doi: 10.1016/S0014-2999(97)00107-6

NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999\\_220801.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf) Consultado 2018.

NORMA Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203456/NOM-033-SAGZOO-2014\\_260815.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203456/NOM-033-SAGZOO-2014_260815.pdf) Consultado 2018.

North R a, Surprenant a (2000) Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev*

- Pharmacol Toxicol 40:563–580. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.40.1.563
- North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82:1013–1067. doi: 10.1152/physrev.00015.2002
- Parker MS, Larroque ML, Campbell JM, et al (1998) Novel variant of the P2X2 ATP receptor from the guinea pig organ of Corti. *Hear Res* 121:62–70. doi: 10.1016/S0378-5955(98)00065-3
- Purves D (2004) *Neuroscience*
- Saladin K (2014) *Anatomy & Physiology: The Unity of Form and Function*. *Anat Physiol Unity Form Funct* 1248. doi: 10.1007/174
- Simon J, Kidd EJ, Smith FM, et al (1997) Localization and Functional Expression of Splice Variants of the P2X 2 Receptor. *248:237–248*
- Squire LR, Bloom FE, Spitzer NC, et al (2008) *Fundamental Neuroscience*
- Valdez-Morales E, Guerrero-Alba R, Liñán-Rico A, et al (2011) P2X7 receptors contribute to the currents induced by ATP in guinea pig intestinal myenteric neurons. *Eur J Pharmacol* 668:366–372. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.07.019
- Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A (1997) Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36:1285–1294. doi: 10.1016/S0028-3908(97)00141-X
- Wildman SS, King BF, Burnstock G (1999) Modulation of ATP-responses at recombinant rP2X4 receptors by extracellular pH and zinc. *Br J Pharmacol* 126:762–768. doi: 10.1038/sj.bjp.0702325
- Wojtkiewicz J, Gonkowski S, Rowiak M, et al (2012) Neurochemical Characterization of Zinc Transporter 3-Like Immunoreactive (ZnT3+) Neurons in the Intramural Ganglia of the Porcine Duodenum. *J Mol Neurosci* 48:766–

776. doi: 10.1007/s12031-012-9855-9

Wood JD (2007) Neuropathophysiology of functional gastrointestinal disorders.

World J Gastroenterol 13:1313–1332. doi: 10.3748/wjg.v13.i9.1313

Zhong Y, Dunn PM, Burnstock G (2001) Multiple P2X receptors on guinea-pig pelvic

ganglion neurons exhibit novel pharmacological properties. Br J Pharmacol

132:221–233. doi: 10.1038/sj.bjp.0703778



## 11. ANEXOS

### Artículo publicado

Liliana H. Méndez-Barredo, Jessica G. Rodríguez-Meléndez, Karen S. Gómez-Coronado, Raquel Guerrero-Alba, Eduardo E. Valdez-Morales, Rosa Espinosa-Luna, Alma Barajas-Espinosa, Carlos Barajas-López. 2018.  
**“Physiological Concentrations of Zinc Have Dual Effects on P2X Myenteric Receptors of Guinea Pig”**

**Cellular and Molecular Neurobiology Vol. 38: 1439-1449. doi: 10.1007/s10571-018-0612-7. Epub 2018 Aug 14**

**DOI: <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0612-7>**