

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**El receptor P2X4 del cobayo presenta un cambio
puntual que altera su fenotipo**

Tesis que presenta
Néstor Nivardo Jiménez Vargas

Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias en Biología Molecular

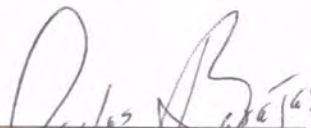
**Director de la Tesis:
Dr. Carlos Barajas López**

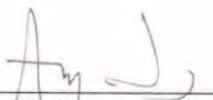
IPICYT, San Luis Potosí, SLP, Abril 2014

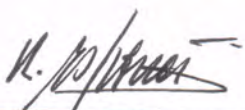


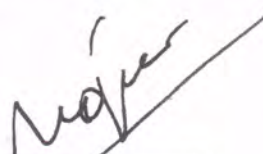
Constancia de aprobación de la tesis

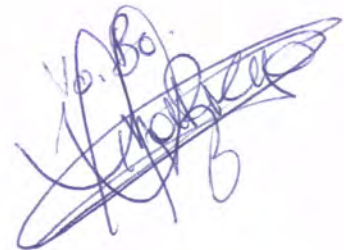
La tesis “**EL RECEPTOR P2X4 DEL COBAYO PRESENTA UN CAMBIO PUNTUAL QUE ALTERA SU FENOTIPO**” presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Néstor Nivardo Jiménez Vargas** y aprobada el **26 de marzo de 2014** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

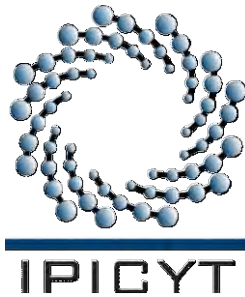

Dr. Carlos Barajas López
(Director de la tesis)


Dr. Ataulfo Martínez Torres
(Miembro del Comité Tutoral)


Dr. Ricardo Espinosa Tanguma
(Miembro del Comité Tutoral)


Dr. Ruben H López Revilla
(Miembro del Comité Tutoral)





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 con fondos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto: SEP-134687-S-3163 y Proyecto: 81409).

Durante la realización del trabajo el autor recibió las beca académica No: 239777 (doctoral) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, así como de apoyo especial (interna) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



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 068 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 4 días del mes de abril del año 2014, se reunió a las 14:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Presidente	IPICYT
Dr. Ricardo Espinosa Tanguma	Secretario	UASLP
Dr. Ataulfo Martínez Torres	Sinodal externo	UNAM
Dr. Carlos Barajas López	Sinodal	IPICYT

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

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Néstor Nivardo Jiménez Vargas

sobre la Tesis intitulada:

El receptor P2X4 del cobayo presenta un cambio puntual que altera su fenotipo

que se desarrolló bajo la dirección de


Dr. Carlos Barajas López

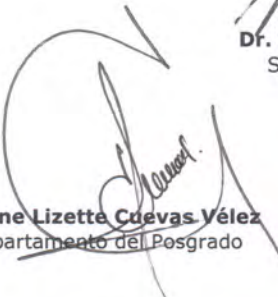
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 15:25 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 4 días del mes de abril de 2014.


Dr. Marcial Bonilla Marin
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



DEDICATORIA

Dedico cada esfuerzo, a mi familia, a mis padres Francisco Jiménez Rodríguez y Bertha Vargas Sandoval a mis hermanos Mariela, Josué y Franbert que han confiado y me han apoyado siempre y que junto conmigo han finalizado esta etapa. A Mabel Guzmán Rodríguez quien ha estado conmigo en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el laboratorio de neurobiología bajo la dirección del Dr. Carlos Barajas López a quien agradezco sinceramente su dedicación, así como su tiempo y paciencia para enseñarme y asesorarme, al igual que las facilidades para la realización de este proyecto, también agradezco el apoyo y consejo técnico de Rosa Espinosa Luna y a cada uno de los compañeros del laboratorio de neurobiología por su paciencia, consejos y enseñanzas durante mi formación.

Al comité tutorial por su tiempo para la asesoría durante la realización de este trabajo.

Agradezco a mi familia por su apoyo incondicional en cada momento de mi vida, a Mabel Guzmán Rodríguez y a todos mis amigos, que siempre han velado por mí, muchas gracias.

CONTENIDO

PORTADA.....	i
CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS	ii
CRÉDITOS INSTITUCIONALES	iii
ACTA DE EXAMEN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
CONTENIDO	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS	xi
ABREVIACIONES.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
1 Introducción.....	1
1.1 Sistema nervioso entérico	1
1.1 Transmisión sináptica en el sistema nervioso entérico.....	3
1.2 Aspectos generales de los canales iónicos activados por ligando (LGIC) 6	
1.3 Señalización purinérgica.....	8
1.4 Receptores canal P2X.....	8
1.5 Topología y estructura de los receptores P2X.....	9
1.6 Propiedades biofísicas y farmacológicas de los receptores P2X.....	15
2 Antecedentes	18
2.1 Receptor P2X4	18
2.2 Planteamiento del problema	20

3	Justificación.....	21
4	Hipótesis	22
5	Objetivos	23
5.1	Objetivo general.....	23
5.2	Objetivo particular.....	23
6	Materiales y métodos	24
6.1	Cultivos primarios de neuronas mientéricas	24
6.2	Registros de <i>Patch-Clamp</i>	25
6.3	Procesamiento del tejido para la extracción de ARN y proteínas	25
6.4	Purificación de células mononucleares (MC).....	26
6.5	Amplificación por RT-PCR y clonación del <i>orf</i> de P2X4R.....	26
6.6	Western blot.....	27
6.7	Inmunohistoquímica de cultivos primarios de neuronas mientéricas .	28
6.8	Inmunoprecipitación.....	29
6.9	RT-PCR de célula única	29
6.10	Modelado molecular	30
6.11	Reactivos y soluciones	31
6.12	Análisis de datos.....	31
6.13	Cuadros complementarios.....	32
7	Resultados	34
7.1	Efecto de la ivermectina (IVM), etanol y suramina sobre canales P2X nativos de neuronas mientéricas	34
7.2	Clonación del <i>orf</i> de P2X4 del cobayo.....	36
7.3	El receptor P2X4 se expresa en diferentes tejidos del cobayo	37
7.4	El intestino delgado del cobayo presenta dos variantes de splicing del receptor P2X4.....	40

7.5	El ARNm de P2X4R se expresa en la gran mayoría de las neuronas del plexo mientérico en cultivo.....	41
7.6	Inmunorreactividad para el receptor P2X4 en neuronas mientéricas	42
7.7	Los RNAm de P2X2, P2X3, P2X4 y P2X5 coexisten en la misma neurona mientérica	47
8	Discusión.....	50
9	Conclusiones.....	59
10	Referencias	60
11	Apendice A.....	71
12	Apendice B.....	76
13	Apendice C.....	86
14	Apendice D.....	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la organización del sistema nervioso entérico en el intestino delgado.....	2
Figura 2. Micrografía electrónica de una sinápsis entre el axón y una dendrita de dos neuronas mientéricas del íleon del cobayo.....	4
Figura 3. Representación esquemática de las tres categorías estructurales de las subunidades de los canales iónicos activados por ligando (LGIC).	7
Figura 4. Modelo topológico de una subunidad de los receptores P2X mostrando los sitios probables de glicosilación, fosforilación y la formación de enlaces disulfuro.	11
Figura 5. Modelo en listones del cristal del receptor P2X4 del Pez cebra.	12
Figura 6. Modelo en esquemático de una subunidad del receptor P2X4 mostrando el sitio de unión a ATP.....	14
Figura 7. Registros de corriente característicos de canales homoméricos P2X.	15
Figura 8. Registros representativos del efecto de suramina, etanol e ivermectina sobre las corrientes inducidas por ATP.....	19
Figura 9. Efecto de la ivermectina, etanol y suramina sobre los canales nativos P2X de neuronas del plexo mientérico en cultivo.....	36
Figura 10. La proteína y ARNm de P2X4 se expresan en el intestino delgado.	39
Figura 11. Análisis de secuencia de las variantes P2X4 de cobayo.	43
Figura 12. Neuronas mientéricas en cultivo expresan el ARNm y la proteína P2X4.	46
Figura 13. Neuronas mientéricas en cultivo expresan diferentes combinaciones de ARNm y proteína de P2X2, P2X3, P2X4 y P2X5.	49
Figura 14. Modelo en listones del receptor P2X4 de cobayo.	56
Figura 15. Comparación del modelo del receptor P2X4 de cobayo con el del pez cebra en estado cerrado y abierto.	57
Figura 16. Simulación molecular de la interacción del receptor P2X4 con la molécula de Ivermectina.	58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características farmacológicas generales de los receptores P2X.	17
Tabla 2.....	32
Tabla 3.....	33

ABREVIACIONES

ATP trifosfato de adenosina
ATP- γ -S Sal de adenosina 5'-(3-tiotrifosfato) tetralitio
Å Ångström
 $\alpha\beta$ -meATP $\alpha\beta$ -metileno ATP
BzATP Sal de 2'(3')-O-(4-Benzoilbenzoil)adenosina 5'-trifosfato trietilamonio
cDNA DNA de cadena complementaria
Da Dalton
EC₅₀ Concentración que produce el 50% del efecto máximo del agonista
I_{ATP} Corriente(s) inducidas por ATP
IC₅₀ Concentración que produce el 50% del efecto máximo inhibitorio
IVM Ivermectina
LGIC Canales Iónicos Activados por Ligando
MC Células Mononucleares
mRNA Ácido ribonucleico mensajero
mV Milivoltios
nA Nanoamperios
nt Nucleótidos
NCBI Centro Nacional para la Información Biotecnológica
pb Pares de bases
PCR Reacción en cadena de la polimerasa
PPADS Acido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfonico
RT-PCR Reacción de transcripción reversa y amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa
SEM Media del error estándar
SNC Sistema Nervioso Central
SNE Sistema Nervioso Entérico
SNP Sistema Nervioso Periférico
ss Sitio de splicing

ABSTRACT

P2X4 receptor from Guinea pig presents a change that modifies its phenotype

The ATP activated P2X channel receptors are cation permeable and mediate fast excitatory post-synaptic potentials. They are widely distributed in human tissues and are conserved among mammals (guinea pig, mice, rat, dog, chimpanzee, etc.), birds and fish. The P2X4 receptor, on its own, has been involved in a variety of physiological processes. Previously, a potentiating effect has been shown in the ATP evoked currents in guinea pig myenteric neurons by low suramin concentration. Since a similar effect has been reported in recombinant P2X4 receptors in rat and mice, we propose a hypothesis where this subunit is present in most guinea pig myenteric neurons. This is the first study reporting the sequence of the P2X4 guinea pig sequence, which is present in most of the myenteric neurons analyzed. Taken together, the potentiating effect of suramin on the ATP evoked current in these neurons and the co-immunoprecipitation of the P2X4 subunit with other members of the P2X channel family, support the participation of this subunit in the formation of functional channels. Contrary to what is observed in other species, ivermectin and ethanol did not have an effect on the ATP evoked current in myenteric neurons. We associate this effect to particular changes in the amino acid sequence of guinea pig P2X, namely V49L and T57K, which are located in the binding pocket of ivermectin and ethanol.

Keywords: P2X receptors, P2X4 receptor, myenteric neuron, guinea pig, binding pocket, ivermectin/ethanol, suramin, mutation.

RESUMEN

El receptor P2X4 del cobayo presenta un cambio puntual que altera su fenotipo

Los receptores canal P2X activados por ATP son permeables a cationes y median potenciales post sinápticos excitatorios rápidos. Se encuentra ampliamente distribuidos en distintos tejidos del cuerpo humano y se conservan en una gran variedad de mamíferos (cobayo, ratón, rata, perro chimpancé, etc.), aves y peces. Por su parte el receptor P2X4 el cual tiene una amplia distribución en diferentes tejidos, ha sido involucrado en una gran variedad de procesos fisiológicos.

Previamente se ha mostrado un efecto potenciador predominante a bajas concentraciones de suramina en las corrientes evocadas por ATP en las neuronas mientéricas del cobayo. Ya que un efecto similar ha sido reportado únicamente en receptores P2X4 recombinantes de rata y ratón nuestra hipótesis es que ésta subunidad se encuentra presente en la mayoría de las neuronas mientéricas del cobayo.

Este es el primer estudio que muestra la secuencia de la subunidad P2X4 del cobayo, la cual se encuentra en la mayor parte de las neuronas mientéricas. El efecto potenciador de la suramina sobre la corriente inducida por ATP (I_{ATP}) en estas neuronas junto con la co-inmunoprecipitación de esta subunidad con otros miembros de la familia de canales P2X apoya la participación de esta subunidad en la formación de canales funcionales. Contrario a lo que se observó en otras especies, la ivermectina y el etanol no tuvieron efecto sobre la I_{ATP} , lo cual asociamos a un cambio en el aminoácido T57 por K el cual se ubica en el *binding pocket* de la ivermectina y del etanol.

Palabras clave: receptores P2X, receptor P2X4, neurona mientérica, cobayo, *binding pocket* ivermectina/etanol, suramina, mutación.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Sistema nervioso entérico

Las principales funciones del tracto gastrointestinal son la digestión y absorción de nutrientes así como la secreción y absorción de líquido. La motilidad intestinal (contracción y relajación del músculo liso gastrointestinal) tiene una participación importante en éstas funciones. Tanto la motilidad como el transporte de líquidos son regulados por el sistema nervioso entérico (SNE).

El sistema nervioso entérico se encuentra en su totalidad en la pared del tracto gastrointestinal, desde el esófago hasta el ano. Se encarga de controlar directamente el aparato digestivo aunque también se comunica de forma bidireccional con el sistema nervioso central. El SNE es inervado por el sistema nervioso autónomo a través de fibras simpáticas y parasimpáticas, aunque estas son relativamente escasas en relación con el gran número de neuronas entéricas (Brookes, 2001). Si bien el SNE puede parecer relativamente simple en comparación con el sistema nervioso central (SNC), se estima que tiene un gran número de neuronas (80 a 100 millones). Dichos cuerpos neuronales se encuentran en dos plexos ganglionados: el plexo mientérico y el plexo submucoso, ambos plexos contienen neuronas sensoriales, interneuronas y neuronas motoras interconectadas por sinapsis químicas que forman una red de circuitos neuronales (Furness, 2000). El plexo mientérico regula principalmente los movimientos gastrointestinales, se ubica entre el músculo longitudinal y el músculo circular (Kunze *et al.*, 1999). Por su parte el plexo submucoso controla fundamentalmente la secreción, el flujo sanguíneo local y funciones neuroinmunes, este plexo se ubica entre el tejido conectivo del músculo circular y la mucosa del intestino delgado (Furness *et al.*, 1980; Galligan, 2002a) (Figura 1). Las fibras preganglionares parasimpáticas se proyectan hacia los ganglios entéricos del

estómago, el colon, y el recto a través de los nervios vagos, los pélvicos y los espláncnicos. Las fibras simpáticas se originan fundamentalmente en los ganglios paravertebrales y prevertebrales y proyectan a los plexos mientérico y submucoso (Furness *et al.*, 1980).



Figura 1. Representación esquemática de la organización del sistema nervioso entérico en el intestino delgado.

De la serosa a la luz del intestino, el plexo mientérico se encuentra entre el músculo longitudinal y el músculo circular; mientras que el plexo submucosa descansa sobre la capa submucosa, por debajo del músculo circular.

1.1 Transmisión sináptica en el sistema nervioso entérico

Las funciones del sistema nervioso dependen de la actividad de la red de células nerviosas que lo componen, las cuales se comunican rápidamente unas con otras a través de conexiones llamadas sinapsis. Así mismo la comunicación que se da entre sus diferentes tipos de neuronas, en los plexos ganglionados del intestino, es mediada por sinapsis de tipo químico; las cuales ocurre entre células que se encuentran separadas entre sí por una corta distancia (20- 40 nm) como se observa en la Figura 2 (Gabella, 1972; Gray, 1963). Este tipo de transmisión depende de la liberación de un neurotransmisor por la neurona presináptica el cual se une a receptores específicos en la membrana de la célula postsináptica. En la mayoría de las sinapsis la liberación del neurotransmisor se produce en las terminales presinápticas, que son engrosamientos especializados del axón. Las vesículas sinápticas contienen el neurotransmisor y estas se acumulan en regiones especializadas de la membrana presináptica conocidas como *zonas activas* (Figura 2) (Goyal *et al.*, 2013; Gray, 1963; Katz, 2003). Durante la descarga de un potencial de acción presináptico, el Ca^{2+} fluye en la terminal presináptica vía canales de calcio activados por voltaje que se encuentran anexos a las zonas activas. El incremento de calcio intracelular promueve que las vesículas se fusionen con la membrana presináptica y liberen su neurotransmisor a la hendidura sináptica. Las moléculas de neurotransmisor liberadas difunden a través del espacio sináptico y se unen con su receptor específico, ubicados en la membrana postsináptica (Bennett *et al.*, 1995; Katz, 2003). Permiten la generación de potenciales postsinápticos rápidos los cuales pueden ser inhibitorios o excitatorios.

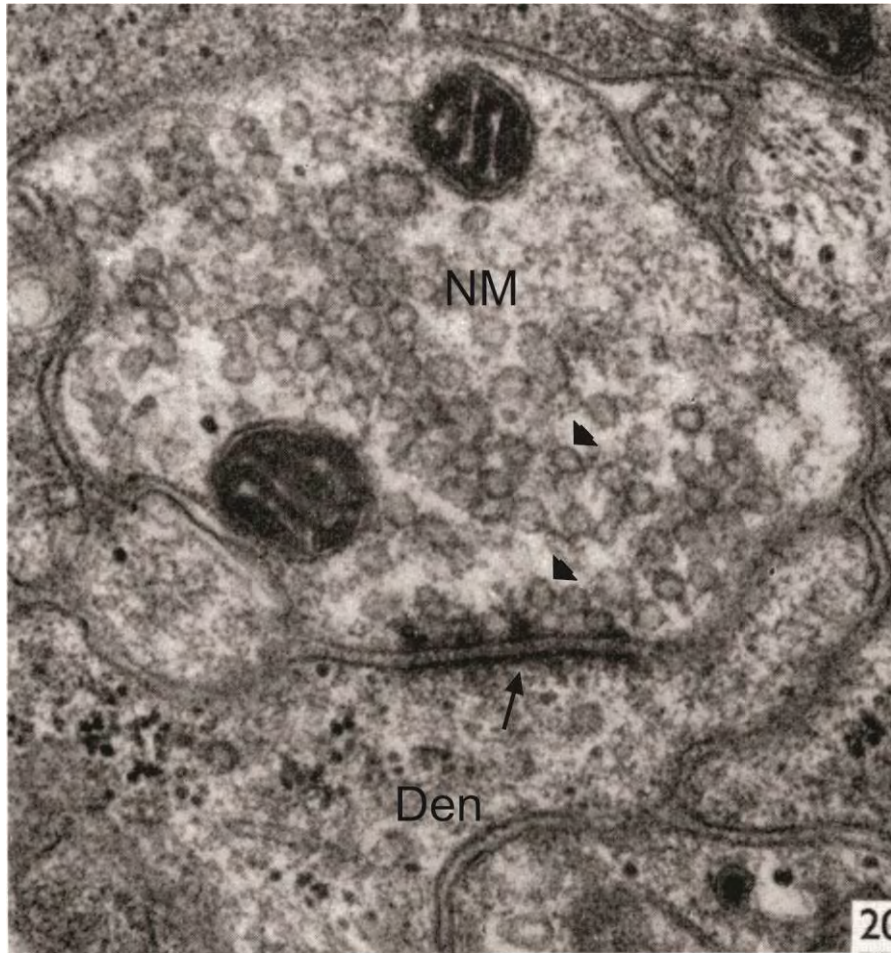


Figura 2. Micrografía electrónica de una sinápsis entre el axón y una dendrita de dos neuronas mientéricas del íleon del cobayo.

Se observa material denso en la hendidura sináptica entre dos membranas, se indica con una flecha, además de un engrosamiento post-sináptico; vesículas granulares densas son indicadas con la cabeza de flecha (zona activa); NM: axón; Den: dendrita. Aumento x27700. Modificado de (Gabella, 1972).

La transmisión sináptica está mediada en buena parte por una familia génica de canales iónicos activados por ligando (LGICs). Como se mencionó anteriormente éstos son activados por sustancias endógenas llamadas neurotransmisores como: el trifosfato de adenosina (ATP), glicina (Gly), serotonina ó 5-hidroxitriptamina (5-HT), acetilcolina (ACh) y ácido gama aminobutírico (GABA), las cuales al unirse a su receptor correspondiente producen un cambio conformacional en la estructura de la proteína que permite el paso de iones a través de la membrana. La diversidad de las subunidades de LGIC resulta de en un amplio espectro de distintos receptores funcionales formados por múltiples combinaciones de subunidades, lo cual genera diferentes especificidades farmacológicas y propiedades biofísicas del canal iónico.

A la fecha han sido identificados varios miembros de esta familia de canales iónicos en las neuronas entéricas: nAChR, P2XR, 5-HT₃R, GABAAR, GlyR y los receptores a N-metil-D-aspartato (NMDA) y ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) (Galligan, 2002a). Todos estos receptores son expresados en neuronas tipo *AH* (por sus siglas en inglés: *after hyperpolarization*), las cuales se definen por su comportamiento electrofisiológico al presentar una hiperpolarización inmediatamente después del potencial de acción, la cual dura más de un segundo (Furness *et al.*, 1998; Hirst *et al.*, 1974). Muchos de estos receptores han sido localizados en sitios extrasinápticos. Por otra parte en las neuronas tipo *S* (aquellas en las que un solo estímulo eléctrico aplicado a una conexión interganglionar produce potenciales postsinápticos excitatorios rápidos (Bornstein *et al.*, 1994; Hirst *et al.*, 1974) y algunas *AH*, los receptores P2X, nAChR y los 5-HT₃ median los potenciales sinápticos rápidos (Galligan, 2002b), mientras que los papeles de los receptores GABAA, glutamato y glicina aun no son muy claros.

1.2 Aspectos generales de los canales iónicos activados por ligando (LGIC)

Los receptores ionotrópicos GABAA, acetilcolina (nAChR), glicina, serotonina (5-HT3) y los activados por Zn^{2+} (ZAC) son receptores para neurotransmisores que pertenece a los LGICs *Cys-loop* formados por un arreglo de cinco subunidades homologas que forman un canal iónico (Keramidas *et al.*, 2004; Olsen *et al.*, 2009). Dicha familia de proteínas, está formada por subunidades estructuralmente similares, lo que sugiere que están relacionados evolutivamente (Le Novere *et al.*, 1995). Todas las subunidades de esta familia tienen dominios estereotipados que se agrupan formando una proteína pentamérica, cada subunidad tiene (Figura 3A): un dominio de unión a ligando amino terminal extracelular y un dominio carboxilo terminal también extracelular, tienen cuatro dominios α hélice que pasan por la membrana (M1-M4) y un dominio intracelular (Collingridge *et al.*, 2009; Keramidas *et al.*, 2004; Le Novere *et al.*, 1999), modelo que es consistente con los estudios bioquímicos, electrofisiológicos y estructurales realizados en el receptor nAChR del órgano eléctrico de *Torpedo marmorata* (Methot *et al.*, 2001; Miyazawa *et al.*, 2003; Revah *et al.*, 1991; Unwin, 1993).

Por otro lado los receptores purinérgicos activados por ATP, son de dos tipos: los P2Y (acoplados a proteínas G) y los P2X (ionotrópicos). Estos últimos también forman parte de los LGICs con una topología trimérica a diferencia del grupo de proteínas parecidas a nAChR (Figura 3C) (Brake *et al.*, 1994; Jiang *et al.*, 2003; Kawate *et al.*, 2009; Nicke *et al.*, 1998; North, 2002; Valera *et al.*, 1994).

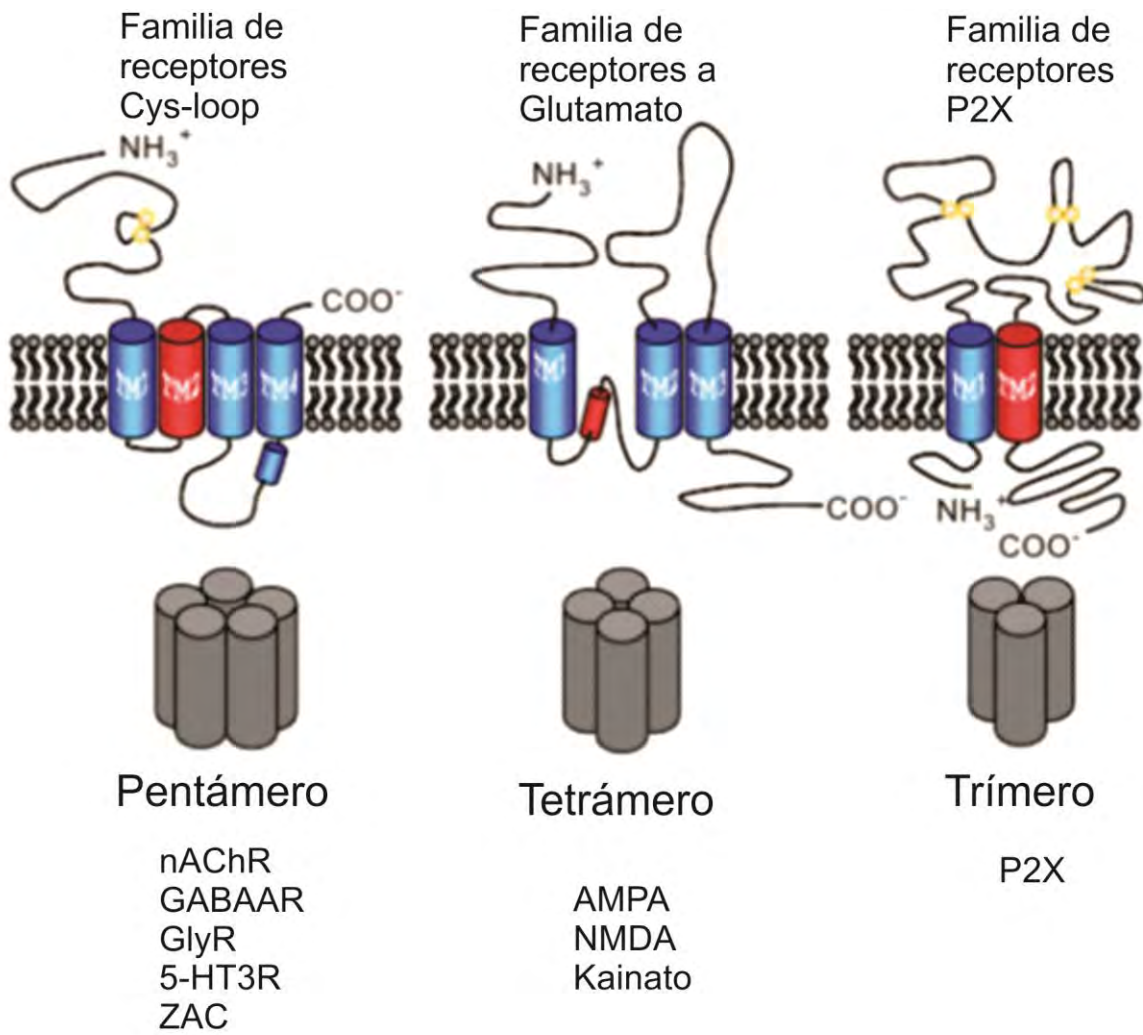


Figura 3. Representación esquemática de las tres categorías estructurales de las subunidades de los canales iónicos activados por ligando (LGIC).

La familia *Cys-loop* comprende a los receptores nAChR, GABAAR, GlyR y los receptores ZAC. Los receptores glutamatérgicos tetraméricos se subdividen en N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y los receptores a kainato. Y la familia de los receptores triméricos P2X. Para cada familia de proteínas se indica su topología, señalando la localización respecto a la membrana, el número de subunidades (cilindros grises), y los residuos de cisteínas que participan en la formación de enlaces disulfuro en amarillo, las hélices α que participan en la conducción de iones a través de la membrana son marcadas en rojo. Tomada de (Collingridge *et al.*, 2009)

1.3 Señalización purinérgica

La adenosina y su nucleótido, el ATP, son reconocidos como neurotransmisores o neuromoduladores en el sistema nervioso central (*Edwards et al., 1992*), el sistema nervioso periférico (*Evans et al., 1992; Silinsky et al., 1992*) y el SNE (*Barajas-Lopez et al., 1996a; Costa et al., 1996; Galligan et al., 1994*). Por su parte los receptores purinérgicos P1 (acoplados a proteínas G) son activados por adenosina, mientras que los receptores P2 son activados por ATP (*Burnstock, 2007*).

Dichos receptores P2 activados por ATP comprenden tanto a los receptores canal P2X (*Khakh, 2001; North, 2002*), como a los receptores P2Y (*Abbracchio et al., 2006; Burnstock, 2007*). La adenosina es liberada de las células como consecuencia del estrés metabólico o como un producto de la degradación del ATP liberado. Por el contrario, el ATP es primeramente liberado por fuentes neuronales como neurotransmisor en co-liberación con otros neurotransmisores como ACh (*Zimmermann, 2008*), glutamato (*Robertson et al., 1998*), GABA (*Jo et al., 2002; Jo et al., 1999; Pankratov et al., 2007*), noradrenalina (*Sneddon, 2000*), aunque existe evidencia de la liberación de ATP por células no neuronales como las células β del páncreas donde es coliberado con serotonina y GABA (*Abbracchio et al., 2006; Braun et al., 2007*).

1.4 Receptores canal P2X

Los receptores canal P2X son permeables a cationes y median potenciales post sinápticos excitatorios rápidos con latencias menores a milisegundos y una duración de <100 ms (*Evans et al., 1992; Valera et al., 1994*). Se encuentra ampliamente distribuidos en distintos tejidos del cuerpo humano y se conservan en una gran variedad de mamíferos (cobayo, ratón, rata, perro chimpancé, etc.), aves y peces (*Fountain et al., 2009; Galligan et al., 1994; North, 2002*).

Esta familia de receptores está formada por siete subunidades (P2X1-P2X7) codificadas por siete genes diferentes, los cuales conservan una estructura similar de 11 a 13 exones en sus variantes completas o canónicas (North, 2002). Sin embargo, su tamaño puede variar considerablemente; por ejemplo, en la rata el P2X2 es de 3 kb y el P2X7 es de 45 kb, mientras en el humano el P2X3 es de 40 kb y el P2X6 es de solo 12 kb. En el humano los genes que codifican para las subunidades P2X4 y P2X7 se encuentran en el cromosoma 12 (12q24.31), mientras que los genes de las subunidades P2X1 y P2X5 se ubican en el cromosoma 17 (17p13.2 y 17p13.3 respectivamente), P2X3, P2X6 aparecen en el cromosoma 11q12 y 22q11 respectivamente. La localización cromosomal del gen P2X2 no ha sido ubicada. La cercanía entre los genes de los receptores P2X (4) y (7) y P2X (1) y (5) respectivamente ha llevado a proponer una posible duplicación de genes, considerando que son los más cercanos entre si incluso en secuencia de aminoácidos (North, 2002). A la fecha han sido reportadas múltiples variantes de cada subunidad, las cuales pueden variar entre especies, la mayoría de estas isoformas pierden uno o más exones durante el evento de *splicing* (Koshimizu *et al.*, 2006; Linan-Rico *et al.*, 2012; North, 2002). Considerando la región de la proteína entre los residuos 30 a 350 de la secuencia de aminoácidos las subunidades son de 40 a 55% idénticas. Siendo la subunidad P2X4 la que conserva mayor identidad respecto a las demás y la P2X7 la más diferente de todas.

1.5 Topología y estructura de los receptores P2X

En los receptores P2X las subunidades se agrupan en trímeros del mismo (homoméricos) o de diferente tipo (heteroméricos). Cada subunidad tiene un amplio dominio extracelular (280 aminoácidos aproximadamente) donde se ubica el sitio de unión al ATP (Ennion *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2000), tiene 10 cisteínas conservadas las cuales pueden formar enlaces disulfuro que contribuyen a la estructura terciaria de la proteína (Ennion *et al.*, 2002). Además, junto con algunas histidinas conservadas participa en la modulación por Zinc y por el pH, y en la

sensibilidad al ATP en los receptores P2X1, P2X2, P2X3 y P2X4 (Figura 4) (Clyne *et al.*, 2002; North, 2002). En el dominio extracelular también se encuentran sitios de N-glicosilaciones conservadas (NXS/T), aunque el número de residuos que pueden ser glicosilados varía entre subunidades (North, 2002), siendo algunas de estas glicosilaciones esenciales para el tráfico a la membrana (Torres *et al.*, 1998a; Torres *et al.*, 1998b).

Además del dominio extracelular, cada subunidad tiene un dominio transmembranal con dos hélices α que atraviesan la membrana (TM1 y TM2) que se extienden aproximadamente de los residuos 30-50 y del 330-353 respectivamente, los cuales son separados por el dominio extracelular. Por su parte TM2 forma la pared del canal, mientras que TM1 ha sido involucrada en la regulación del *gating* o apertura y cierre del canal (Jiang *et al.*, 2013; Khakh *et al.*, 2006). Finalmente, las subunidades P2X conservan un dominio intracelular que incluyen al NH₂ (asociado a un motivo para PKC (Boue-Grabot *et al.*, 2000)) y un COOH terminal, el cual se ha identificado como la región más variable entre los parálogos P2X, al cual se le ha relacionado con el tráfico intracelular de la proteína y con su la retención a la membrana (YXXXX) (Chaumont *et al.*, 2004; Royle *et al.*, 2002). Así como con cambios en permeabilidad (Eickhorst *et al.*, 2002), con la unión a polisacáridos de la membrana (Denlinger *et al.*, 2001) y con la interacción con otras proteínas (Boue-Grabot *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2001).

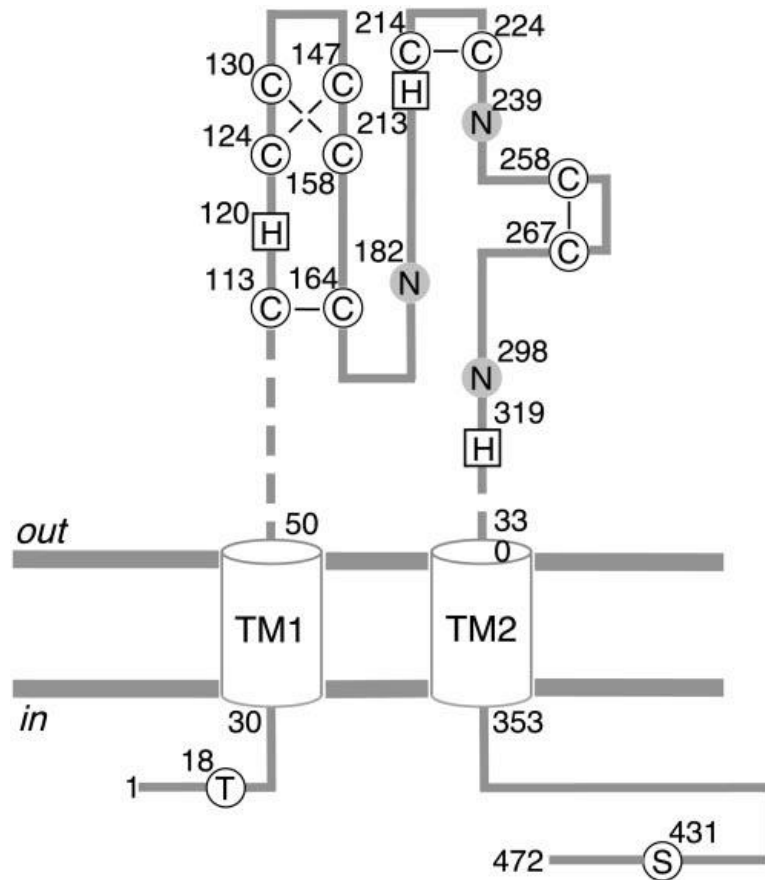


Figura 4. Modelo topológico de una subunidad de los receptores P2X mostrando los sitios probables de glicosilación, fosforilación y la formación de enlaces disulfuro.

N, representa sitio de glicosilación en el receptor P2X2; T y S, treonina 18 fosforilada por PKC y serina 431 fosforilada por PKA; C, 10 cisteínas conservadas; H, Histidinas 120, 213 envueltas en la regulación del Zinc, H319 sitio de unión a protones. Tomada de (North, 2002)

Recientemente se resolvió la estructura cristalina por difracción de rayos X de la proteína P2X4 del pez Cebra a 2.8Å (PDB 4DW0) y 2.9Å (PDB 4DW1) en presencia (Hattori *et al.*, 2012) y ausencia de ATP (Hattori *et al.*, 2012; Kawate *et al.*, 2009) evidenciando un trímero (Figura 5) con los dominios antes descritos en estado abierto y cerrado respectivamente.

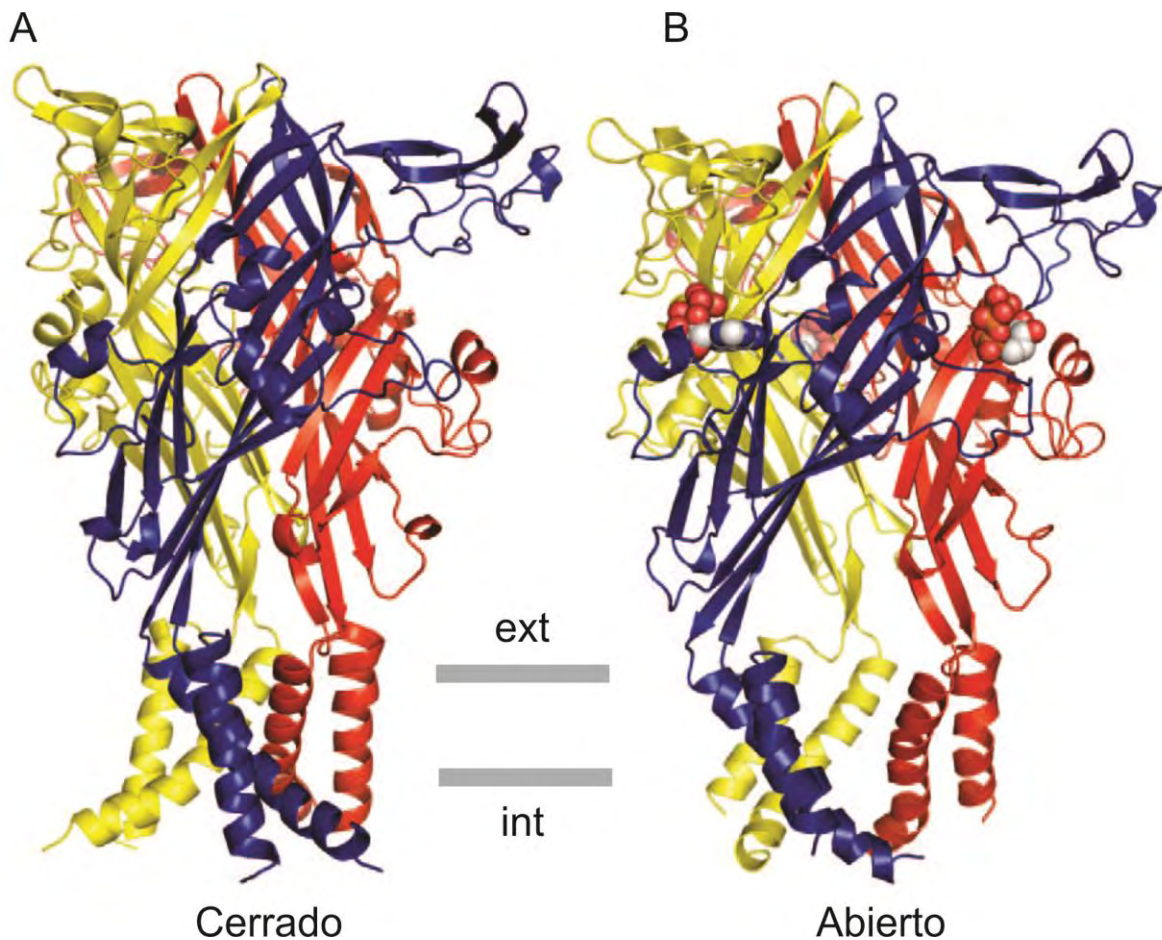


Figura 5. Modelo en listones del cristal del receptor P2X4 del Pez cebra.

A) Vista longitudinal del modelo en apo estado cerrado a 2.9 Å; B) modelo en apo estado abierto a 2.8 Å. La molécula de ATP en estado abierto se muestra en esferas rojas. Cada subunidad se muestra en un color diferente. Tomado de (Hattori *et al.*, 2012).

Estudios bioquímicos, estructurales y electrofisiológicos han propuesto la participación de algunos residuos en la regulación de la actividad de esta familia de proteínas. Dichos estudios han evidenciado la conformación estructural de la proteína comparándola con la forma de un delfín. Así pues el sitio de unión a ATP y algunos otros dominios importantes son representados con respecto a este modelo. Se ha mostrado que la unión de ATP (*ATP-binding pocket*) en los receptores P2X ocurre en el dominio extracelular entre dos subunidades (cadena A y B respectivamente) (Marquez-Klaka *et al.*, 2007), esta bolsa se encuentra rodeada por residuos cargados positivamente entre la cabeza y la parte superior del cuerpo de la cadena A y por debajo del cuerpo de la cadena B, entre la aleta izquierda de la cadena A y la aleta dorsal de la cadena B (Figura 6). Dicho sitio de unión se encuentra conservado entre las subunidades P2X. Los residuos conservados en el modelo del P2X4 del pez Cebra son: K70, K72, F188, T189, de la cadena A y N296, F297, R298 y K316 de la cadena B (Ennion *et al.*, 2000; Hattori *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2000; Kawate *et al.*, 2009). Si bien el receptor P2X tiene tres probables sitios de unión al ATP, los estudios de mutaciones puntuales y electrofisiológicos han propuesto que solo dos moléculas de ATP son necesarias para activar el canal (Stelmashenko *et al.*, 2012; Wilkinson *et al.*, 2006). El modelo del cristal de P2X4R del pez cebra también reveló la posición en el espacio de algunos residuos conservados que participan en la regulación de la unión de antagonistas (como el PPADS, P5P y suramina), en la velocidad de desensibilización en los receptores P2X3, y el sitio de unión de ivermectina (Buell *et al.*, 1996; Garcia-Guzman *et al.*, 1996; Hattori *et al.*, 2012; Jelinkova *et al.*, 2008; Kawate *et al.*, 2009; Rokic *et al.*, 2013).

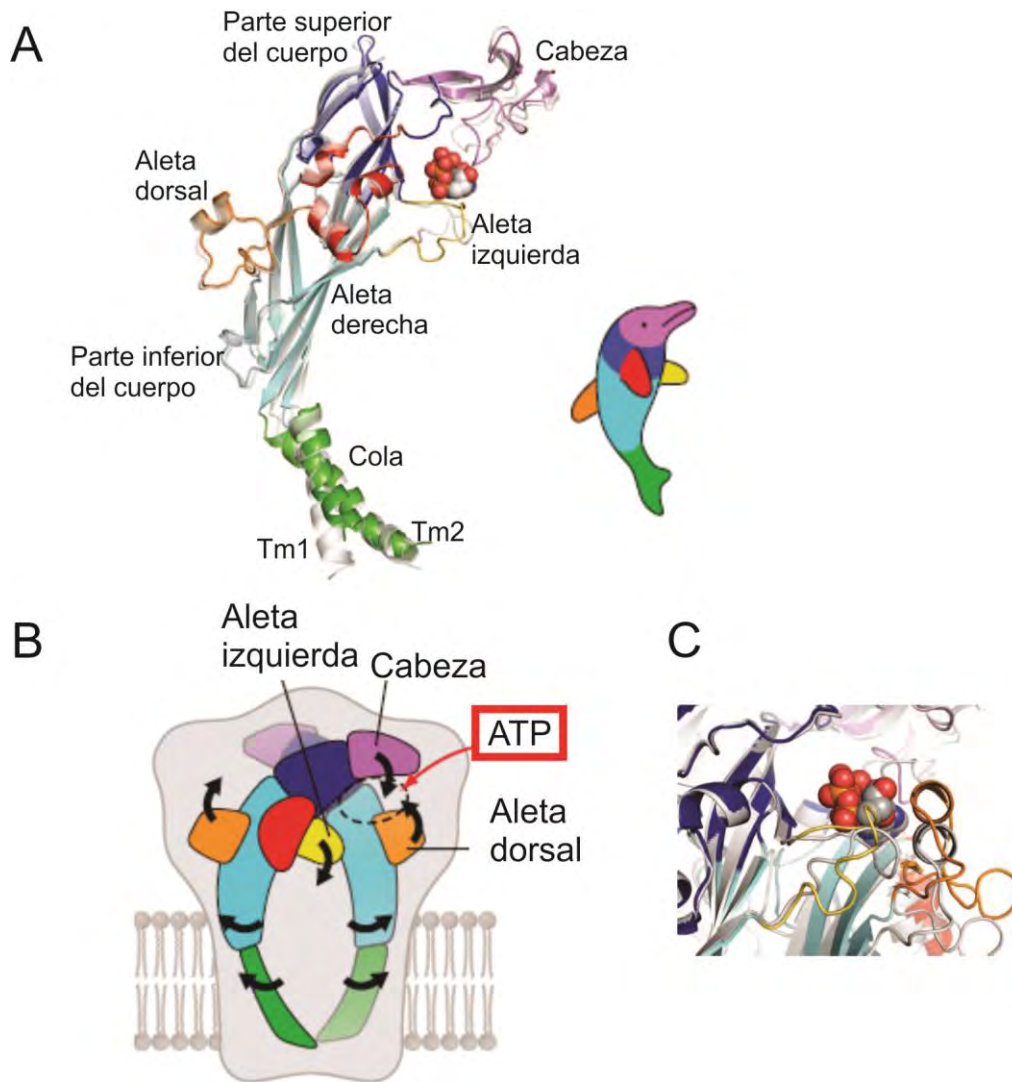


Figura 6. Modelo en esquemático de una subunidad del receptor P2X4 mostrando el sitio de unión a ATP.

A) Modelo en listones de una subunidad P2X denotando los nombres comparativos con el modelo del delfín. B) Esquema de la ubicación del sitio de unión a ATP entre dos subunidades P2X. C) Acercamiento al sitio de unión de ATP en un modelo de listones del receptor P2X4.

1.6 Propiedades biofísicas y farmacológicas de los receptores P2X

Como se mencionó anteriormente el trímero puede ser conformado por la misma (homómero) o por diferentes (heterómero) subunidades, confiriendo propiedades biofísicas y farmacológicas específicas que difieren entre especies (Barajas-Lopez *et al.*, 1996a; Bo *et al.*, 1995; Brake *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1992; Guerrero-Alba *et al.*, 2010; Valera *et al.*, 1994). Todos los receptores P2X excepto la subunidad P2X6, forman canales homoméricos con características cinéticas y farmacológicas distintivas, por ejemplo el receptor P2X5 responde débilmente a la aplicación de ATP mientras que los receptores P2X1 al P2X4 y el P2X7 presentan corrientes robustas con un tiempo de activación rápido. Por otra parte la cinética de desensibilización para P2X1 y P2X3 es muy rápida, para P2X2 y P2X4 es más lenta y el P2X7 no desensibiliza (Figura 7). Entre los receptores heteroméricos se han probado que las combinaciones de proteínas recombinantes P2X1/2 (Brown *et al.*, 2002), P2X1/4 (Nicke *et al.*, 2005), P2X1/5 (Torres *et al.*, 1999), P2X2/3 (Lewis *et al.*, 1995; Radford *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 1999), P2X2/5 (Compan *et al.*, 2012), P2X2/6 (King *et al.*, 2000), P2X4/6 (Le *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 1999) forman canales con características propias, por su parte la subunidad P2X7 no forma canales heteroméricos (Antonio *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 1999).

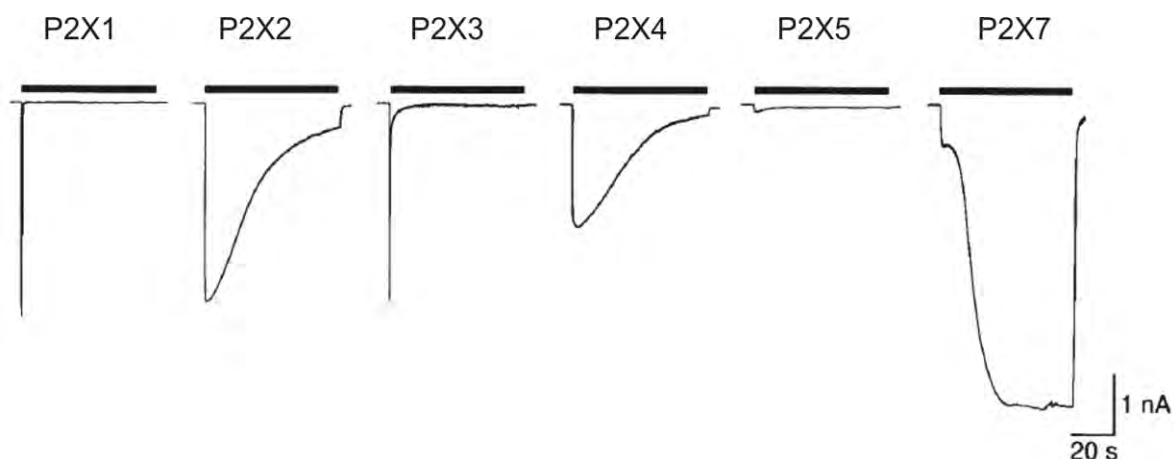


Figura 7. Registros de corriente característicos de canales homoméricos P2X.

Registros realizados por medio de la técnica de patch clamp en su configuración de célula completa de células HEK293 transfectadas con las subunidades P2X. Tanto receptores homoméricos como heteroméricos son activados por ATP con una EC50 en un rango de 1 a 100 μM con excepción del P2X7 que es activado por concentraciones de ATP en el rango mM.

A la fecha, los receptores P2X se han caracterizado por sus propiedades electrofisiológicas y por su respuesta a fármacos como Suramina, Ivermectina (IVM), PPADDS, Zinc²⁺, *Brilliant Blue G* (BBG), BzATP, α,β -meATP, meATP, ATP γ S, TNP-ATP entre otros (Tabla 1), además de que pueden ser modulados por otras sustancias como cationes divalentes (Zn²⁺, Ca²⁺). Sin embargo, la ausencia de fármacos específicos para cada subunidad ha dificultado la caracterización de sus funciones (Burnstock, 2007). Trabajos previos en nuestro grupo han reportado propiedades distintivas de los receptores P2X de cobayo, lo cual evidencia la complejidad de la caracterización de estos receptores (Guerrero-Alba *et al.*, 2010; Linan-Rico *et al.*, 2012; Nieto-Pescador *et al.*, 2013b; Valdez-Morales *et al.*, 2011).

Receptor	Distribución principal	Agonistas	Antagonistas
P2X1	Músculo liso, plaquetas, cerebelo, neuronas del asta dorsal de la médula	α, β -meATP =ATP=2-MeSATP, L $\beta\gamma$ -meATP (desensibilización rápida)	TNP-ATP, IP5I, NF023, NF449
P2X2	Músculo liso, SNC, retina, células cromoaafines, ganglios autonómicos y sensoriales	ATP \geq ATP γ S \geq 2-MeSATP \gg α, β -meATP, modulados por pH + zinc	suramina, isoPPADS, RB2, NF770, NF279
P2X3	Neuronas sensoriales, Tracto del núcleo solitario, algunas neuronas simpáticas	2-MeSATP \geq ATP \geq α, β -meATP \geq Ap4A. Desensibilización rápida	TNP-ATP, PPADS, A317491, NF110, Ip5I, phenol red
P2X4	SNC, testículos, colon	ATP \gg α, β -meATP, CTP potenciación por ivermectina, suramina, PPADS, inhibido por etanol	TNP-ATP (débilmente), BBG (débilmente), Fenoltaleína
P2X5	Células proliferantes en la piel, intestino, timo, vejiga, medula espinal	ATP \gg α, β -meATP, ATP γ S	suramina, PPADS, BBG
P2X6	SNC, motoneuronas de la medula espinal	No forma canales homoméricos	
P2X7	Células apoptóticas, ej: células inmunes, páncreas, piel	BzATP \gg ATP \geq 2-MeSATP \gg α, β -meATP	KN62, KN04, MRS2427, OATP Coomassie brilliant blue G

Tabla 1. Características farmacológicas generales de los receptores P2X.

Características farmacológicas generales de los receptores P2X. Indica distribución principal en el organismo, agonistas y antagonistas principales. Fuente (Burnstock, 2007).

2 ANTECEDENTES

2.1 Receptor P2X4

La subunidad P2X4 se expresa ubicuamente a lo largo de diferentes tejidos en el cuerpo humano y en otros mamíferos tanto en SNC como en SNP (Bo *et al.*, 2003b; Bo *et al.*, 1995; Buell *et al.*, 1996; Garcia-Guzman *et al.*, 1996; Soto *et al.*, 1996; Surprenant *et al.*, 2009). En particular se le ha localizado en las sinapsis glutamatérgicas (Rubio *et al.*, 2001; Seguela *et al.*, 1996). Debido a su amplia distribución en diferentes tejidos, los receptores P2X4 están involucrados en una gran variedad de procesos fisiológicos. Se les ha relacionado con el desarrollo de dolor neuropático (Guo *et al.*, 2005; Inoue *et al.*, 2004; Schwab *et al.*, 2005; Tsuda *et al.*, 2009; Tsuda *et al.*, 2003), de inflamación mediada por la liberación de prostaglandina E2 (Ulmann *et al.*, 2008), regulación del endotelio vascular (Yamamoto *et al.*, 2000) y con la preferencia e ingesta de alcohol; sobre este efecto existen evidencias que relacionan a este receptor como mediador de los efectos inducidos por etanol observados como una inhibición de las I_{ATP} (Asatryan *et al.*, 2011; Asatryan *et al.*, 2008; Davies *et al.*, 2006; Davies *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2000).

El receptor P2X4 ha sido típicamente caracterizado por el efecto potenciador del fármaco antiparasitario Ivermectina (I_{ATP}) (Figura 8A) (Khakh *et al.*, 1999; Priel *et al.*, 2004). Aun cuando se ha visto un efecto similar en el P2X7 de humano este efecto no se observa en la rata ni en el ratón (Norenberg *et al.*, 2012). Además, el receptor P2X4 es ligeramente modulado por Zinc (Wildman *et al.*, 1999); sin embargo, este último efecto también se observa en las subunidades P2X2, P2X3 y P2X5, hecho que lo vuelve poco específico (Coddou *et al.*, 2011). En sistemas de expresión heteróloga se ha observado la modulación positiva del P2X4 de ratón, rata y humano por algunos antagonistas purinérgicos tales como la suramina y el PPADS (Figura 8B) (Buell *et al.*, 1996; Garcia-Guzman *et al.*, 1996; Townsend-Nicholson *et al.*, 1999). Esta es la única subunidad P2X con estas propiedades

(Burnstock, 2007). Otra característica del receptor P2X4 es la inhibición mediada por etanol a concentraciones mayores que 10 mM (Figura 8C) (Davies *et al.*, 2002; Xiong *et al.*, 2000) y el efecto antagónico de la ivermectina sobre la inhibición inducida por etanol (Asatryan *et al.*, 2011; Asatryan *et al.*, 2010; Popova *et al.*, 2013). Este fenómeno ha sido explicado en la propuesta de un probable sitio de unión compartido tanto por ivermectina como etanol (Asatryan *et al.*, 2010; Popova *et al.*, 2013). La región del *binding pocket* del etanol se localiza en el ectodominio en la parte superior de TM1 y TM2 en el vestíbulo previo a la membrana (Asatryan *et al.*, 2010; Asatryan *et al.*, 2008; Popova *et al.*, 2010) misma región que ha sido identificada como el sitio de unión de la ivermectina: W47, V48, W50, V60, D331, M336 N338 (Jelinkova *et al.*, 2008; Jelinkova *et al.*, 2006; Kawate *et al.*, 2009). Aunque la histidina 241 parece ser esencial para el efecto inhibitorio del etanol (Xiong *et al.*, 2005).

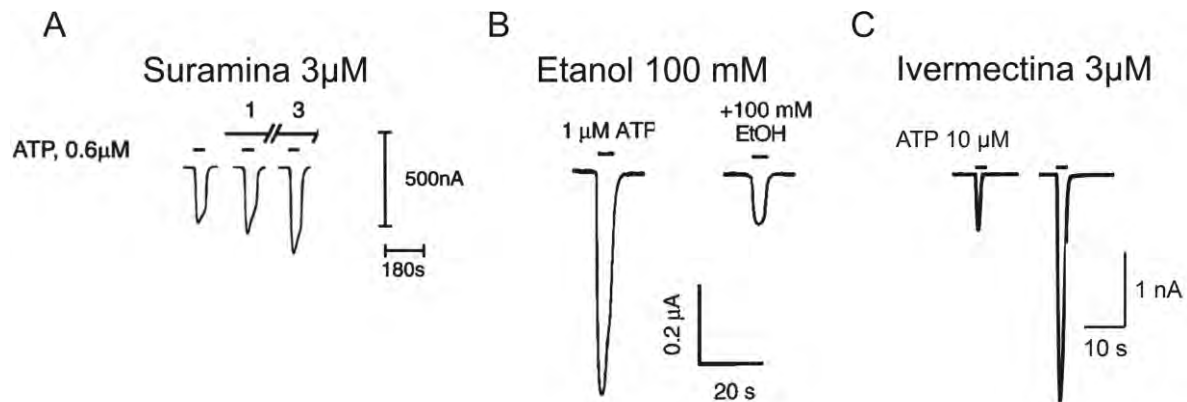


Figura 8. Registros representativos del efecto de suramina, etanol e ivermectina sobre las corrientes inducidas por ATP.

Suramina (A) e Ivermectina (C) tienen un efecto potenciador de la corriente I_{ATP} , mientras que el etanol (B) tiene un efecto inhibitorio. Modificados de (Priel *et al.*, 2004; Townsend-Nicholson *et al.*, 1999; Xiong *et al.*, 2000)

Por otra parte no se observa activación por α,β -meATP en el receptor homomérico P2X4 (Burnstock, 2007). Se sabe que la sensibilidad del receptor P2X4 al ATP es intermedia ($EC_{50} = 7 \mu M$) con respecto a los demás P2X Y se le atribuye

una desensibilización lenta debida a los residuos K373, Y/F374 en la región C-terminal (Fountain *et al.*, 2006).

2.2 Planteamiento del problema

Previos estudios de nuestro grupo (Barajas-Lopez *et al.*, 1993; Barajas-Lopez *et al.*, 1996a; Guerrero-Alba *et al.*, 2010; Valdez-Morales *et al.*, 2011) y de otros (Boue-Grabot *et al.*, 2003; Galligan *et al.*, 1994; Hu *et al.*, 2001a; Zhou *et al.*, 1996) han reportado que las corrientes inducidas por ATP en las neuronas mientéricas del cobayo presentan una farmacología inusual tanto para agonistas como antagonistas evidenciando una población heterogénea de canales con propiedades distintivas. Más recientemente, hemos reportado la presencia de dos variantes del receptor P2X2 (Linan-Rico *et al.*, 2012), la presencia del receptor P2X7 (Valdez-Morales *et al.*, 2011), y la regulación de la expresión de las subunidades P2X3 y P2X5 en las neuronas mientéricas durante el desarrollo postnatal del cobayo (Loera-Valencia *et al.*, 2014). Hallazgos que muestran la complejidad de las poblaciones de receptores P2X en este modelo animal, el cual ha sido ampliamente utilizado para el estudio del SNE (Furness *et al.*, 2002; Gabella, 1972; North, 2002; Xiang *et al.*, 2005), así como modelo de enfermedades como el síndrome de alcoholismo fetal (Abdollah *et al.*, 1993; Catlin *et al.*, 1993; Kimura *et al.*, 1998; Xiang *et al.*, 2005).

De tal forma, nuestro grupo ha mostrado un efecto predominantemente potenciador (90% de las neuronas mientéricas) a bajas concentraciones de suramina ($\leq 30 \mu\text{M}$) (Guerrero-Alba *et al.*, 2010). Ya que un efecto similar ha sido reportado únicamente en los receptores P2X4 recombinantes de rata ($50 \mu\text{M}$) y ratón ($\leq 150 \mu\text{M}$) (Townsend-Nicholson *et al.*, 1999) nuestra hipótesis es que esta subunidad se encuentra presente en las neuronas mientéricas del cobayo.

3 JUSTIFICACIÓN

La farmacología y los estudios electrofisiológicos en el intestino delgado del cobayo presumen la participación de la subunidad P2X4 dentro de las poblaciones heterogéneas de receptores P2X, así como su participación en la generación de potenciales excitatorios postsinápticos rápidos.

A la fecha no se ha reportado la secuencia completa del gen P2RX4, ni hay evidencia experimental de su presencia en el modelo de cobayo. Determinar su presencia en este roedor permitirá estudiar las propiedades y su participación en distintos procesos fisiológicos.

4 HIPÓTESIS

El receptor P2X4 se expresa en las neuronas mientéricas de cobayo donde forma parte de canales P2X nativos.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la expresión del receptor P2X4 en las neuronas mientéricas del cobayo, así como la contribución de la subunidad en los canales P2X nativos. Evaluar los probables candidatos para la formación de canales heteroméricos

5.2 Objetivo particular

1. Realizar la caracterización electrofisiológica para elucidar si se encuentra presente el receptor P2X4 en el sistema nervioso entérico de cobayo con la técnica de patch clamp en su configuración de célula completa.
2. Determinar si el RNAm del receptor P2X4 se expresa en el SNC, en células no excitables y en el SNE del cobayo por la técnica de RT-PCR, e identificar las diferencias y similitudes de la secuencia con respecto a sus ortólogos.
3. Identificar por medio de *RT-PCR* en célula única la expresión de RNAm del receptor P2X4 en las neuronas mientéricas del cobayo,
4. Identificar la presencia de la proteína P2X por inmunquímica
5. Evaluar la posible presencia de canales P2X heteroméricos en preparaciones de plexo mientérico del cobayo por RT-PCR de célula única y co-inmunoprecipitación.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivos primarios de neuronas mientéricas

Los animales usados para todos los protocolos fueron aprobados por el Comité de Cuidados de los Animales del IPICYT que se basa en la Guía del Cuidado y Uso de Animales en la Investigación y Capacitación, aprobado por la Sociedad Americana de Fisiología. Cobayos (100-200 g) de ambos sexos se sacrificaron por dislocación cervical y desangrados por la carótida. Inmediatamente después del sacrificio se removió un segmento de 10-15 cm del yeyuno y fue llevado a solución de Krebs modificada (en mM: NaCl, 126; NaH₂PO₄, 1.2; MgCl₂, 1.2; CaCl₂, 2.5; KCl, 5; NaHCO₃, 25; glucosa, 11; con aplicación continua de 95% de O₂ and 5% de CO₂). Se removieron quirúrgicamente de cada segmento la mucosa y la submucosa. La capa muscular interna que contiene al plexo mientérico (preparación del plexo mientérico del musculo liso) fue disociada usando un tratamiento secuencial con dos soluciones enzimáticas como describe (Barajas-Lopez *et al.*, 1996b). La primer solución contiene papaína (0.01 mg/ml; activado con 0.4 mg/ml de L-cisteina) y la segunda colagenasa (1 mg/ml) y dispasa (4 mg/ml). Las enzimas se lavaron con medio L15 y las neuronas disociadas se plantaron en cubreobjetos redondos cubiertos con colágeno de cola de rata en solución de cultivo estéril, La solución fue preparada con medio mínimo esencial (MEM) 97.5% v/v, 2.5% v/v de suero de cobayo, glucosa 15 mM, L-glutamina 2 mM, penicilina 10 U/ml, estreptomycin 10 µg/ml, citosina-β-D-arabinofuranósido 10 µM, fluorodeoxiuridina 10 µM, y uridina 10 µM para prevenir el crecimiento de células no neuronales.

6.2 Registros de *Patch-Clamp*

El registro en la configuración de célula completa fue hecho como describe previamente (Barajas-Lopez *et al.*, 1996b) usando un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Los registros se llevaron a cabo a temperatura ambiente (22-24°C). Las pipetas de *patch* se prepararon en un micromanipulador Sutter (MP-85I Novato, CA, USA) con resistencias entre 1 y 4 MΩ. El potencial de membrana se llevó a -60 mV para los experimentos de fijación de voltaje y las corrientes de membrana se registraron en CLAMPEX 6 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) y se analizaron con el programa AXOGRAPH 4.9 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Durante los experimentos electrofisiológicos la cámara de registro fue continuamente bañada con solución estándar a una velocidad de flujo de 2ml/min aproximadamente. Los fármacos utilizados en estos experimentos se aplicaron usando un sistema de perfusión rápida como describe (Barajas-Lopez *et al.*, 1996b). La composición de la solución estándar es la siguiente (en mM): NaCl, 160; CaCl₂, 2; glucosa, 10; HEPES, 5 y CsCl, 3; el pH fue ajustado a 7.3–7.4 con NaOH. La solución interna de la pipeta contenía (en mM): CsCl, 150; EGTA, 10; HEPES, 5; NaCl, 10; ATPMg, 4.5 y GTPNa, 0.1; ajustado a pH 7.3–7.4 con CsOH.

6.3 Procesamiento del tejido para la extracción de ARN y proteínas

Los especímenes extraídos del yeyuno (preparaciones del plexo mientérico de músculo liso) y cerebro (corteza cerebral), fueron trituradas en un mortero con nitrógeno líquido y almacenados en un reactivo estabilizador de ARN (RNAlater, Qiagen, Duesseldorf, Germany) para aislar el ARN o en 2 ml de buffer de lisis bajo en sales (Tris-HCL 50 mM; NaCl 10mM y Tritón X-100 al 1%) para Western blot, adicionalmente los tejidos fueron sonicados durante 1 minuto a 4 °C con ciclos de 5 s encendido y 5 s apagado. La sonicación fue interrumpida durante 1 min y se

repite los pulsos por 1 min más. Los homogenizados se centrifugaron a 2500 g por 5 min, para eliminar los residuos de tejidos.

6.4 Purificación de células mononucleares (MC)

Las MC fueron aisladas de 3 ml de sangre, obtenida por punción cardiaca del ventrículo izquierdo de cobayos macho, por centrifugación de gradiente de densidad. La sangre fue diluida 1:2 en buffer salino de fosfato (PBS) pH 7.3 y se colocó sobre 2 ml de Ficoll-Histopaque cat 1077-1 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) y centrifugado a 2000 g por 30 minutos. Las células fueron colectadas y lavadas dos veces con PBS. Finalmente, los MC se llevaron a una concentración de 1×10^6 células/ml en RNAlater para RT-PCR o en buffer de lisis bajo en sales para *Western blotting*.

6.5 Amplificación por RT-PCR y clonación del orf de P2X4R

El RNA total fue aislado usando el paquete de purificación de RNA *Ambion RNAqueous* (Life Technologies, Texas, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente a partir de 5µg del total de RNA fue sintetizado el cDNA (DNA de cadena sencilla) usando oligo (dT)₁₈ y la enzima *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Life Technologies, Texas, USA) por 1.5 h a 42°C de acuerdo al protocolo indicado por el fabricante. Los controles negativos de la RT se realizaron sin enzima, no se obtuvieron falsas amplificaciones. El protocolo de PCR se realizó con el paquete *AccuPrime Pfx DNA polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), y consistió de una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min seguida de 35 ciclos i) con una desnaturalización a 94°C por 15 s, después un ii) alineamiento a 56°C por 20 s, iii) y una elongación a 68°C por 1 minuto 30 s. Finalmente una extensión a 68°C por 5 minutos. Se realizaron controles negativos sin templado, no se obtuvieron falsas amplificaciones positivas. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% con 1 µg/ml de bromuro de etidio. Las imágenes fueron capturadas usando un fotodocumentador Gel-Doc 2000 (*Gel Documentation System, Bio-Rad*). Los productos de PCR fueron

clonados en el vector pGEMT Easy (Promega, Wisconsin, USA) y secuenciado en un equipo AB 3130 basado en la Técnica de *Sanger* y en Tecnología capilar. El análisis de secuencia se realizó utilizando herramienta bioinformática, *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), y el programa *DNASTAR Lasergen* versión 7.1 y con el software de la European Bioinformatics Institute en su modo local (water) y global (needle) (Clustal W algorithms).

La secuencia del gen P2X4 de cobayo no ha sido clonada y las predicciones disponibles tanto en la base de datos ENSEMBL como en la del Genbank, se encuentran incompletas o no han sido validadas. Por lo tanto el diseño del oligonucleótido P2X4 1s (Tabla 2) se basó en el inicio del marco de lectura abierto (*Orf por sus siglas en ingles*) de la secuencia consenso de humano, rata y ratón (*Accessions*: humano, NM_002560.2; rata, NM_031594.1; ratón NM_011026.2), y comparado con la secuencia Kozak conservada en la familia de receptores P2X. El oligonucleótido anti sentido P2X4 1a (Tabla2) fue diseñado de la base a la secuencia reportada en la base de datos ENSEMBL (*transcript ID*: ENSCPOT00000004182).

6.6 Western blot

Preparaciones de 3 µg de proteína total de cerebro, MC y del plexo mientérico del músculo liso en buffer de muestra simple (Tris-Cl 50 mM (pH 6.8), azul de bromofenol 0.2%, Dodecilsulfato sódico (SDS) al 2 % (p/v), glicerol al 10% (v/v), 2-mercaptoetanol 10%) o en condiciones super reductoras adicionado con 80 mM de DTT fueron separadas en geles de poliacrilamida SDS al 12%. Las proteínas fueron separadas a 120 volts por 150 min a 4°C. Posteriormente fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa por 1 h a 400 mA y a 4°C. Una vez separadas fueron bloqueadas con leche en polvo libre de grasa al 8% en buffer salino Tris (Tris base 20 mM, NaCl 136 mM, pH 7.6), Tween 20 0.1% (TBST) y fueron incubadas toda la noche con anticuerpo policlonal de conejo anti-humano

P2X4 contra los aminoácidos 1-40 N-terminal (SC28764, *Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA*) a una dilución de 1:2200 v/v. Después las membranas fueron lavadas e incubadas por 2.5 hrs con anticuerpos de cabra conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) anti-inmunoglobulina G (IgG) de conejo (cat. no. 12-348, *Millipore, CA, USA*) a una dilución de 1:3000 v/v. La inmunoreactividad fue visualizada con 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (*TMB*) (*Sigma, Missouri, USA*). El peso molecular aparente fue asignado con un marcador de peso molecular de proteínas (*Benchmark Prestained Protein Ladder, Invitrogen*).

6.7 Inmunohistoquímica de cultivos primarios de neuronas mientéricas

Las neuronas del plexo mientérico, después de 5 días de cultivo, fueron enjuagadas y sumergidas en una solución de fijación de paraformaldehído (3 % v/v) y glutaraldehído (0.02 % en PBS v/v) durante 15 minutos; posteriormente, fueron lavadas y permeabilizadas con una solución de Tritón X-100 (0.01%v/v en PBS) durante 15 minutos. Las células fueron incubadas en bloqueador universal (*Dako Diagnostics Canada Inc, Cat # CD310081*) durante 6 h. Entonces, se lavaron e incubaron con un anticuerpos policlonal de conejo anti-P2RX4 de humano (orb 100036; *Biorbyt, Cambridge, Cambridgeshire, UK*) a 1:200 (en una solución de albúmina sérica bovina (BSA), 1% p/v) durante 8 h, seguido por 4 hrs de incubación con anticuerpos de cabra conjugado a HRP anti-IgG de conejo (cat. no. 12-348, *Millipore, CA, USA*) a una dilución 1:500 v/v en BSA. Se lavó el segundo anticuerpo y se visualizó la inmunoreactividad después de 25 min de incubación con DAB (DAB, 0.05 mg/ml de PBS 60% v/v más H₂O₂ a 0.01%). Los cubreobjetos con el cultivo de neuronas fueron entonces lavados y montados con medio de montaje PPD (glicerol 90% en PBS); y finalmente sellados con esmalte de uñas. El pH de todas las soluciones utilizadas en los experimentos de inmunohistoquímica se ajustó a 7.5 y las neuronas se lavaron usando PBS a temperatura ambiente. Los experimentos control (n=4) se realizaron en ausencia de anticuerpos primario y no se observó inmunoreactividad.

6.8 Inmunoprecipitación

Se incubaron durante toda la noche 5 mg de proteína total de la preparación de plexo mientérico a 4°C en presencia (2 µg) o ausencia de anticuerpos primarios (anti-P2X2 (APR-003, Lot-AN-07), anti-P2X3 (APR-016, Lot-AN-07), anti P2X5 (APR-05, Lot-AN-01); *Alomone Labs*, Jerusalem, Israel) o anti-P2X4 humano (sc-28764, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) covalentemente inmunizados a la resina de acoplamiento de anticuerpos por 1h a 4°C (nProtein A Sepharose 4 *Fast Flow, Immunoprecipitation starter pack, GE Healthcare, Uppsala, Sweden*). Los complejos de perlas (perlas de IgG / P2X / anti-P2X4R) fueron lavados tres veces con 1 ml de Tris 50 mM, pH 8. El último lavado fue usado como control de la inmunopurificación, enseguida se disociaron en el buffer de muestra reductor (SDS 1%, DTT 100 mM, Tris 50 mM, pH 7.5) con calor a 95°C por 3 min. Las proteínas co-precipitadas fueron detectada por Western blot, usando para cada precipitación anticuerpos primarios tal y como se describe previamente (anti-p2x2 1:750, anti-p2x3 1:500, anti-p2x4 1:2200 o anti-p2x5 1:750).

6.9 RT-PCR de célula única

Neuronas mientéricas individuales a partir de cultivos de 3 a 7 días fueron morfológicamente distinguidas de otros tipos de células, partiendo de la base de la presencia de neuritas largas que de ellas emanan y de su cuerpo claro, redondo y compacto. Mediante el empleo de un sistema de patch clamp y pipetas de vidrio aspiramos neuronas mientéricas individuales, cada una en un volumen de 6 µL de buffer RT libre de RNasas (inhibidor de RNasas, 20 U; oligo (dT)₁₈, 2.3 µM; dNTPs, 150 µM; DTT 1.2 mM; FS 5X RT Buffer, todos lo reactivos son parte del paquete *Superscript II First-Strand Synthesis System* (Life Technologies, Texas, USA). El contenido de la pipeta fue liberado dentro de la tapa de un tubo de PCR con 12 µl de buffer RT libre de RNasa y 0.5 µl de NP40 al 1%, para permitir la lisis de la membrana celular. La reacción fue incubada a 65°C por 2 min, después se adicionó 0.5 µl de transcriptasa reversa *Superscript II* e incubada a 42°C por 60 minutos y finalmente inactivada con calor a 70°C por 10 min. Una vez obtenido el

cDNA, realizamos amplificaciones de PCR anidada y PCR múltiple para P2X2, P2X3, P2X4 y P2X5 para una misma célula, se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada receptor, los oligonucleótidos para PCR anidada de P2X4 se diseñaron en base a la secuencia clonada durante este trabajo (*Genbank accession*: JX417449) (Tabla 2). Las PCR se amplificaron con Taq DNA polimerasa *Platinum* (*Life Technologies, Texas, USA*) y el protocolo general para el receptor P2X4 consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de amplificaciones compuestos por i) desnaturalización a 94°C por 15 s, ii) alineamiento a 56°C durante 15 s, iii) elongación a 72°C por un min y 30 s; y finalmente una elongación a 72°C por 5 min. El mismo protocolo fue utilizado para PCR múltiple, primero fue llevado a una pre amplificación con sus correspondientes *primers* para P2X2, P2X3, P2X4 y P2X5 y después se realizó una PCR anidada individual para cada mRNA. Las temperaturas de fusión para cada par de oligonucleótido se adjuntan en la tabla 3.

Los controles negativos para las PCR fueron desarrolladas sin templado, no se obtuvieron falsas amplificaciones. Los productos de PCR fueron analizados como se describe anteriormente, y se confirmó la identidad de *orf* de P2X4 por secuenciación.

6.10 Modelado molecular

Las secuencias fueron traducidas usando herramientas bioinformáticas. Ambas secuencias se analizaron para predecir su estructura terciaria en la membrana celular mediante la herramienta bioinformática, TMpred de <http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/TMPRED>. El modelo del trímero se generó utilizando el software ESyPred3D basado en los algoritmos de MODELER (University of Namur, Belgium) y SWISS-MODEL (Swiss Institute of Bioinformatics, University of Basel, Switzerland) utilizando como plantilla la estructura cristalográfica por difracción de rayos X la estructura de la cristalografía del receptor P2X4 del pez cebra, AP ID: 4DW0 y 4DW1 (apo estado cerrado y abierto, respectivamente). El trímero fue reconstruido utilizando el software ICMv3.5,

MolSoft LLC, la minimización de energía se fue calculada con GROMOS96 (como parte del software DeepView/v4.1.0 Swiss-Pdb Viewer).

6.11 Reactivos y soluciones

Para los cultivos primarios, medio L15, Medio Esencial Mínimo, solución de Hanks, penicilina-estreptomicina, y L-glutamina se adquirieron de *GIBCO Life Technologies* (Texas, USA) y el suero bovino fetal fue de ATCC. La colagenasa y la papaína fueron adquiridos de *Worthington* (New Jersey, USA) y la dispasa de Roche Bioscience (Indianapolis, USA). Para los registros patch-clamp, las soluciones madre (0.01-0.1 M) se prepararon utilizando agua destilada desionizada excepto en la solución de IVM, la cual fue preparada en dimetil sulfóxido (DMSO) y fue almacenada a -20°C, excepto para la soluciones ATP que se preparaban justo antes de los experimentos. La concentración final de los fármacos se obtuvo mediante la dilución de las soluciones madre en solución externa antes de la aplicación. Todas las demás sales y sustancias fueron todos adquiridos de Sigma-Aldrich (Toluca, México).

6.12 Análisis de datos

Para normalizar las corrientes inducidas por ATP, las respuestas con 100µM se consideraron como 100%, en cada célula. El efecto de IVM, etanol y Suramina se ensayó frente a concentraciones equipotentes de ATP que evocaron una IATP cerca de la respuesta máxima (se indica en cada caso). Se utilizó la prueba de t de Student (después de la prueba de ANOVA) para evaluar la diferencias entre los valores medio obtenidos de los diferentes grupos de células. Los valores de P de dos colas menores o iguales a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. Los datos se expresaron como la media ± el error estándar de la media (SEM). El número de células utilizadas se representa por “n”.

6.13 Cuadros complementarios

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos sentido (S) y anti sentido (A) usados en las amplificaciones por PCR anidadas para la secuencia del receptor P2X4. La temperatura de alineamiento de los primers fue de 56°C para cada PCR.

<i>PCR Anidada</i>	<i>Nombre</i>	<i>Oligonucleótido</i>	<i>Posición</i>
1st	P2X4g-1S	5'-ctgggcatggcaggctg-3'	-8
	P2X4g-1A	5'-tcactgtccgtgtccccag-3'	1148
2nd	P2X4g-2S	5'-ttacgtcattgggtgggtg-3'	123
	P2X4g-2A	5'-tctcttctcatgcagtagagg-3'	1071
3rd	P2X4g-3S	5'-ggattccgatctaggatgtgg-3'	238
	P2X4g-3A	5'-caggttgagtcaccattcacct-3'	767

Tabla 2

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos sentido (S) y anti sentido (A) utilizados en la técnica de PCR múltiple para analizar la coexpresión de los receptores P2X en célula única.

<i>Nombre</i>	<i>Oligonucleótido</i>	<i>Temperatura de Alineamiento (°C)</i>	<i>Posición</i>
<i>Guinea Pig P2X2</i>			
2-1S	5'- gttctgggcacccatggctgc-3'	55	-12
2-1A	5'- tcctgtctgcagacctggcgt-3'	56	+1559
2-2S	5'-ttcacagagctggcacacag-3'	55	+742
2-2A	5'-atggtgggaatcaggctgaa -3'	55	+944
<i>Guinea pig P2X3</i>			
3-1S	5'-atgaactgcatctcagacttcttcac-3'	53	+1
3-1A	5'-ttagtggccgatggagtagg-3'	53	+1157
3-2S	5'-tgggggacgtggtccggttg-3'	56	+653
3-2A	5'-gtccacggactcaggcgctac-3'	56	+1161
<i>Guinea pig P2X4</i>			
4-1S	5'-ttcctgttcgagtacga-3'	55	+31
4-1A	5'-ctgtagtactggcaaac-3'	55	+885
4-2S	5'-cagctcaggaggaaaact-3'	58	+275
4-2A	5'-aatgcacgacttgaggta-3'	58	+637
<i>Guinea pig P2X5</i>			
5-1S	5'-agcgttcgactacaagacagaaaa-3'	55	+35
5-1A	5'-ggcccagacatcttgaatc -3'	55	+1395
5-2S	5'-ggagcctgtagagctggaaat-3'	58	+414
5-2A	5'-gccggaagatgggacaatagta-3'	58	+678

Tabla 3

7 RESULTADOS

7.1 Efecto de la ivermectina (IVM), etanol y suramina sobre canales P2X nativos de neuronas mientéricas

Con el fin de determinar si los receptores P2X4 participan en las corrientes inducidas por ATP en el plexo mientérico, probamos el efecto de la IVM, etanol o suramina sobre I_{ATP} en las neuronas del plexo mientérico en cultivo. La IVM 3 μM no alteró las corrientes evocadas por ATP (100 μM) en ninguna de las células evaluadas (n=6) (Figura 9A). Este comportamiento de la respuesta a IVM se evaluó al comparar su efecto con la respuesta generada por su disolvente (DMSO), el cual por sí mismo (DMSO 0,06 %) tiene un efecto inhibitor sobre el I_{ATP} de alrededor de 10 % de las corrientes control. Del mismo modo la aplicación de etanol 100 mM no tuvo ningún efecto modulador sobre I_{ATP} (100 μM) (n=7), porcentaje de inhibición 1.5%(Figura 9B).

También se evaluó la acción de suramina (30 μM) sobre la corriente evocada por $\alpha\beta$ -me-ATP (300 μM) en este mismo tipo neuronal. El número de células que responden con potenciación es del 77 %, aproximadamente el mismo porcentaje de células que contenían ARNm de la subunidad P2X4, (Figura 9C).

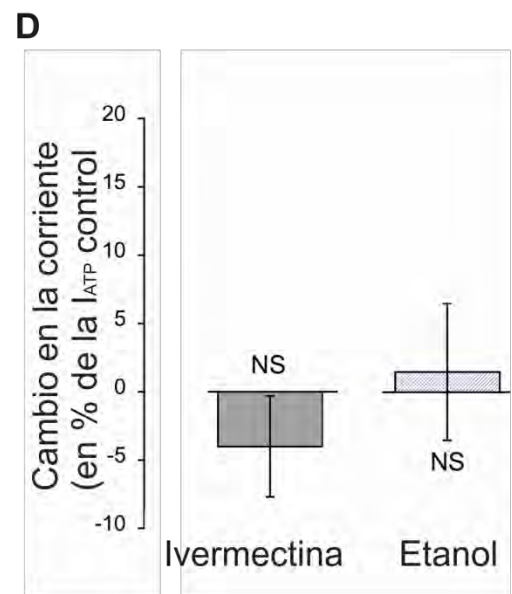
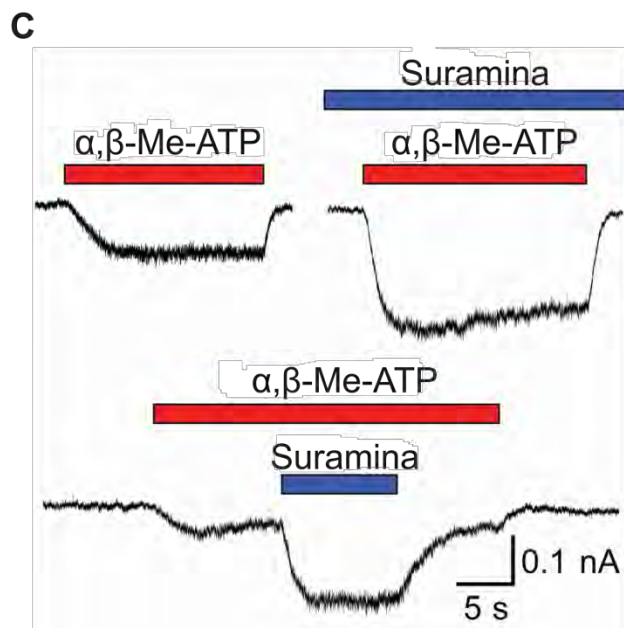
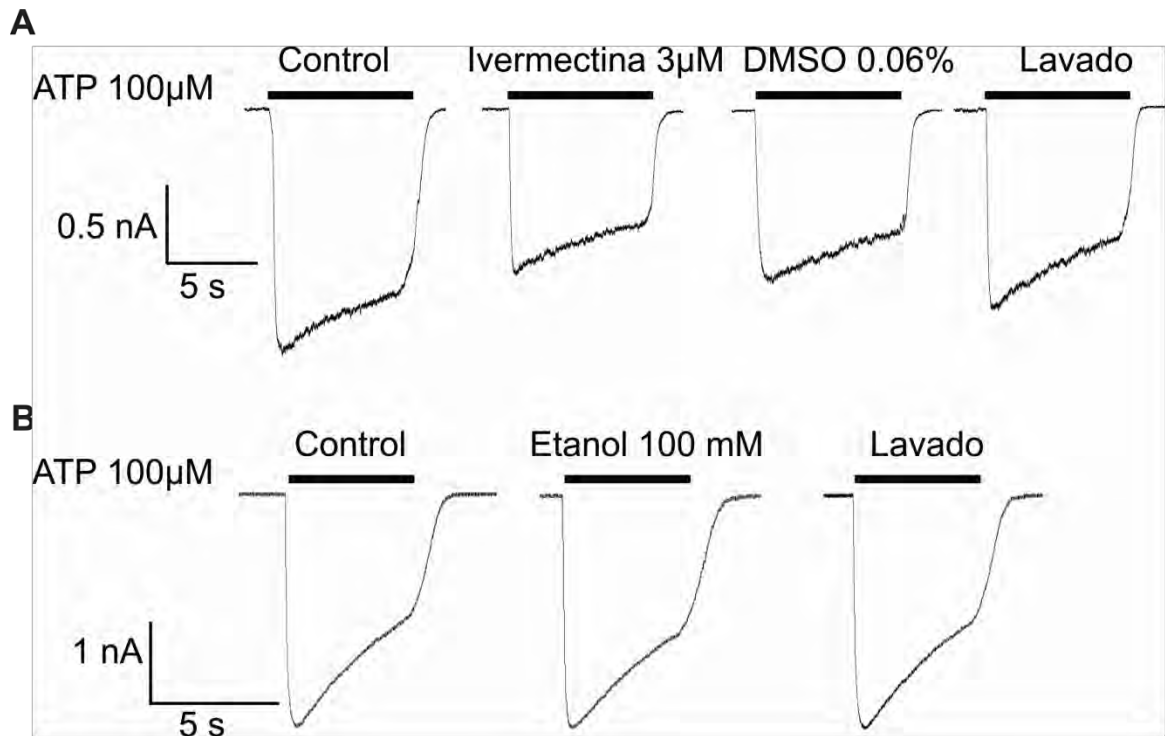


Figura 9. Efecto de la ivermectina, etanol y suramina sobre los canales nativos P2X de neuronas del plexo mientérico en cultivo.

Registros representativos de I_{ATP} de neuronas mientéricas A) La co-aplicación de IVM (3 μ M, n = 6) y ATP no induce efectos en la corriente comparada al control. B) Etanol (100 mM, n = 7) en presencia de ATP 100 μ M, no se observan cambios en la amplitud de la corriente. Las corrientes de IVM se registraron en las condiciones de control, en presencia de ivermectina (disuelto en DMSO), y durante la presencia de sólo DMSO. C) La suramina potencia las corrientes inducidas por $\alpha\beta$ -me-ATP ($I_{\alpha\beta\text{-me-ATP}}$) en todas las neuronas probadas. Registros representativos de la aplicación previa de suramina 30 μ M seguido de 300 μ M $\alpha\beta$ -me-ATP o diez segundos después de añadir el agonista. En ambos experimentos la suramina induce el efecto potenciador de la $I_{\alpha\beta\text{-me-ATP}}$ en comparación con el control. D) Las medias \pm SEM están representados por barras y líneas en su parte superior. NS, no significativo. Se fijó el voltaje de membrana a -60 mV. Los agonistas se aplicaron cada 5 min.

7.2 Clonación del *orf* de P2X4 del cobayo

A partir del RNA aislado de los tejidos de yeyuno, cerebro (corteza) y MC, se realizó la técnica de RT-PCR en un intento de clonar e identificar si el P2X4R se expresa en el SNE del cobayo. Las secuencias predichas en el ENSEMBL (ID: ENSCPOG00000004137) y *GenBank* (ID: 100716323) no son claras, por el contrario en ambas secuencias existen incongruencias en la región del UTR 5' y el exón 1 del gen. Para resolver este problema, clonamos el P2xr4 usando la secuencia consenso de Kozak en el ATG inicial y un oligonucleótido reversa basado en 3'UTR (n= 7 cobayos). Amplificamos el *orf*, utilizando los primers P2X4g1S y P2X4g1A (véase la Tabla 2) obteniendo un producto de PCR de aproximadamente 1,17 kb (Figura 10A). Se aislaron dos secuencias de yeyuno con una longitud de 1167 (P2rx4 v1) y 864 (P2rx4 v2), las cuales codifican para 388 y 287 aminoácidos, respectivamente. Ambas secuencias clonadas (P2rx4 v1 y

P2rx4 v2) se reportaron en la base de datos Genbank como: JX417449 y JX417450, respectivamente.

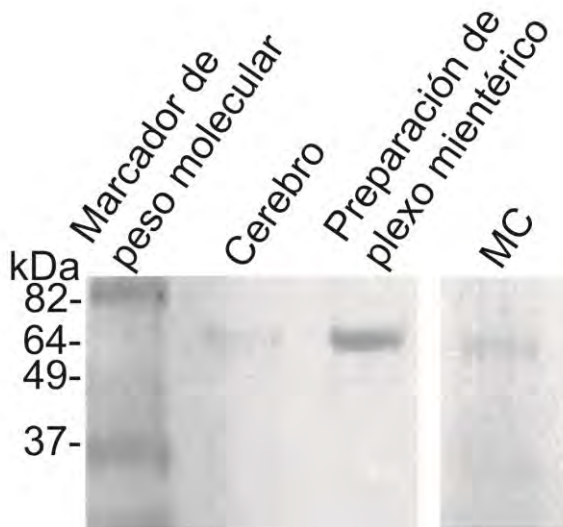
7.3 El receptor P2X4 se expresa en diferentes tejidos del cobayo

Preparaciones de proteínas de cerebro, plexo mientérico y de MC, se analizaron para la inmunorreactividad a P2X4R por *Western blot* usando un anticuerpo policlonal (H-40) P2X4 anti-humano contra el N-terminal. Se observaron bandas inmunorreactivas positivas aproximadamente a 70 kDa (Figura 10B) tal y como se esperaba para P2X4R (Nieto-Pescador *et al.*, 2013b; Oglesby *et al.*, 1999). Por otra parte, cuando se realizó la electroforesis de proteínas en condiciones super reductoras con 80 mM de DTT adicional (ver materiales y métodos) se observaron dos bandas de inmunorreactividad positivas, correspondiente con el peso molecular predicho para las dos variantes clonadas a partir de yeyuno, 44kDa y 25 kDa, respectivamente (Figura 10C). Sin embargo, en la preparación del cerebro y de MC sólo se visualizó una banda a 70 kDa aproximadamente. Se realizó control sin anticuerpo primario y se llevó a cabo el experimento usando preparación de proteína de ovocitos de *Xenopus laevis* ovocitos que expresan P2X2R (Linan-Rico *et al.*, 2012 480; Nieto-Pescador *et al.*, 2013b) no se observó inmunoreactividad en estos experimentos (datos no mostrados).

A



B



C

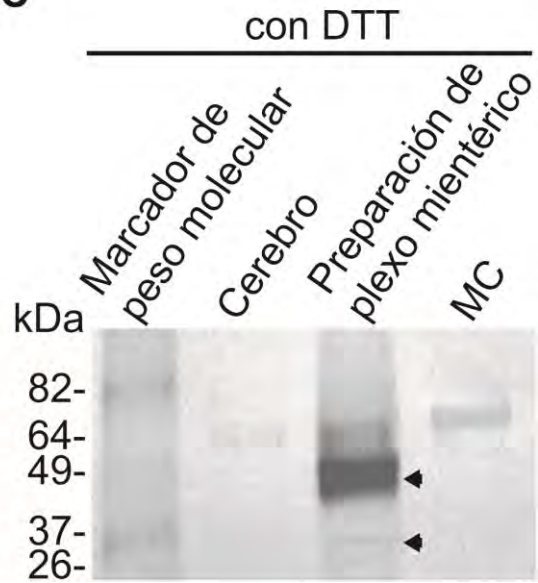


Figura 10. La proteína y ARNm de P2X4 se expresan en el intestino delgado.

A) Gel de agarosa para RT-PCR de P2X4 a partir de ARN de cerebro, yeyuno y células mononucleares (MC). El control negativo se realizó sin templado. La identidad P2X4 fue confirmado por análisis de secuenciación de los productos de PCR. B) Western Blot de preparaciones de cerebro, mientérico y MC para el P2X4. La inmunorreactividad se visualizó mediante el uso de TMB. Las muestras se resolvieron en SDS-PAGE al 12 % en condiciones desnaturalizantes en presencia de un agente reductor (buffer de muestra), las bandas de inmunorreactividad se observaron a 70 kDa que corresponde aproximadamente con P2X4R v1 como era esperado, no se observa P2X4R V2 en estas condiciones, o C) con 80 mM de DTT adicional, la inmunoreactividad para el cerebro y MC fueron similares a la condición anterior, sólo en la preparación mientérico se detectaron tres bandas , una igual a la reportada anteriormente y dos bandas que corresponden con el peso molecular predicho para P2X4R v1 (44 kDa) y P2X4 v2 (25 kDa), se indican con puntas de flecha. No se observaron inmunoreactividad sin el anticuerpo primario.

7.4 El intestino delgado del cobayo presenta dos variantes de splicing del receptor P2X4

La identidad de las secuencias de cDNA fue confirmada por secuenciación del DNA, la secuencia se conserva idéntica en los tres tejidos analizados: cerebro, intestino y células mononucleares (n=4 cobayos). La variante P2rx4 v1 fue 86 % idéntica en nucleótidos con la secuencia de humano (NM_002560) y ratón (NM_011026), mientras que la variante P2rx4 v2 fue 89 % idéntica con ambas especies. Por otra parte, las secuencias de aminoácidos de P2rx4 v1 fue 89 y 88 % idéntica a las proteínas humanas y de ratón respectivamente, P2rx4 V2 fue 91 % idéntica en sus aminoácidos conservados para las dos especies. Clonamos el P2xr4 usando la secuencia consenso de Kozak en el ATG inicial y un oligonucleótido reversa basado en 3' UTR (ver materiales y métodos), esta estrategia nos permitió amplificar el *ORF* completo. Los productos de PCR obtenidos y clonados del P2xr4 v1 contienen 12 exones (Figura 11B), compartiendo con sus ortólogos de mamíferos el número de exones conservados, y su tamaño, a excepción de los exones nueve y doce, que son dos nt más corto que en los otros mamíferos. La secuencia P2rx4 v2 sufrió la combinación de tres eventos de splicing: procesamiento alternativo del 5' del sitio de splicing (5'ss) en el exón cuatro en el nucleótido +423, saltando a los exones cinco, seis y 121 nt del exón siete y el procesamiento alternativo del 3' del sitio de splicing en la posición +625 (Figura 11C). El alineamiento de las secuencias clonadas con el DNA genómico coincide con la estructura de los 11 exones reportados en las bases de datos Genbank y Ensembl. Sin embargo, en ninguna de las dos bases de datos es clara la secuencia del primer exón y la del primer intrón (Figura suplementaria 2). Cabe destacar que el exón 1 de las secuencias clonadas coincide al de sus ortólogos de rata, ratón y humano. La secuenciación y posterior análisis de las secuencias de aminoácidos reveló que el sitio de unión del ATP en el P2X4R v1 se conserva: K67 , K69 , F185 , T186 , N293 , F294 , R295 y K313 (Hattori *et al.*, 2012 1409; Kawate *et al.*, 2009), además de conservarse las diez cisteínas

características en el dominio extracelular, los seis sitios probables de N-glicosilaciones y el sitio de fosforilación de PKC en la región N-terminal (Boue-Grabot *et al.*, 2000). Por otro lado, la variante P2X4R v2 pierde 101 aminoácidos del dominio extracelular: entre ellos los residuos F185 y T186 que forman parte del sitio de unión a ATP, además de la mitad de las cisteínas conservadas y de los sitios de glicosilación (ver figura suplementaria 3). También se encontraron presentes los residuos específicos que contribuyen a la potenciación inducida por ivermectina de la I_{ATP} a través de canales P2X4: Trp46, Val47, Trp50, Val60, Asp331, M336 y Asn338 (Asatryan *et al.*, 2011 ; Hattori *et al.*, 2012 ; Jelinkova *et al.*, 2006), el residuo H241 importante para el efecto inhibitorio del etanol (Xiong *et al.*, 2005) y el motivo de endocitosis (YXXGL) también está presente en la dos variantes P2X4R (Royle *et al.*, 2002) (Figura 11A).

7.5 El ARNm de P2X4R se expresa en la gran mayoría de las neuronas del plexo mientérico en cultivo.

Con la intención de tener mayor precisión en el diagnóstico de la expresión del RNAm, realizamos RT-PCR anidadas en neuronas mientéricas individuales utilizando los oligonucleótidos descritos en la tabla 2. Los productos de PCR se resolvieron en gel de agarosa y se obtuvo una banda con el tamaño esperado de 550 nucleótidos en 64 de 84 células analizadas (76%) de 9 cobayos diferentes. Esta evidencia concuerda con la proporción de neuronas que responden con potenciación por Suramina de las corrientes inducidas por $\alpha\beta$ -me-ATP (77%). Un ejemplo representativo de estos experimentos se muestra en la Figura 12A. Los productos de PCR se confirmaron por secuenciación, con una identidad de nucleótidos 99.9 % con la secuencia clonada a partir de intestino y disponible en la base de datos NCBI (JX417449).

7.6 Inmunorreactividad para el receptor P2X4 en neuronas mientéricas

La inmunoreactividad a P2X4 en neuronas mientéricas del yeyuno en cultivo (Figura 12B) es consistente con nuestros resultados anteriores; RT-PCR y Western blot. De manera similar al reporte de la presencia del receptor P2X4 en células nerviosas del intestino de ratón (Nieto-Pescador *et al.*, 2013b) identificamos la presencia de la proteína utilizando un anticuerpo policlonal anti-P2RX4 humano (ORB 100.036) (dirigido a sitios diferentes de la C-terminal). La expresión de la subunidad P2X4 fue apoyada por la potenciación de I_{ATP} por suramina. En aparente contradicción con estos resultados no encontramos efecto de la ivermectina ni etanol para modular las corrientes evocadas por ATP como se describe para el receptor homomérico P2X4R recombinante (Davies *et al.*, 2002 520; Khakh *et al.*, 1999 505; Li *et al.*, 2000 511; Priel *et al.*, 2004 519).

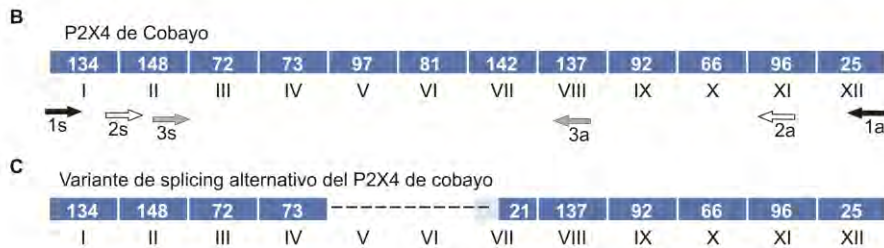
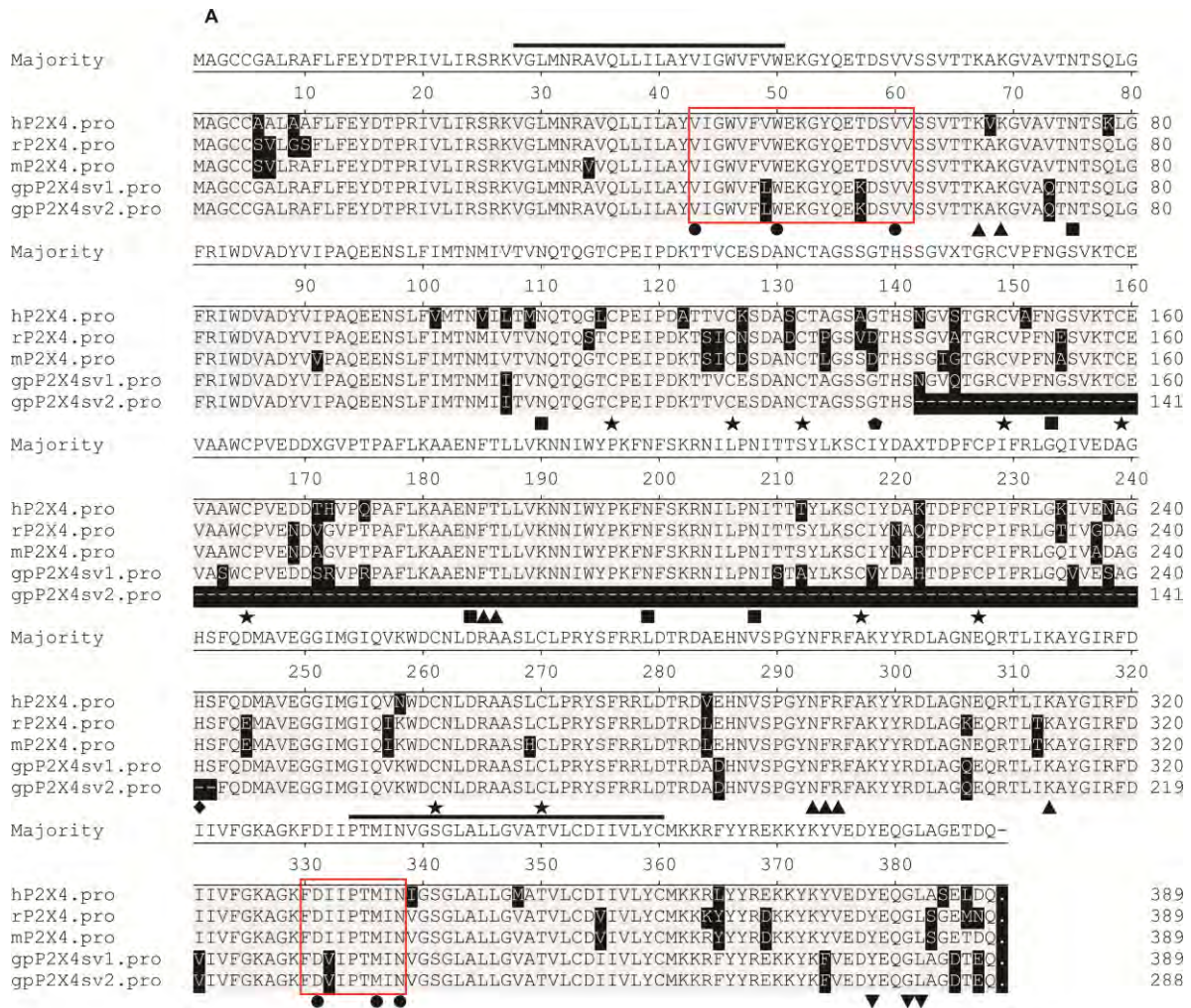
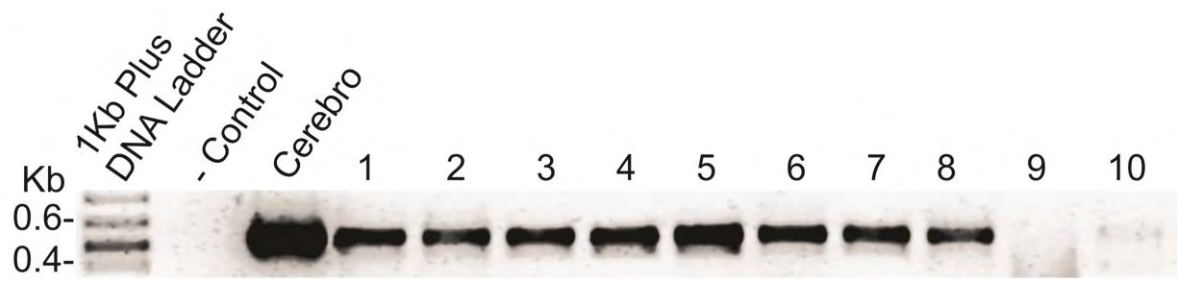


Figura 11. Análisis de secuencia de las variantes P2X4 de cobayo.

A) Alineación de secuencias aminoácidos entre P2X4 de cobayo, humano, rata y ratón. Las líneas sobre la secuencia representan los dos dominios transmembrana. Los aminoácidos implicados en el sitio de unión de ATP, cisteínas conservadas y sitios de N-glicosilación se muestran con triángulos, estrellas y cuadrados, respectivamente. Residuos importantes para la unión de IVM se muestran con círculos rellenos y las regiones completas del binding pocket de IVM

y el etanol se muestran en el cuadro rojo. El residuo H241 importante para el efecto inhibitor de etanol se denota con rombo, y el cambio de D138G en conejillo de indias que se demostró que era importante para el efecto inhibitor de suramina en la rata y ratón se muestra en el pentágono. El motivo de endocitosis aparece con triángulos invertidos. B) Representación esquemática de la organización de exones de la variante de la secuencia completa, formado por doce exones, y. C) disposición esquemática de exones de la variante de splicing alternativo P2X4 v2, que combina tres eventos de empalme: 5' y 3' sitios de splicing alternativos y un pérdida de exón. Como resultado de esta variante ha perdido: i) toda la V y VI exones, y ii) el primer 121 nt del exón VII. Los oligonucleótidos para clonación y PCR anidadas se indican con flechas en B).

A



B



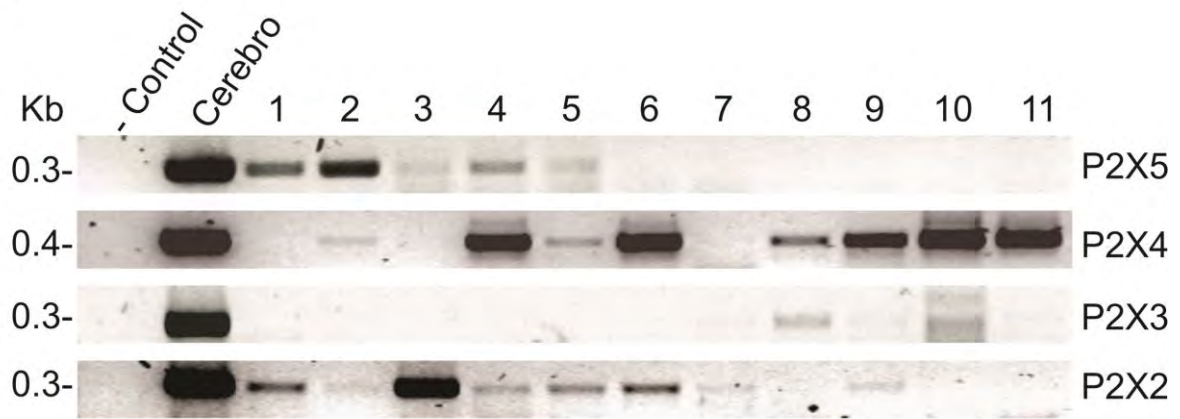
Figura 12. Neuronas mientéricas en cultivo expresan el ARNm y la proteína P2X4.

A) Gel de agarosa (1%) de la amplificación por RT-PCR del P2X4R de 10 neuronas mientéricas diferentes (carril 1 a 10). El control negativo sin templado, control positivo se realizó usando cDNA de cerebro. Los productos de PCR corresponden con 552 pb para P2X4R v1. No se observó el transcrito correspondiente a la variante de splicing de 249. B) La mayoría de las neuronas del plexo mientérico en cultivo mostraron inmunorreactividad a P2X4, como se observa por la técnica de diaminobencidíina, algunas neuronas se indican con cabezas de flecha. La inmunoreactividad fue impedida cuando las neuronas no se expusieron a anticuerpo primario (datos no mostrados).

7.7 Los RNAm de P2X2, P2X3, P2X4 y P2X5 coexisten en la misma neurona mientérica

A la fecha se ha demostrado que varias subunidades P2X forman canales heterómeros en distintas combinaciones (Dubyak, 2007; Torres *et al.*, 1999). En un intento por comprender qué subunidades P2X y cómo contribuyen a la corriente provocada por ATP en el plexo mientérico; investigamos cuál de estos RNAm de P2X se expresa en la misma célula utilizando la técnica de RT-PCR múltiple de célula única. Encontramos cinco poblaciones de neuronas con diferentes combinaciones de subunidades P2X: (2,4,5); (4,5); (2,5); (3,4) y (2,4) (Figura 13A). Estas observaciones fueron apoyadas por la Inmunoprecipitación entre los receptores P2X de preparaciones de proteínas mientéricas (Figura 13B). En concordancia con los trabajos previos donde han reportado la co-inmunoprecipitación de subunidades P2X o bien la formación de canales heteroméricos (Compan *et al.*, 2012; Lewis *et al.*, 1995; Radford *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 1999), nosotros observamos que las subunidades P2X (2 + 3), (2 + 5), (4 + 5), (3 + 5) son co-inmunoprecipitadas de la preparación del plexo mientérico. Por otro lado, en discrepancia con las subunidades P2X recombinantes de rata (Torres *et al.*, 1999), la proteína nativa P2X4R de cobayo fue capaz de inmunoprecipitar con las subunidades P2X2 y P2X3 (Figura 13B), de manera análoga a lo observado en el experimento de coexpresión de los transcriptos en células individuales mediante RT-PCR. No se detectó ninguna banda en el lavado anterior a la disociación de los complejos inmunes precipitados o en ausencia de anticuerpos P2X (IP (-)) a pesar de mostrar una cantidad similar de proteína en todos los carriles del gel teñido con Coomassie. Proteínas que probablemente representan las cadenas pesadas de las IgG desprendidas de las perlas de sefarosa (Figura suplementaria 4).

A



B

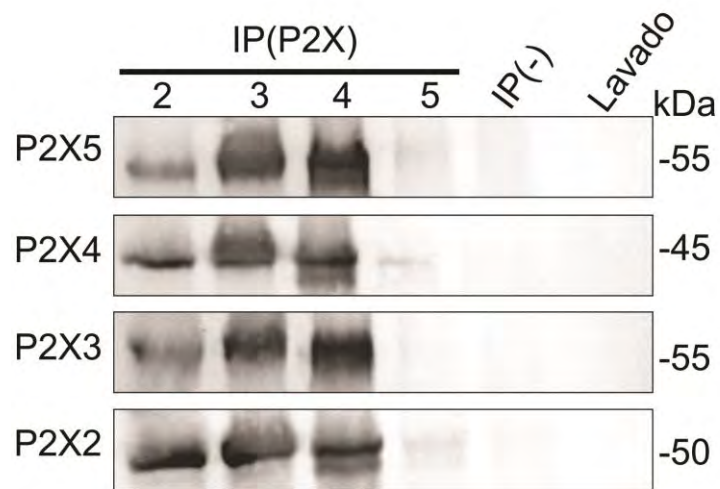


Figura 13. Neuronas mientéricas en cultivo expresan diferentes combinaciones de ARNm y proteína de P2X2, P2X3, P2X4 y P2X5.

A) Gel de agarosa (1%) que muestra los productos de RT-PCR múltiple de célula única de 11 neuronas mientéricas diferentes (carril 1 a 11), se analizó cada célula para P2X2 (272bp), P2X3 (300)bp, P2X4 (362 pb) y P2X5 (287 pb). El control negativo se realizó sin templado, cDNA de cerebro se utilizó como control positivo. Se encontraron cinco poblaciones de neuronas con diferentes combinaciones de subunidades: P2X (2,4,5); P2X (4,5); P2X (2,5); P2X (3,4) y P2X (2,4). B) El *Western blot* con anticuerpos anti-P2X2, P2X3 anti-, anti-P2X4 o anticuerpos anti-P2X5 reveló la co-inmunoprecipitación de las subunidades P2X: P2X2R, P2X3R, P2X4R o P2X5R nativas del plexo mientérico del cobayo. No se detectó ninguna banda en el lavado anterior (último carril) a la disociación de los complejos inmunes precipitados o en ausencia de anticuerpos P2X (IP (-)).

8 DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que demuestra la secuencia de la subunidad P2X4 del cobayo, la cual se encuentra en la mayor parte de las neuronas mientéricas. La participación de esta subunidad en canales funcionales de estas neuronas es apoyada por la co-inmunoprecipitación de la subunidad con otros receptores purinérgicos y por el efecto potenciador de la suramina sobre la I_{ATP} . En contraste con sus efectos en otras especies, la ivermectina y el etanol no tuvieron efecto sobre la I_{ATP} , lo cual asociamos a dos cambios en los aminoácidos V49L y el de la T57K ubicados en el *binding pocket* de la ivermectina y del etanol.

El efecto potenciador de la suramina, tal como ha sido reportado previamente en esta especie (Guerrero-Alba *et al.*, 2010) y en receptores P2X4 homoméricos recombinantes de rata y de ratón (Bo *et al.*, 1995; Townsend-Nicholson *et al.*, 1999), resulta congruente con las secuencias de aminoácidos de la subunidad P2X4Rv1 reportada en este trabajo dado que conserva una G138 al igual que en humano y D138 en rata y ratón, la cual corresponde a K138 en el P2X1 murino, aminoácido esencial para el efecto inhibitor de la suramina (Sim *et al.*, 2008 528). En el humano, rata y ratón los cambios mencionados parecen ser responsables de la modulación potenciadora en P2X4, a pesar que este receptor conserva la Q78 implicada en la afinidad a la suramina (Garcia-Guzman *et al.*, 1996 494). Nosotros evaluamos el efecto de suramina sobre las corrientes inducidas por el α,β me-ATP, nucleótido no hidrolizable por las ectonucleotidasas lo que nos permite descartar un efecto directo de la suramina sobre la actividad ectonucleotidasa (Barajas-Lopez *et al.*, 1996a). En conjunto, estos hallazgos permiten sugerir que la subunidad P2X4 podría ser responsable por la potenciación inducida por la suramina de las I_{ATP} . A diferencia de los canales homoméricos recombinantes de P2X4 donde se ha estudiado la potenciación de suramina, en las neuronas

mientéricas del cobayo la suramina tiene un efecto bifásico sobre I_{ATP} (Guerrero-Alba *et al.*, 2010), él cual no se observa en canales nativos de ratón o de rata (Bo *et al.*, 1995; Townsend-Nicholson *et al.*, 1999) lo que indica la probable formación de canales heterólogos (Guerrero-Alba *et al.*, 2010).

El análisis bioinformático de secuencias de ambas variantes nos permitió identificar múltiples residuos de relevancia para la actividad del canal, tales como el sitio de unión del ATP en P2X4R v1 (Hattori *et al.*, 2012 1409; Kawate *et al.*, 2009), además de conservar las cisteínas características, sitios probables de N-glicosilaciones y el sitio de fosforilación de PKC en la región N-terminal (Boue-Grabot *et al.*, 2000; North, 2002). También encontramos presentes los residuos específicos que contribuyen a la potenciación inducida por ivermectina de la I_{ATP} a través de canales P2X4: Trp46, Val47, Trp50, Val60, Asp331, M336 y Asn338 (Hattori *et al.*, 2012; Jelinkova *et al.*, 2008; Jelinkova *et al.*, 2006; Priel *et al.*, 2004) (Figura 11A). Esta misma región se ha propuesto como probable sitio de unión para el etanol (Asatryan *et al.*, 2010; Popova *et al.*, 2013). Esta región del *binding pocket* para la ivermectina/etanol se encuentra en la parte extracelular de la subunidad, arriba de TM1 y TM2, en el vestíbulo previo a la membrana (Asatryan *et al.*, 2010; Asatryan *et al.*, 2008; Popova *et al.*, 2010). Se ha reportado un efecto antagónico de la ivermectina sobre las acciones inhibitorias del etanol sobre el receptor P2X4 (Asatryan *et al.*, 2011; Asatryan *et al.*, 2010; Popova *et al.*, 2013). Además en trabajos recientes se ha asociado al receptor P2X4 con la preferencia e ingesta de alcohol (Asatryan *et al.*, 2011; Bortolato *et al.*, 2013; Yardley *et al.*, 2012; Yi *et al.*, 2009). En estos mismos trabajos se ha propuesto a la ivermectina como un agente que puede disminuir la ingesta y preferencia al alcohol vía receptores P2X4 en ratón.

Si bien el *binding pocket* para la ivermectina/etanol del receptor clonado se encuentra conservado, existen cambios en dos aminoácidos vecinos. En particular en la V49 y el de la T57 de la rata, ratón y humano se encuentran sustituidos por una L49 y una K57, respectivamente. Debido a la naturaleza de estos cambios y la

vecindad con él sitio de interacción de ivermectina-etanol proponemos que estos son responsables de la falta de efectos de la ivermectina y el etanol en las I_{ATP}. Efectos bien caracterizados en los P2X4 de humano, rata y ratón (Jelinkova *et al.*, 2008; Khakh *et al.*, 1999; Nieto-Pescador *et al.*, 2013b; Priel *et al.*, 2004; Roberts *et al.*, 2006).

La probable participación de estos residuos fue predicha con un ensayo *in silico* por medio de la simulación molecular del receptor. Las secuencias de aminoácidos se analizaron para identificar la formación de estructuras secundarias transmembranales (TMpred , <http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/TMPRED> y Kyte-Doolittle hydrophathy plot) (Kyte *et al.*, 1982 521), del cual se predijeron un dominio intracelular y dos transmembrana α -hélices conectadas por un *loop* extracelular. Mientras que la variante V2 P2X4R, que perdido 101 aminoácidos del dominio extracelular mantiene el dominio intracelular y el dominio transmembrana por lo que es posible que pueda ser integrada a la membrana (Ver Figuras suplementarias 3 y 5).

Utilizando la estructura por difracción de rayos X del P2X4 del pez cebra (Kawate *et al.*, 2009 473) (Hattori *et al.*, 2012 474), generamos un modelo por homología del P2X4R v1 en estado cerrado (PDB 4DW0) a 2.9 Å y abierto (PDB 4DW1) a 2.8 Å (Figura 14). Tras la identificación de los residuos que contribuyen al *binding pocket* de IVM y etanol, se analizaron los cambios puntuales de la V49 y K57 de la proteína de cobayo (L49 y T57 en rata, ratón y humano). El modelo mostro que la K57 se encuentra hacia el interior del canal bloqueando el acceso al vestíbulo en el apo estado cerrado (Figura 15B), probablemente por los efectos estéricos debidos a la diferencia de tamaño con la treonina y al cambio en la polaridad del residuo en cada subunidad del trímero. Mientras que el apo estado abierto la misma K57 gira junto con TM1 y TM2 aproximadamente 10° y 55°, en contra de las manecillas del reloj en un eje perpendicular a la membrana alejando la subunidad casi 3 Å del eje central hacia afuera (Figura 15D). Este movimiento de cada una de las subunidades origina un rearrreglo entre las interacciones de las

cadenas laterales de los aminoácidos, formando un amplio espacio en el vestíbulo adyacente al dominio transmembranal, se ha propuesto que este espacio puede ser ocupado por la ivermectina internalizándose en la parte superior de la membrana (Figura 17C). Sin embargo, en el P2X4 de cobayo, durante el giro de la subunidad, la lisina 57 se ubica hacia el centro de este vestíbulo impidiendo el posicionamiento y la interacción de la molécula de IVM con los aminoácidos D331, M336, W46 y W50 que pueden tener un papel importante en los efectos observados entre la IVM y el etanol (Figura 16 D y E). Los aminoácidos D331 y M336 coinciden además como sitios importantes en el efecto inhibitorio del etanol sobre las corrientes inducidas por ATP (Popova *et al.*, 2010), estos autores también probaron la mutante T57A, la cual no presenta un efecto significativo. El análisis muestra la diferencia en el motivo de unión generado por el cambio de la T57 por K (Figura 16). Se denota en la imagen la reducción del área del *binding pocket* y la formación de puentes de hidrogeno entre la K y la molécula de IVM en el modelo de cobayo a diferencia del modelo del pez cebra, donde la T no interacciona directamente con la IVM.

Ambos datos, la no potenciación en presencia de ivermectina y la no inhibición del etanol sobre las corrientes de I_{ATP} contrastan con los reportes previos respecto al efecto de ambas drogas sobre el receptor P2X4 de otras especies y con los datos obtenidos durante este trabajo tanto en la detección de RNAm como con la expresión de la proteína en las neuronas mientéricas del cobayo en cultivo. Sin embargo; estos fenómenos pueden ser explicados por la formación de canales heteroméricos con propiedades distintivas, además de la heterogeneidad de la expresión de las subunidades P2X dentro de las mismas neuronas entéricas. Por otra parte las diferencias en la secuencia aminoacídica en el sitio de unión de la ivermectina, esto es: el cambio de K57T respecto al canal P2X4 de otras especies genera una mutante natural que representa un cambio estérico y en la polaridad del residuo el cual puede alterar el sitio de interacción de la molécula Ivermectina y etanol. Datos preliminares en nuestro laboratorio de la expresión heteróloga del receptor P2X4 de cobayo en células HEK 293 muestran que la proteína es capaz

de integrarse a la membrana y y formar canales funcionales al responder a la aplicación de ATP 100 μ M (Ver apéndice A).

El *orf* de P2X4 no había sido clonado, así como tampoco se tenía evidencia directa de su expresión en el cobayo. Nosotros aislamos la secuencia del cerebro, del intestino y de células mononucleares del cobayo y clonamos dos secuencia a partir del RNA del intestino, una variante de 1.17 kb y otra más corta de 864 kb, las cuales codifican 388 y 287 aminoácidos, respectivamente. La variante de mayor tamaño conserva 12 exones al igual que sus ortólogos de rata, ratón y humano, mientras que la variante 2 sufre tres eventos de splicing: procesamiento alternativo del 5' del sitio de splicing (5'ss) en el exón cuatro en el nucleótido +423, saltando a los exones cinco, seis y 121 nt del exón siete y el procesamiento alternativo del 3' del sitio de splicing en la posición +625 (Figura 11C). El alineamiento de las secuencias clonadas con el DNA genómico coincide con la estructura de los 11 exones reportados en las bases de datos Genbank y Ensembl. Sin embargo en ninguna de las dos bases de datos es clara la secuencia correspondiente al primer exón ni al primer intrón (Figura suplementaria 2). Cabe destacar que el exón 1 de las secuencias clonadas coincide al de sus ortólogos de rata, ratón y humano. Ambas variantes fueron identificadas por inmunoreactividad de un anticuerpo anti-P2X4 al ser separadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida solo en altas concentraciones de un agente reductor (DTT) a una movilidad relativa cercana a la predicha para ambas variantes (44kDa y 25 kDa, respectivamente). Por el contrario, cuando las condiciones de reducción eran las consideradas estándar la banda visualizada fue similar a la reportada en la literatura (Nieto-Pescador *et al.*, 2013b; Oglesby *et al.*, 1999), muy probablemente en una conformación con residuos glicosilados o formando pequeños complejos con otras proteínas a pesar de las condiciones desnaturizantes y reductoras. La variante de 25 kDa no fue observada en las muestras de cerebro y células mononucleares, esto corresponde con los experimentos para identificar la expresión del RNAm, aunque en los experimentos en célula única tampoco fue identificada. Anteriormente (Brookes, 2001; Ruan *et*

et al., 2005) reportaron la expresión de P2X2, P2X3, P2X5 en el plexo mientérico del cobayo, además, en este estudio se demostró la presencia de P2X4 en el mismo tipo celular por inmunocitoquímica, western blot y PCR de célula única donde encontramos que el 76% de las neuronas expresan el RNAm, a diferencia de (Hu *et al.*, 2001a) quien no encuentra inmunorreactividad para P2X4 en intestino delgado, dichas diferencias pueden deberse al anticuerpo, nosotros utilizamos un anticuerpo policlonal dirigido a toda la proteína como se describe previamente (Nieto-Pescador *et al.*, 2013b). Además, de esto buscamos la coexpresión del RNAm de P2X2, P2X3, P2X4 Y P2X5 en la misma célula, observando que si bien no son expresados todos por la misma neurona en el mismo tiempo, es posible distinguir sub poblaciones de neuronas que expresan algunas de las subunidades P2X: (2,4,5); (4,5); (2,5); (3,4) y (2,4). Estas observaciones fueron apoyadas por la Inmunoprecipitación entre los receptores P2X de preparaciones de proteínas mientéricas. En concordancia con los trabajos previos donde han reportado la co-inmunoprecipitación de subunidades P2X o bien la formación de canales heteroméricos (Compan *et al.*, 2012; Lewis *et al.*, 1995; Radford *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 1999), nosotros observamos que las subunidades P2X (2+3), (2+5), (4+5), (3+5) son co-inmunoprecipitadas de la preparación del plexo mientérico. Por otro lado, en discrepancia con las subunidades P2X recombinantes de rata (Torres *et al.*, 1999), la proteína nativa P2X4R de cobayo fue capaz de inmunoprecipitar con las subunidades P2X2 y P2X3. Esta es la primera vez que se reporta dicha interacción, aun así consideramos que son necesarios experimentos funcionales y de expresión heteróloga para poder confirmar si las subunidades P2X4+3 y P2X4+2 pueden formar canales heteroméricos. Como se ha mencionado a lo largo del texto, en la naturaleza, la combinación de subunidades P2X dependen en gran medida del tipo celular, y esta característica es la principal responsable de la respuesta a ATP en dicha célula (Barajas-Lopez *et al.*, 1996a; Khakh, 2001; Zhou *et al.*, 1996).

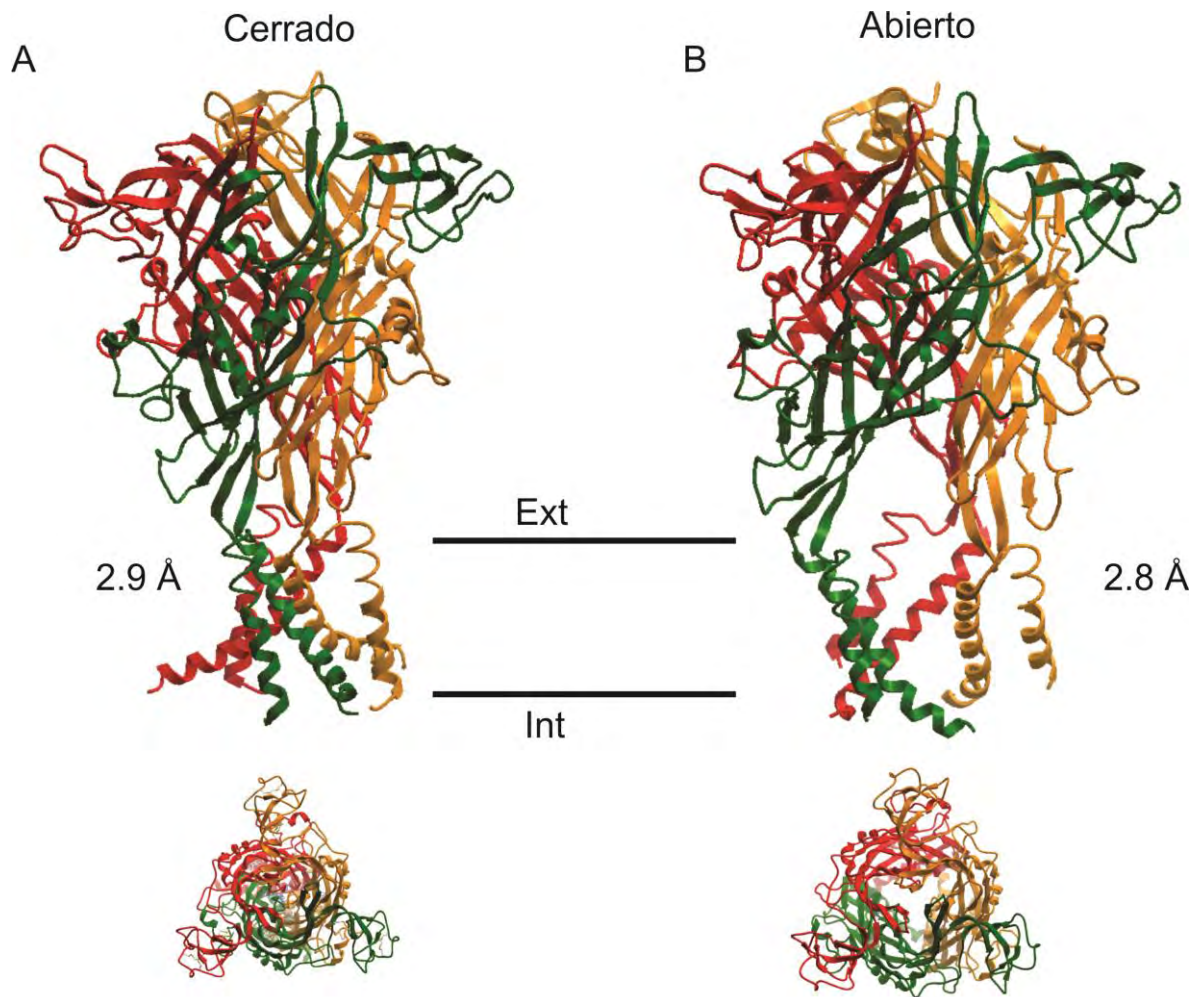


Figura 14. Modelo en listones del receptor P2X4 de cobayo.

A) Vista longitudinal del modelo en apo estado cerrado a 2.9 Å; B) modelo en apo estado abierto a 2.8 Å, y una vista del lado extracelular en las dos conformaciones. Cada subunidad se muestra en un color diferente.

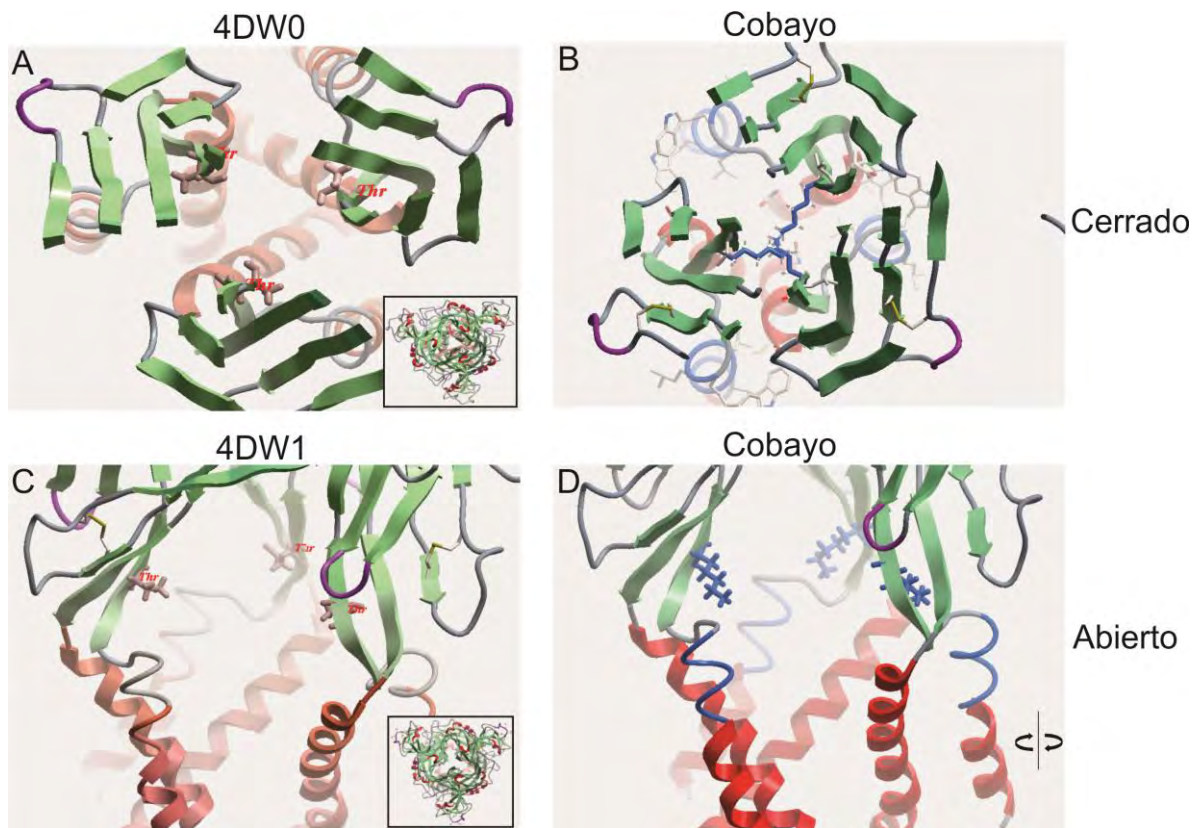


Figura 15. Comparación del modelo del receptor P2X4 de cobayo con el del pez cebra en estado cerrado y abierto.

A y B) Vista transversal mostrando el poro del receptor y la localización de la mutante K57T en estado cerrado. C y D) corresponden al PDB 4DW1 y P2X4R de cobayo, en estado abierto respectivamente.

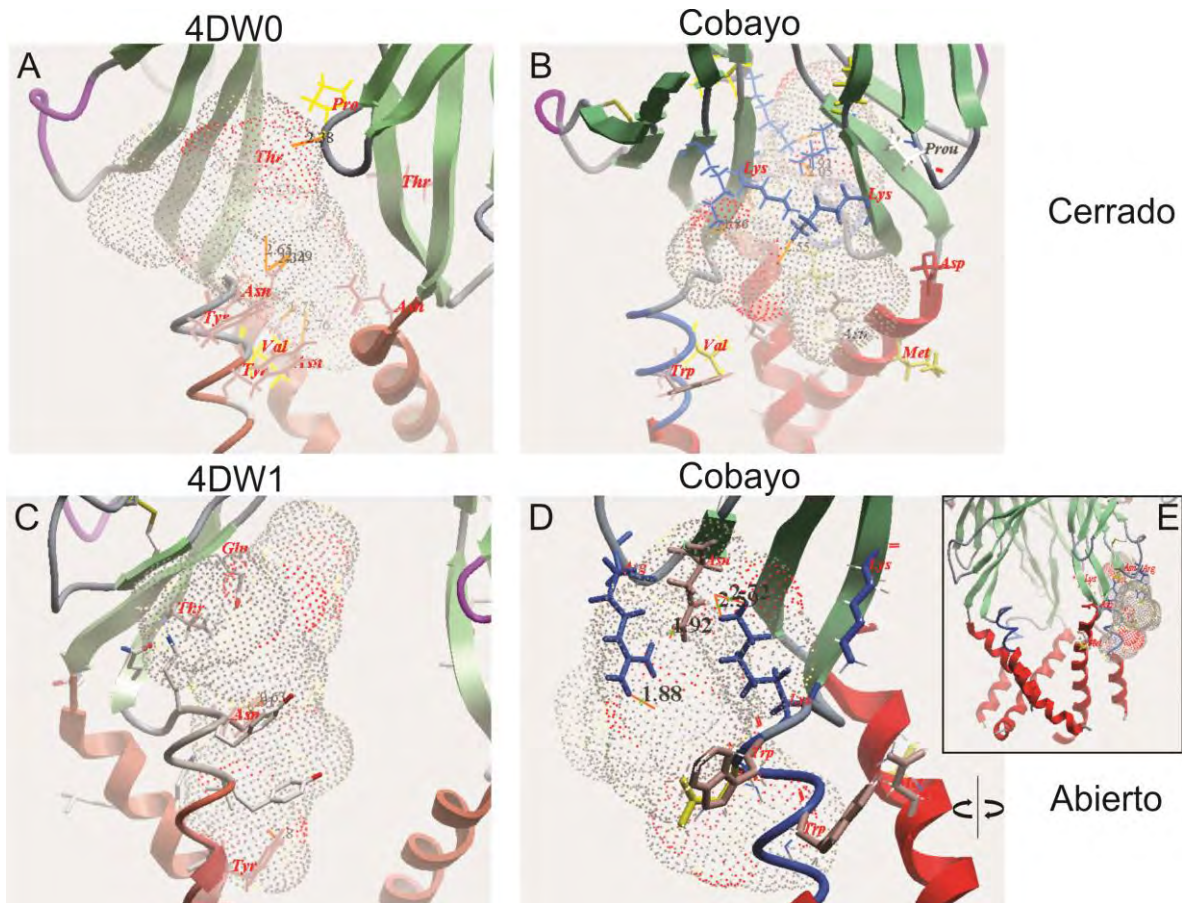


Figura 16. Simulación molecular de la interacción del receptor P2X4 con la molécula de Ivermectina.

Comparación del modelo del pez cebra y cobayo A y B) Simulación de la unión de la ivermectina en el estado cerrado. C y D) Simulación de la unión de ivermectina en estado abierto. Nótese la diferencia de aminoácidos que participan en la formación del *binding pocket* en estado abierto y cerrado. La molécula de ivermectina es desplazada hacia el ectodominio del vestíbulo y no entre los transmembranales 1 y 2 de cada subunidad en el modelo de cobayo debido a la posición de la K57. E) Vista general, muestra como la molécula de IVM no puede acceder al vestíbulo entre los transmembranales. La nube de puntos representa la molécula de IVM, las barras amarillas numeradas representan enlaces de Hidrogeno.

9 CONCLUSIONES

Este es el primer estudio en el que se clona y secuencía el *orf* de la subunidad P2X4 del cobayo y demuestra su presencia en la mayor parte de las neuronas mientéricas. Nuestros datos confirman la presencia de la proteína P2X4 y que ésta forma canales funcionales cuando es expresada en sistemas heterólogos, probablemente mediante la formación de heterotrímeros en las neuronas mientéricas. La ivermectina y el etanol carecen de efecto sobre estos canales lo que suponemos se debe al cambio encontrado en un aminoácido vecino (K57) al *binding pocket* de ivermectina y etanol.

10 REFERENCIAS

- Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, *et al.* (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological reviews* **58**(3): 281-341.
- Abdollah S, Catlin MC, Brien JF (1993). Ethanol neuro-behavioural teratogenesis in the guinea pig: behavioural dysfunction and hippocampal morphologic change. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **71**(10-11): 776-782.
- Antonio LS, Stewart AP, Xu XJ, Varanda WA, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM (2011). P2X4 receptors interact with both P2X2 and P2X7 receptors in the form of homotrimers. *British journal of pharmacology* **163**(5): 1069-1077.
- Asatryan L, Nam HW, Lee MR, Thakkar MM, Saeed Dar M, Davies DL, *et al.* (2011). Implication of the purinergic system in alcohol use disorders. *Alcoholism, clinical and experimental research* **35**(4): 584-594.
- Asatryan L, Popova M, Perkins D, Trudell JR, Alkana RL, Davies DL (2010). Ivermectin antagonizes ethanol inhibition in purinergic P2X4 receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **334**(3): 720-728.
- Asatryan L, Popova M, Woodward JJ, King BF, Alkana RL, Davies DL (2008). Roles of ectodomain and transmembrane regions in ethanol and agonist action in purinergic P2X2 and P2X3 receptors. *Neuropharmacology* **55**(5): 835-843.
- 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. *European journal of pharmacology* **250**(1): 141-145.
- Barajas-Lopez C, Huizinga JD, Collins SM, Gerzanich V, Espinosa-Luna R, Peres AL (1996a). P2x-purinoceptors of myenteric neurones from the guinea-pig ileum and their unusual pharmacological properties. *British journal of pharmacology* **119**(8): 1541-1548.
- Barajas-Lopez C, Peres AL, Espinosa-Luna R (1996b). Cellular mechanisms underlying adenosine actions on cholinergic transmission in enteric neurons. *The American journal of physiology* **271**(1 Pt 1): C264-275.
- Bennett MR, Gibson WG (1995). On the contribution of quantal secretion from close-contact and loose-contact varicosities to the synaptic potentials in the vas deferens. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **347**(1320): 187-204.

- Bo X, Kim M, Nori SL, Schoepfer R, Burnstock G, North RA (2003). Tissue distribution of P2X4 receptors studied with an ectodomain antibody. *Cell and tissue research* **313**(2): 159-165.
- Bo X, Zhang Y, Nassar M, Burnstock G, Schoepfer R (1995). A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. *FEBS letters* **375**(1-2): 129-133.
- Bornstein JC, Furness JB, Kunze WA (1994). Electrophysiological characterization of myenteric neurons: how do classification schemes relate? *Journal of the autonomic nervous system* **48**(1): 1-15.
- Bortolato M, Yardley MM, Khoja S, Godar SC, Asatryan L, Finn DA, *et al.* (2013). Pharmacological insights into the role of P2X4 receptors in behavioural regulation: lessons from ivermectin. *Int J Neuropsychopharmacol* **16**(5): 1059-1070.
- Boue-Grabot E, Archambault V, Seguela P (2000). A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels. *The Journal of biological chemistry* **275**(14): 10190-10195.
- Boue-Grabot E, Barajas-Lopez C, Chakfe Y, Blais D, Belanger D, Emerit MB, *et al.* (2003). Intracellular cross talk and physical interaction between two classes of neurotransmitter-gated channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**(4): 1246-1253.
- Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D (1994). New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* **371**(6497): 519-523.
- Braun M, Wendt A, Karanauskaite J, Galvanovskis J, Clark A, MacDonald PE, *et al.* (2007). Corelease and differential exit via the fusion pore of GABA, serotonin, and ATP from LDCV in rat pancreatic beta cells. *The Journal of general physiology* **129**(3): 221-231.
- Brookes SJ (2001). Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *The Anatomical record* **262**(1): 58-70.
- Brown SG, Townsend-Nicholson A, Jacobson KA, Burnstock G, King BF (2002). Heteromultimeric P2X(1/2) receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **300**(2): 673-680.
- Buell G, Lewis C, Collo G, North RA, Surprenant A (1996). An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *The EMBO journal* **15**(1): 55-62.
- Burnstock G (2007). Purine and pyrimidine receptors. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **64**(12): 1471-1483.
- Catlin MC, Abdollah S, Brien JF (1993). Dose-dependent effects of prenatal ethanol exposure in the guinea pig. *Alcohol* **10**(2): 109-115.

Chaumont S, Jiang LH, Penna A, North RA, Rassendren F (2004). Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors. *The Journal of biological chemistry* **279**(28): 29628-29638.

Clyne JD, LaPointe LD, Hume RI (2002). The role of histidine residues in modulation of the rat P2X(2) purinoceptor by zinc and pH. *The Journal of physiology* **539**(Pt 2): 347-359.

Coddou C, Yan Z, Obsil T, Huidobro-Toro JP, Stojilkovic SS (2011). Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacological reviews* **63**(3): 641-683.

Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* **56**(1): 2-5.

Compan V, Ulmann L, Stelmashenko O, Chemin J, Chaumont S, Rassendren F (2012). P2X2 and P2X5 subunits define a new heteromeric receptor with P2X7-like properties. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32**(12): 4284-4296.

Costa M, Brookes SJ, Steele PA, Gibbins I, Burcher E, Kandiah CJ (1996). Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* **75**(3): 949-967.

Davies DL, Asatryan L, Kuo ST, Woodward JJ, King BF, Alkana RL, *et al.* (2006). Effects of ethanol on adenosine 5'-triphosphate-gated purinergic and 5-hydroxytryptamine receptors. *Alcoholism, clinical and experimental research* **30**(2): 349-358.

Davies DL, Kochegarov AA, Kuo ST, Kulkarni AA, Woodward JJ, King BF, *et al.* (2005). Ethanol differentially affects ATP-gated P2X(3) and P2X(4) receptor subtypes expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuropharmacology* **49**(2): 243-253.

Davies DL, Machu TK, Guo Y, Alkana RL (2002). Ethanol sensitivity in ATP-gated P2X receptors is subunit dependent. *Alcoholism, clinical and experimental research* **26**(6): 773-778.

Denlinger LC, Fisette PL, Sommer JA, Watters JJ, Prabhu U, Dubyak GR, *et al.* (2001). Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* **167**(4): 1871-1876.

Dubyak GR (2007). Go it alone no more--P2X7 joins the society of heteromeric ATP-gated receptor channels. *Molecular pharmacology* **72**(6): 1402-1405.

Edwards FA, Gibb AJ, Colquhoun D (1992). ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* **359**(6391): 144-147.

- Eickhorst AN, Berson A, Cockayne D, Lester HA, Khakh BS (2002). Control of P2X(2) channel permeability by the cytosolic domain. *The Journal of general physiology* **120**(2): 119-131.
- Ennion S, Hagan S, Evans RJ (2000). The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X1 receptors. *The Journal of biological chemistry* **275**(45): 35656.
- Ennion SJ, Evans RJ (2002). Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X(1) receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface. *Molecular pharmacology* **61**(2): 303-311.
- Evans RJ, Derkach V, Surprenant A (1992). ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature* **357**(6378): 503-505.
- Fountain SJ, Burnstock G (2009). An evolutionary history of P2X receptors. *Purinergic signalling* **5**(3): 269-272.
- Fountain SJ, North RA (2006). A C-terminal lysine that controls human P2X4 receptor desensitization. *The Journal of biological chemistry* **281**(22): 15044-15049.
- Furness JB (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the autonomic nervous system* **81**(1-3): 87-96.
- Furness JB, Costa M (1980). Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience* **5**(1): 1-20.
- Furness JB, Kunze WA, Bertrand PP, Clerc N, Bornstein JC (1998). Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Progress in neurobiology* **54**(1): 1-18.
- Furness JB, Sanger GJ (2002). Intrinsic nerve circuits of the gastrointestinal tract: identification of drug targets. *Current opinion in pharmacology* **2**(6): 612-622.
- Gabella G (1972). Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *Journal of anatomy* **111**(Pt 1): 69-97.
- Galligan JJ (2002a). Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* **14**(6): 611-623.
- Galligan JJ (2002b). Pharmacology of synaptic transmission in the enteric nervous system. *Current opinion in pharmacology* **2**(6): 623-629.
- Galligan JJ, Bertrand PP (1994). ATP mediates fast synaptic potentials in enteric neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **14**(12): 7563-7571.

Garcia-Guzman M, Soto F, Laube B, Stuhmer W (1996). Molecular cloning and functional expression of a novel rat heart P2X purinoceptor. *FEBS letters* **388**(2-3): 123-127.

Goyal RK, Chaudhury A (2013). Structure activity relationship of synaptic and junctional neurotransmission. *Autonomic neuroscience : basic & clinical* **176**(1-2): 11-31.

Gray EG (1963). Electron microscopy of presynaptic organelles of the spinal cord. *Journal of anatomy* **97**: 101-106.

Guerrero-Alba R, Valdez-Morales E, Juarez EH, Miranda-Morales M, Ramirez-Martinez JF, Espinosa-Luna R, *et al.* (2010). Two suramin binding sites are present in guinea pig but only one in murine native P2X myenteric receptors. *European journal of pharmacology* **626**(2-3): 179-185.

Guo LH, Trautmann K, Schluesener HJ (2005). Expression of P2X4 receptor by lesional activated microglia during formalin-induced inflammatory pain. *Journal of neuroimmunology* **163**(1-2): 120-127.

Hattori M, Gouaux E (2012). Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* **485**(7397): 207-212.

Hirst GD, Holman ME, Spence I (1974). Two types of neurones in the myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig. *The Journal of physiology* **236**(2): 303-326.

Hu HZ, Gao N, Lin Z, Gao C, Liu S, Ren J, *et al.* (2001). P2X(7) receptors in the enteric nervous system of guinea-pig small intestine. *The Journal of comparative neurology* **440**(3): 299-310.

Inoue K, Tsuda M, Koizumi S (2004). ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: chronic pain and microglia: involvement of the ATP receptor P2X4. *Journal of pharmacological sciences* **94**(2): 112-114.

Jelinkova I, Vavra V, Jindrichova M, Obsil T, Zemkova HW, Zemkova H, *et al.* (2008). Identification of P2X(4) receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **456**(5): 939-950.

Jelinkova I, Yan Z, Liang Z, Moonat S, Teisinger J, Stojilkovic SS, *et al.* (2006). Identification of P2X4 receptor-specific residues contributing to the ivermectin effects on channel deactivation. *Biochemical and biophysical research communications* **349**(2): 619-625.

Jiang LH, Kim M, Spelta V, Bo X, Surprenant A, North RA (2003). Subunit arrangement in P2X receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**(26): 8903-8910.

Jiang LH, Rassendren F, Surprenant A, North RA (2000). Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *The Journal of biological chemistry* **275**(44): 34190-34196.

Jiang R, Taly A, Grutter T (2013). Moving through the gate in ATP-activated P2X receptors. *Trends in biochemical sciences* **38**(1): 20-29.

Jo YH, Role LW (2002). Coordinate release of ATP and GABA at in vitro synapses of lateral hypothalamic neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**(12): 4794-4804.

Jo YH, Schlichter R (1999). Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nature neuroscience* **2**(3): 241-245.

Katz B (2003). Neural transmitter release: from quantal secretion to exocytosis and beyond. *Journal of neurocytology* **32**(5-8): 437-446.

Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E (2009). Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* **460**(7255): 592-598.

Keramidas A, Moorhouse AJ, Schofield PR, Barry PH (2004). Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Progress in biophysics and molecular biology* **86**(2): 161-204.

Khakh BS (2001). Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nature reviews. Neuroscience* **2**(3): 165-174.

Khakh BS, North RA (2006). P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* **442**(7102): 527-532.

Khakh BS, Proctor WR, Dunwiddie TV, Labarca C, Lester HA (1999). Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**(17): 7289-7299.

Kim M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, Surprenant A (2001). Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *The EMBO journal* **20**(22): 6347-6358.

Kimura KA, Brien JF (1998). Hippocampal nitric oxide synthase in the fetal guinea pig: effects of chronic prenatal ethanol exposure. *Brain research. Developmental brain research* **106**(1-2): 39-46.

King BF, Townsend-Nicholson A, Wildman SS, Thomas T, Spyer KM, Burnstock G (2000). Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in *Xenopus* oocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**(13): 4871-4877.

Koshimizu TA, Tsujimoto G (2006). Functional role of spliced cytoplasmic tails in P2X2-receptor-mediated cellular signaling. *Journal of pharmacological sciences* **101**(4): 261-266.

Kunze WA, Furness JB (1999). The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annual review of physiology* **61**: 117-142.

Kyte J, Doolittle RF (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology* **157**(1): 105-132.

Le KT, Babinski K, Seguela P (1998). Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**(18): 7152-7159.

Le Novere N, Changeux JP (1999). The Ligand Gated Ion Channel Database. *Nucleic acids research* **27**(1): 340-342.

Le Novere N, Changeux JP (1995). Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *Journal of molecular evolution* **40**(2): 155-172.

Lewis C, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G, Surprenant A (1995). Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* **377**(6548): 432-435.

Li C, Xiong K, Weight FF (2000). Ethanol inhibition of adenosine 5'-triphosphate-activated current in freshly isolated adult rat hippocampal CA1 neurons. *Neuroscience letters* **295**(3): 77-80.

Linan-Rico A, Jaramillo-Polanco J, Espinosa-Luna R, Jimenez-Bremont JF, Linan-Rico L, Montano LM, *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**(3): 394-404.

Marquez-Klaka B, Rettinger J, Bhargava Y, Eisele T, Nicke A (2007). Identification of an intersubunit cross-link between substituted cysteine residues located in the putative ATP binding site of the P2X1 receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**(6): 1456-1466.

Methot N, Ritchie BD, Blanton MP, Baenziger JE (2001). Structure of the pore-forming transmembrane domain of a ligand-gated ion channel. *The Journal of biological chemistry* **276**(26): 23726-23732.

Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* **423**(6943): 949-955.

Nicke A, Baumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, *et al.* (1998). P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *The EMBO journal* **17**(11): 3016-3028.

- Nicke A, Kerschensteiner D, Soto F (2005). Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X1 and P2X4 subunits. *Journal of neurochemistry* **92**(4): 925-933.
- Nieto-Pescador MG, Guerrero-Alba R, Valdez-Morales E, Espinosa-Luna R, Jimenez-Vargas N, Linan-Rico Andromeda A, *et al.* (2013). P2X4 subunits are part of P2X native channels in murine myenteric neurons. *European journal of pharmacology* **709**(1-3): 93-102.
- Norenberg W, Sobottka H, Hempel C, Plotz T, Fischer W, Schmalzing G, *et al.* (2012). Positive allosteric modulation by ivermectin of human but not murine P2X7 receptors. *British journal of pharmacology* **167**(1): 48-66.
- North RA (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews* **82**(4): 1013-1067.
- Oglesby IB, Lachnit WG, Burnstock G, Ford APDW (1999). Subunit specificity of polyclonal antisera to the carboxy terminal regions of P2X receptors, P2X1 through P2X7. *Drug Development Research* **47**(4): 189-195.
- Olsen RW, Sieghart W (2009). GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* **56**(1): 141-148.
- Pankratov Y, Lalo U, Verkhratsky A, North RA (2007). Quantal release of ATP in mouse cortex. *The Journal of general physiology* **129**(3): 257-265.
- Popova M, Asatryan L, Ostrovskaya O, Wyatt LR, Li K, Alkana RL, *et al.* (2010). A point mutation in the ectodomain-transmembrane 2 interface eliminates the inhibitory effects of ethanol in P2X4 receptors. *Journal of neurochemistry* **112**(1): 307-317.
- Popova M, Trudell J, Li K, Alkana R, Davies D, Asatryan L (2013). Tryptophan 46 is a site for ethanol and ivermectin action in P2X4 receptors. *Purinergic signalling*.
- Priel A, Silberberg SD (2004). Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels. *The Journal of general physiology* **123**(3): 281-293.
- Radford KM, Virginio C, Surprenant A, North RA, Kawashima E (1997). Baculovirus expression provides direct evidence for heteromeric assembly of P2X2 and P2X3 receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **17**(17): 6529-6533.
- Revah F, Bertrand D, Galzi JL, Devillers-Thierry A, Mulle C, Hussy N, *et al.* (1991). Mutations in the channel domain alter desensitization of a neuronal nicotinic receptor. *Nature* **353**(6347): 846-849.

Roberts JA, Vial C, Digby HR, Agboh KC, Wen H, Atterbury-Thomas A, *et al.* (2006). Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **452**(5): 486-500.

Robertson SJ, Edwards FA (1998). ATP and glutamate are released from separate neurones in the rat medial habenula nucleus: frequency dependence and adenosine-mediated inhibition of release. *The Journal of physiology* **508** (Pt 3): 691-701.

Rokic MB, Stojilkovic SS, Vavra V, Kuzyk P, Tvrdonova V, Zemkova H (2013). Multiple roles of the extracellular vestibule amino acid residues in the function of the rat P2X4 receptor. *PloS one* **8**(3): e59411.

Royle SJ, Bobanovic LK, Murrell-Lagnado RD (2002). Identification of a non-canonical tyrosine-based endocytic motif in an ionotropic receptor. *The Journal of biological chemistry* **277**(38): 35378-35385.

Ruan HZ, Burnstock G (2005). The distribution of P2X5 purinergic receptors in the enteric nervous system of mouse. *Cell and tissue research* **319**(2): 191-200.

Rubio ME, Soto F (2001). Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**(2): 641-653.

Schwab JM, Guo L, Schluesener HJ (2005). Spinal cord injury induces early and persistent lesional P2X4 receptor expression. *Journal of neuroimmunology* **163**(1-2): 185-189.

Seguela P, Hagehighi A, Soghomonian JJ, Cooper E (1996). A novel neuronal P2x ATP receptor ion channel with widespread distribution in the brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **16**(2): 448-455.

Silinsky EM, Gerzanich V, Vanner SM (1992). ATP mediates excitatory synaptic transmission in mammalian neurones. *British journal of pharmacology* **106**(4): 762-763.

Sim JA, Broomhead HE, North RA (2008). Ectodomain lysines and suramin block of P2X1 receptors. *The Journal of biological chemistry* **283**(44): 29841-29846.

Sneddon P (2000). Electrophysiology of autonomic neuromuscular transmission involving ATP. *Journal of the autonomic nervous system* **81**(1-3): 218-224.

Soto F, Garcia-Guzman M, Karschin C, Stuhmer W (1996). Cloning and tissue distribution of a novel P2X receptor from rat brain. *Biochemical and biophysical research communications* **223**(2): 456-460.

Stelmashenko O, Lalo U, Yang Y, Bragg L, North RA, Compan V (2012). Activation of trimeric P2X2 receptors by fewer than three ATP molecules. *Molecular pharmacology* **82**(4): 760-766.

Surprenant A, North RA (2009). Signaling at purinergic P2X receptors. *Annual review of physiology* **71**: 333-359.

Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1999). Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *The Journal of biological chemistry* **274**(10): 6653-6659.

Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1998a). N-Linked glycosylation is essential for the functional expression of the recombinant P2X2 receptor. *Biochemistry* **37**(42): 14845-14851.

Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1998b). Topological analysis of the ATP-gated ionotropic [correction of ionotrophic] P2X2 receptor subunit. *FEBS letters* **425**(1): 19-23.

Townsend-Nicholson A, King BF, Wildman SS, Burnstock G (1999). Molecular cloning, functional characterization and possible cooperativity between the murine P2X4 and P2X4a receptors. *Brain research. Molecular brain research* **64**(2): 246-254.

Tsuda M, Kuboyama K, Inoue T, Nagata K, Tozaki-Saitoh H, Inoue K (2009). Behavioral phenotypes of mice lacking purinergic P2X4 receptors in acute and chronic pain assays. *Molecular pain* **5**: 28.

Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, *et al.* (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* **424**(6950): 778-783.

Ulmann L, Hatcher JP, Hughes JP, Chaumont S, Green PJ, Conquet F, *et al.* (2008). Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**(44): 11263-11268.

Unwin N (1993). Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *Journal of molecular biology* **229**(4): 1101-1124.

Valdez-Morales E, Guerrero-Alba R, Linan-Rico A, Espinosa-Luna R, Zarazua-Guzman S, Miranda-Morales M, *et al.* (2011). P2X7 receptors contribute to the currents induced by ATP in guinea pig intestinal myenteric neurons. *European journal of pharmacology* **668**(3): 366-372.

Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, *et al.* (1994). A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* **371**(6497): 516-519.

Wildman SS, King BF, Burnstock G (1999). Modulation of ATP-responses at recombinant rP2X4 receptors by extracellular pH and zinc. *British journal of pharmacology* **126**(3): 762-768.

Wilkinson WJ, Jiang LH, Surprenant A, North RA (2006). Role of ectodomain lysines in the subunits of the heteromeric P2X2/3 receptor. *Molecular pharmacology* **70**(4): 1159-1163.

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. *Histochemistry and cell biology* **124**(5): 379-390.

Xiong K, Hu XQ, Stewart RR, Weight FF, Li C (2005). The mechanism by which ethanol inhibits rat P2X4 receptors is altered by mutation of histidine 241. *British journal of pharmacology* **145**(5): 576-586.

Xiong KM, Li CY, Weight FF (2000). Inhibition by ethanol of rat P2X(4) receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *British journal of pharmacology* **130**(6): 1394-1398.

Yamamoto K, Korenaga R, Kamiya A, Ando J (2000). Fluid shear stress activates Ca(2+) influx into human endothelial cells via P2X4 purinoceptors. *Circulation research* **87**(5): 385-391.

Yardley MM, Wyatt L, Khoja S, Asatryan L, Ramaker MJ, Finn DA, *et al.* (2012). Ivermectin reduces alcohol intake and preference in mice. *Neuropharmacology* **63**(2): 190-201.

Yi CL, Liu YW, Xiong KM, Stewart RR, Peoples RW, Tian X, *et al.* (2009). Conserved extracellular cysteines differentially regulate the inhibitory effect of ethanol in rat P2X4 receptors. *Biochemical and biophysical research communications* **381**(1): 102-106.

Zhou X, Galligan JJ (1996). P2X purinoceptors in cultured myenteric neurons of guinea-pig small intestine. *The Journal of physiology* **496** (Pt 3): 719-729.

Zimmermann H (2008). ATP and acetylcholine, equal brethren. *Neurochemistry international* **52**(4-5): 634-648.

11 APENDICE A

Subclonación de P2X4R a pCDNA3

Se obtuvo DNA plasmídico por lisis alcalina a partir de la transformación de *E. coli* con el plásmido de la construcción pGEMT- P2X4 sin el codón de paro y pCDNA3-YFP, respectivamente. Se realizó una digestión enzimática con la enzima Not I, la cual liberó un fragmento de 1200 pb aproximadamente del plásmido pGEMT- P2X4 y la respectiva linearización del plásmido pCDNA3-YFP en el sitio Not I en la región 5' a la secuencia de YFP. Ambos productos se purificaron e incubaron en presencia de la enzima ligasa T4 (*Promega, Winsconsin, USA*). El producto se utilizó para transformar bacterias de las cuales se extrajo DNA plasmídico por lisis alcalina. Después se caracterizó por secuenciación.

Transfección en células HEK 293

Se propagaron las células HEK 293 (células embrionarias de riñón humano), con el fin de realizar transfecciones transitorias. Esta técnica de transfección, se ha desarrollado principalmente para introducir ADN recombinante en el interior de la célula utilizando principalmente un lípido catiónico (*Lipofectamine 2000, Invitrogen*). De esta manera, se introdujo pCDNA3 P2X4R-YFP (ADN recombinante), en el cual se sitúa la secuencia codificante de un gen reportero (en este caso YFP), bajo una secuencia de regulación transcripcional, promotor *enhancer* del citomegalovirus (CMV). Se diluyó el ADN (8 µg) en 500 µl de medio Opti-MEM (Invitrogen) y se mezcló suavemente. Posteriormente se mezcló la lipofectamina (15 µl) en 500 µl de medio Opti-MEM, se mezcló e incubó por 5 min a temperatura ambiente. Después se mezcló el ADN en medio de cultivo más lipofectamina (volumen total 1000 µl) y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente permitiendo que el complejo ADN-lipofectamina se formara. Se agregó ADN-lipofectamina a una caja Petri de 60 mm, conteniendo una confluencia de

60% de células y se volvió a incubar a 37 °C y 5% de CO₂, durante 6 h. Posteriormente, se realizaron tres lavados con medio Opti-MEM, se levantaron las células y fueron plantadas en cajas de 48 pozos, los cuales contenían cubreobjetos redondos, se incubaron por 24-48 h para su posterior observación por microscopia de fluorescencia y registro electrofisiológico por medio de la técnica de *patch clamp* en su configuración de célula completa.

Resultados preliminares de la expresión del receptor P2X4 de cobayo en células HEK 293 muestran que la proteína es capaz de integrarse a la membrana y formar canales funcionales que responden a la aplicación de ATP (100 μM). No se observó ningún efecto del ATP en células sin transfectar o sin fluorescencia. La aplicación de etanol (100 mM) no parece ejercer ningún efecto en la amplitud de la corriente inducida por ATP.

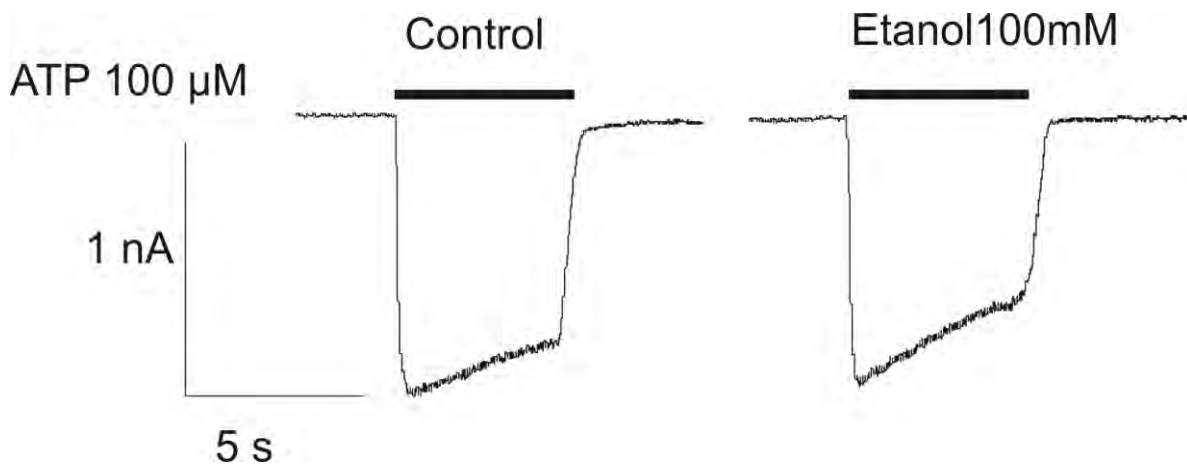


Figura suplementaria 1. Registro representativo de una corriente I_{ATP} (100 μM) de una célula HEK 293 que expresa al receptor P2X4 de cobayo.

Se muestra una aplicación con ATP 100 μM (n=5) y una co-aplicación con etanol 100 mM.(n=1) No se muestran cambios en la amplitud de la corriente. Los registros se realizaron a partir de las 48 h de transfección, se fijó el voltaje de membrana a -40 mV. Los farmacos se aplicaron cada 5 min.

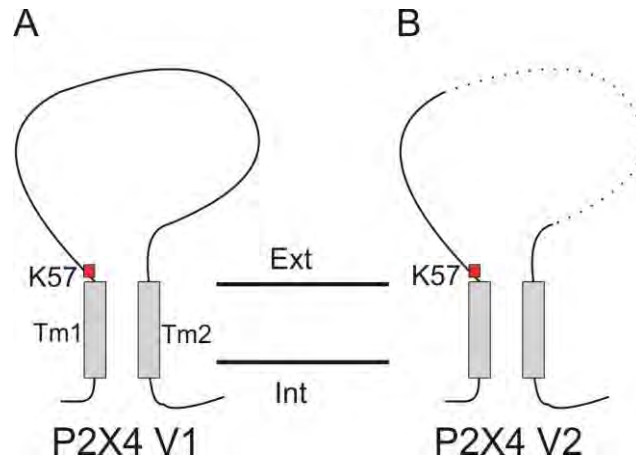


Figura suplementaria 3. Modelo topológico que muestra la región que pierde en el dominio extracelular la subunidad P2X4 v2.

(A) representa un modelo topológico del receptor P2X4 v1 y (B) el de P2X4 v2. Nótese la ubicación del K57 en la parte superior de TM1.

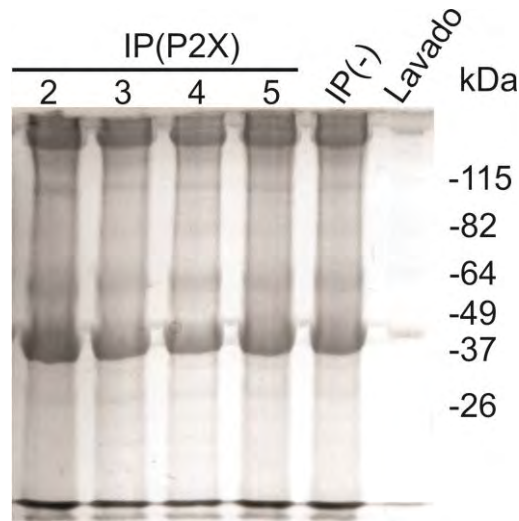


Figura suplementaria 4. Tinción de Coomassie de un gel de poliacrilamida

Se muestra un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras (ver métodos), correspondiente a las proteínas separadas después de la inmunoprecipitación. El control de inmunoprecipitación sin anticuerpo (IP(-)), muestra una cantidad de proteína similar a la presente en aquellos en los que se utilizó un anticuerpo. Sin embargo, ni en esta columna ni en la del lavado se observan bandas positivas cuando es revelado con anticuerpos anti-P2X (2, 3, 4 o

5) (ver Figura 13B), lo cual indica la especificidad de los anticuerpos y de la inmunoprecipitación.

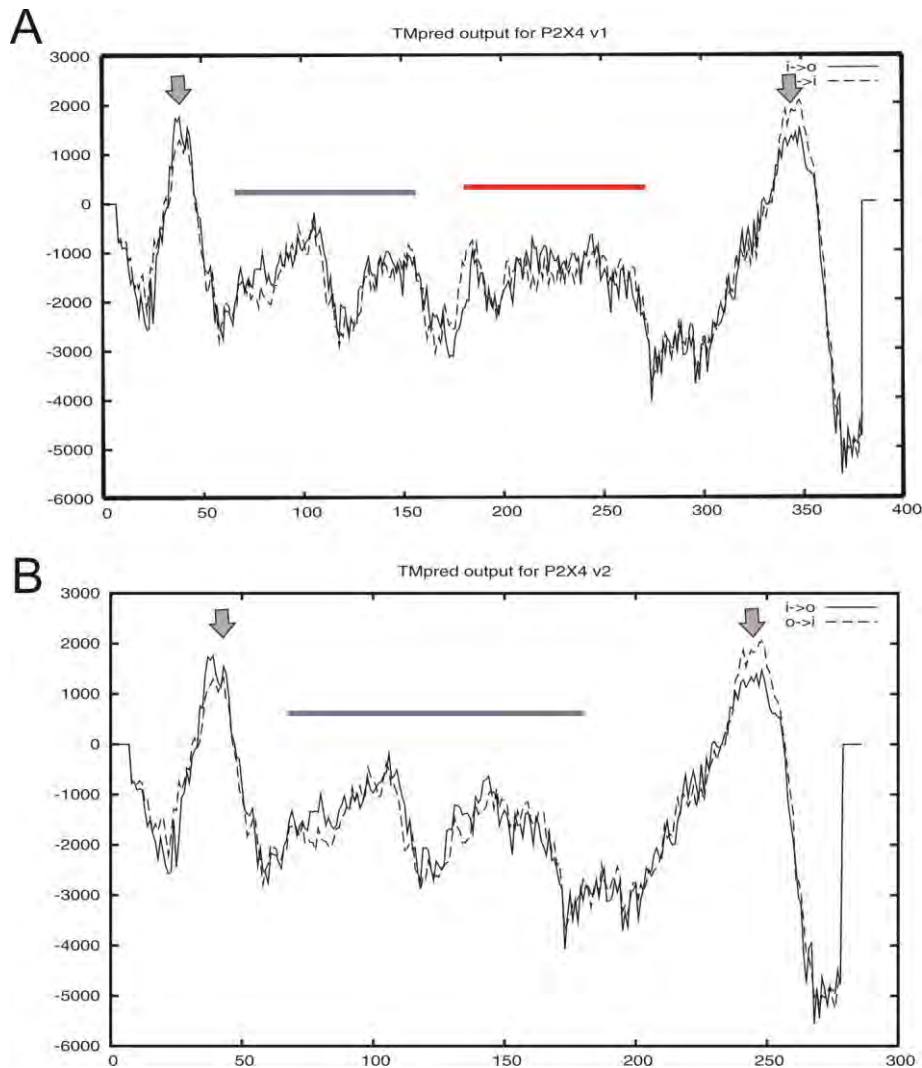


Figura suplementaria 5. Gráfico de hidropatía

Predicción de la formación de hélices α a través de la membrana con el programa TMpred, (A) P2X4 v1 y (B) P2X4 v2 pierde un segmento (línea roja) entre los dos picos principales (TM1y TM2, señalados con flechas). Valores positivos tienden a mayor hidrofobicidad, Se denotan dos picos con un valor cercano a 2.

Inhibition of extracellular nucleotides hydrolysis intensifies the allergic bronchospasm. A novel protective role of ectonucleotidases

J. Chávez¹, M. H. Vargas¹, D. C. Rebollar-Ayala², V. Díaz-Hernández³, J. E. Cruz-Valderrama², E. Flores-Soto², M. Flores-García⁴, N. N. Jiménez-Vargas⁵, C. Barajas-López⁵ & L. M. Montaña²

¹Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México DF;

²Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF; ³Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF; ⁴Departamento de Biología Molecular, Instituto Nacional de Cardiología, México DF; ⁵División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, S.L.P., México

To cite this article: Chávez J, Vargas MH, Rebollar-Ayala DC, Díaz-Hernández V, Cruz-Valderrama JE, Flores-Soto E, Flores-García M, Jiménez-Vargas NN, Barajas-López C, Montaña LM. Inhibition of extracellular nucleotides hydrolysis intensifies the allergic bronchospasm. A novel protective role of ectonucleotidases. *Allergy* 2013; **68**: 462–471.

Keywords

allergic bronchospasm; ATP; ectonucleotidases; epithelium; P2Y receptors.

Correspondence

Dr Luis M. Montaña, Departamento de Farmacología, Edificio de Investigación, sexto piso, laboratorio 3, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CP 04510, México DF, México.
Tel/fax: +5556665868
E-mail: lmmr@unam.mx

Accepted for publication 13 December 2012

DOI:10.1111/all.12113

Edited by: Angela Haczku

Abstract

Background: Nucleotides released to the extracellular space stimulate purinergic receptors, and their effects are modulated by ectonucleotidases. The role of ATP in the allergic bronchospasm has been scantily studied.

Methods: We used several techniques (plethysmography, organ baths, confocal microscopy, RT-PCR, ATP measurement) to explore the role of nucleotides and ectonucleotidases in the allergic bronchospasm in guinea pigs.

Results: While allergenic challenge with a low-dose ovalbumin (OVA) only produced a small bronchospasm (~2-fold the basal lung resistance), previous inhibition of ectonucleotidases by ARL-67156 greatly intensified this response (~11-fold the basal lung resistance, with 44% mortality). Bronchoalveolar lavage fluid obtained during this bronchospasm contained increased ATP concentration. This potentiation was abolished by antagonism of purinergic receptors (suramin+RB2) or TXA₂ receptor (SQ29548), or by intratracheal apyrase. In tracheal rings and lung parenchyma strips, OVA caused a concentration-dependent contraction. Suramin+RB2 or levamisole produced a significant rightward displacement of this response, and ARL-67156 did not modify it. Platelets stimulated with OVA released ATP. Confocal images of nonsensitized tracheas showed slight fluorescence for P2Y₆ receptors in epithelium and none for P2Y₄. Sensitized animals showed strong fluorescence to both receptors and to alkaline phosphatase in the airway epithelium. This correlated with a large increment in mRNA for P2Y₄ and P2Y₆ receptors in sensitized animals.

Conclusions: Nucleotides greatly potentiate the allergic bronchospasm when ectonucleotidases activity is diminished, and this effect is probably favored by the upregulation of P2Y₄ and P2Y₆ receptors in airway epithelium during sensitization. These results prompt for further research on these mechanisms in human asthma.

The potential role of extracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP) and related nucleotides in asthma has not been well documented, but some studies point out that ATP might be relevant. In 1996, Pellegrino et al. reported the lung function in eight asthmatic and eight healthy subjects who underwent bronchial challenge with inhaled methacholine, histamine,

and ATP (1). According to their data, airways from asthmatic subjects were 6400 times more sensitive to inhaled ATP than healthy controls, as evaluated by the provocative concentration causing a 15% decrease in the forced expiratory volume at first second (FEV₁). Moreover, among asthmatic subjects, inhaled ATP was 51 times more potent than

13 APENDICE C

Expression of P2X₃ and P2X₅ Myenteric Receptors Varies During the Intestinal Postnatal Development in the Guinea Pig

Raúl Loera-Valencia¹, Néstor N. Jiménez-Vargas¹, Egina C. Villalobos¹, Esri H. Juárez¹, Telma Liliana Lomas-Ramos¹, Rosa Espinosa-Luna¹, Luis M. Montaña², Jan D. Huizinga³, Carlos Barajas-López^{1*}

¹División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, SLP, México

²Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México

³Farncombe Family Digestive Health Research Institute, Department of Medicine. McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada

Short Title: "Postnatal expression of P2X myenteric receptors"

*Corresponding author:

Carlos Barajas-López

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) 834-2000 ext 2035

Fax: +52(444) 834-2010

Email: cbarajas@ipicyt.edu.mx

ABSTRACT

P2X₃ receptor expression in various tissues appears to be modulated by age. In the present study we used single cell RT-PCR to determine the number of P2X₃ positive myenteric neurons at different stages of guinea pig postnatal development and we tested if similar changes also occur to other myenteric P2X receptors. Moreover, we carried out whole cell recordings using *Patch Clamp* techniques to determine possible changes in P2X receptors sensitivity to ATP and α,β -methylene ATP (α,β -meATP) between newborn and adult animals. Our data indicate that P2X₃ subunit transcripts are present in a larger number of myenteric neurons from newborn guinea pigs whereas P2X₅ mRNA is found more frequently in adults. Expression of P2X₂ and P2X₄ transcripts do not change during postnatal development. In newborn animals, virtually all neurons expressing P2X₃ also expressed P2X₂ transcripts. This is important because these two subunits are known to form heteromeric channels. ATP potency to activate P2X receptors in neurons of both newborn and adult animals was the same. α,β -meATP, a known P2X₃ receptor agonist, induces only a marginal current despite the fact of the higher presence of P2X₃ subunits in newborns. These findings imply that P2X₃ subunits are mainly forming heteromeric, α,β -meATP insensitive channels perhaps because P2X₃ contribute with only one subunit to the heterotrimers whilst the other subunits could be P2X₂, P2X₄ or P2X₅.

Keywords: P2X receptors, myenteric neurons, single cell PCR, P2X₃ receptors, postnatal development

INTRODUCTION

The enteric nervous system (ENS) coordinates with other cell types to control gut functions and sustains life. The ENS is a network of neurons organized in ganglia, which communicates between them to form plexuses. The myenteric plexus plays an important role in the control of motility and possibly in sensing the distention that activates the peristaltic reflex (Bian *et al.*, 2003). The synaptic communication between myenteric neurons is based in excitatory and inhibitory signals, from which ATP has been extensively studied (Burnstock, 1972; Chen *et al.*, 1995; Khakh *et al.*, 2006; North, 2002; Surprenant *et al.*, 1995; Valera *et al.*, 1994). It is now accepted that P2X receptors mediate the rapid purinergic excitatory postsynaptic potentials in myenteric neurons. The existence of seven P2X subunits (P2X₁ to P2X₇) and their ability to form homotrimers as well as heterotrimers may account for the electrophysiological behavior of ATP induced currents, characteristic of specific P2X subunit combinations (e.g. P2X_{1/2}, P2X_{2/3}, P2X_{2/6} and P2X_{4/6}) (Surprenant *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 1999). P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅ and P2X₇ have been reported in the mouse and guinea pig myenteric plexus of the intestine (Linan-Rico *et al.*, 2012; Nieto-Pescador *et al.*, 2013a; Ohta *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2003; Ruan *et al.*, 2005; Valdez-Morales *et al.*, 2011).

In the rodent brain P2X subunits have been involved in neural differentiation, inhibition of axonal growth and apoptosis during development (Brosenitsch *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2013; Heine *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2005). In ganglionic neurons of the peripheral nervous system, particularly in sensory ganglia, P2X₃ expression is abundant in neural precursors during development and decreases over time until adulthood (Dunn *et al.*, 2005). Changes in P2X₃

expression occurs between embryonic and postnatal dorsal root ganglion neurons in the mouse, where uniform P2X₃ staining was shown by most embryonic neurons, but only 50% of neurons were P2X₃ positive 14 days after birth (P14) (Ruan *et al.*, 2004). Electrophysiological recordings also showed that rat superior cervical ganglion (SCG) neurons responded to α,β -methylene ATP (α,β -meATP) at embryonic day 18 (E18), birth and early postnatal stages but not at all in mature rat neurons (P17), where inward currents are still evoked by ATP, suggesting a prevalence of P2X₂ over P2X₃ in adulthood (Dunn *et al.*, 2005). In rat sensory ganglia, P2X₃ expression appears early (E12) in the development and it decreases prior to birth (Xiang *et al.*, 2004b). Although both sensory ganglia and myenteric ganglia arise from the neural crest cells during embryonic development (Bhatt *et al.*, 2013), important differences exist regarding the expression of P2X₃ receptors (Xiang *et al.*, 2004a). In the rat, immunoreactivity for P2X₃ is detected in extrinsic sensory nerves of the stomach very early during development (E12-14) but in the myenteric plexus of this organ it is seen only after birth, when 45% of myenteric neurons express P2X₃ receptors. P2X₃ positive neurons decreased subsequently and at P30 only about 13% were P2X₃ immunoreactive (Xiang *et al.*, 2004a).

Differential expression of other P2X subunits is observed during neurogenesis of the rat brain, where P2X₄ and P2X₅ are detectable from P1 to adulthood but not in the embryo stage (Burnstock *et al.*, 2011). In the myenteric plexus P2X₄ is present in adult ganglion neurons of the guinea pig and there is evidence of strong repression of P2X₅ in the development of neural precursors of the peripheral nervous system (Zeng *et al.*, 2013); however, the expression of these subunits has not been determined in the early myenteric plexus. A previous

work reported significant changes in morphology and electrophysiological behavior of myenteric neurons of the duodenum from the neonatal to the adult stage (Foong *et al.*, 2012). Thus, Dogiel Type II (DII) neurons from neonatal animals displayed prominent after-depolarizing potentials and shorter projections than adult DII neurons.

While changes in the physiology of the small intestine during postnatal development are evident, the role of the myenteric plexus and the molecular bases of these changes are not clear. Because P2X₃ receptor expression in various tissues appears to be modulated during development, in the present study, we used single cell RT-PCR to determine the number of P2X₃ positive myenteric neurons at different stages of the postnatal development and we tested if similar changes also occur for other myenteric P2X receptors. We found a downregulation of P2X₃ transcript levels in the small intestine of adult guinea pigs compared to newborn subjects. We also found that P2X₃ transcripts are expressed by a larger number of neurons in the newborn than in adulthood. Nevertheless whole-cell recordings of ATP-induced membrane currents indicate that variations of P2X₃ receptors do not correlate with higher sensitivity of P2X myenteric channels to ATP and α,β -meATP -a known P2X₃ receptor agonist. This evidence implies that other subunits are more important in determining the response of native P2X receptors to ATP stimulation in the small intestine. In agreement with this interpretation, we found that the number of myenteric neurons expressing P2X₂ and P2X₄ transcripts remains unchanged between newborn and adult stages, but neurons expressing P2X₅ transcripts increase in adulthood. P2X₇ receptor was not studied here because it is known to not form heteromeric channels (Khakh *et al.*, 2006; North,

2002). We discuss how P2X₃ subunits could be forming heteromeric channels without altering their sensitivity to ATP and α,β -meATP.

MATERIALS AND METHODS

Primary cultures of neurons from myenteric plexus of guinea pigs

Dunkin-Hartley guinea pigs (P0-P3, 80 g-100 g for newborns; P7-P15, 150-200 g for young adults and \geq P35 and on, \geq 250 g for adults) of either sex were killed by decapitation and a segment of 10-15 cm of the proximal jejunum was removed, placed in modified Krebs solution (126 mM NaCl, 1.2 mM NaH₂PO₄, 1.2 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 11 mM glucose, gassed with 95% O₂ and 5% CO₂) and opened longitudinally. The mucosa and submucosal layers of the intestinal segment were surgically removed. All the animals protocols used were approved by the Animal Care Committee of the IPICYT and are in agreement with the Guiding Principles for the Care and Use of Vertebrate Animals in Research and Training approved by the American Physiological Society.

At this point, the whole *muscularis externa* with the myenteric plexus (myenteric preparation) was dissociated using a sequential treatment with two enzymatic solutions as previously described (Barajas-Lopez *et al.*, 1996a). Briefly, the first solution contained papain (0.01 mg/ml activated with 0.4 mg/ml L-cysteine) and the second contained collagenase (1mg/ml) and dispase (4 mg/ml). Enzymes were washed with L15 medium and the neurons were plated on round coverslips coated with sterile rat-tail collagen in culture solution (97.5% v/v MEM, 2.5% v/v fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 10 U/ml penicillin, 10 μ g/ml streptomycin, 15 mM

glucose, 10 μ M cytosine- β -D-arabinofuranoside, 10 μ M fluorodeoxyuridine and 10 μ M uridine).

Intestinal RNA extraction

A segment of 10 cm approximately of the duodenum, jejunum or ileum were placed in a pre-cooled mortar and triturated in presence of liquid nitrogen. The same procedure was carried on with whole brain from newborns for positive controls. The resulting powder was weighted (75-100 mg) and used for RNA isolation.

RT-PCR

Tissues extracted from newborn, juvenile and adult small intestines and brains were triturated in a mortar with liquid nitrogen. Afterwards we weighted 100 mg of each tissue and collected it in eppendorf tubes with 1 ml lysis solution from RNAqueous RNA isolation kit (Ambion). The RNA was obtained from the lysis solution using an affinity column and was collected for cDNA synthesis. For each tissue we used 6 μ g of mRNA using superscript reverse transcriptase (Invitrogen) in the presence of oligo (dT) for 1.5 h at 42°C. We performed PCR in 25 μ l with 300-500 ng of cDNA, 0.2 μ M dNTPs, 2.5 μ M MgCl₂, one unit of Taq DNA polymerase (Invitrogen) and 0.4 micromoles of 10 μ M oligonucleotides (see Table 1 for nucleotide sequence and T_m). We assessed the specificity of the designed nucleotides (shown in Table 1) using the FastPCR software (Primer Digital Ltd.). Reaction conditions were as follows: Initial denaturation for 5 min at 95°C, then 35 amplification rounds composed of denaturation for 30s at 95°C, alignment for 30s at specific oligonucleotide temperature, extension for 1-1.5 min at 72°C; the final extension was 5 minutes at 72°C. We analyzed PCR products by electrophoresis

in 0.8% agarose gels stained with 1 µg/ml ethidium bromide. For GAPDH, negative controls included omission of the reverse transcriptase reaction; for *P2X₃* negative controls were performed with no cDNA template. Images were obtained with Gel-Doc 2000 documentation system (Bio-Rad). GAPDH to *P2X₃* expression ratio was calculated using Quantity One Software (Bio-Rad).

Single Cell RT-PCR

We used single myenteric neurons from 3 days old primary cultures, which were harvested under visual control and differentiated from others cells types by the presence of long neurites (Eclipse TE200OU, Nikon). The neurons were sucked in with a glass pipette by applying negative pressure. This pipette had a tip diameter of about 4-6 µm and contained 6 µl of RNase-free RT buffer (with RNase inhibitor, 20 U; oligo (dT)18, 2.3 µM; dNTPs, 150 µM; dTT 1.2 mM; MgCl₂ 3.6mM and 10X RT Buffer Superscript III First-Strand Syntesis System; Life Technologies , Texas, USA). The content of the pipette was expelled into a PCR-tube containing 12 µl of RNase-free RT buffer and 0.5 µl of NP40 1% to allow cell membrane disruption. The reaction was incubated at 65°C for 2 min. After adding 0.5 µl reverse transcriptase III, the sample was then placed at 50°C for 60 min. Reverse transcriptase inactivation was done by heating the sample to 70°C for 10 min and then placed on ice. Negative controls were performed without template; no false amplifications were obtained. As pre-amplification step, a PCR was performed using Platinum Taq DNA Polymerase with a first set of primers (Life Technologies, Texas, USA) and then, a nested PCR was carried on with internal primers (See Table 1). Primers 9-14G were used for *P2X₄* amplification from adult myenteric neurons. The PCR protocol were as follows: initial denaturation for 3 min at 94 °C,

then 30 amplification rounds with denaturation for 15 s at 94°C, alignment for 15 s at 50°C, and extension for 1 min 45 s at 72°C; the final extension was 5 min at 72°C.

Western blot

We obtained the total protein from duodenum, jejunum, and ileum of newborn and adult guinea pigs as previously reported by others (Barclay *et al.*, 2002). Briefly, we placed the tissue samples in 5 ml glass tubes with 2 ml of low salt lysis buffer (50 mM Tris-HCL; 10 mM NaCl and 1% Triton X-100), and triturated mechanically with a sterile pestle. Samples were sonicated during one minute in cycles of 5 seconds on and 5 seconds off. After a minute break, a second sonication protocol was applied. The homogenates were then centrifuged at 2500 g for 5 min to eliminate tissue debris.

Finally, 3 µg of protein from brain, and smooth muscle-myenteric plexus preparations in sample buffer with 80 mM DTT were separated on 12% SDS polyacrylamide gels. Gels ran at 120 V for 150 min at 4°C. Separated proteins were transferred to nitrocellulose membrane for 1 h at 400 mA and 4°C. Then nitrocellulose membranes were blocked with 8% non-fat dry milk in Tris buffered saline (20 mM Tris base, 136 mM NaCl, pH 7.6), 0.1% Tween 20 (TBS-T) and were then incubated over night with a polyclonal antibody solution (1:500 v/v dilution in TBS-T) against P2X₃ receptors (rabbit IgG, Catalogue # APR-016, lot AN-09, Alomone Labs; Jerusalem, Israel). Then washed and incubated for 2.5 hours with a horseradish peroxidase- (HRP) conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G antibody, at a 1:3000 v/v dilution (cat. no. 12-348, Millipore, CA, USA). Immunoreactivity was visualized by using 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

(TMB; Sigma, Missouri, USA). The specificity of this primary antibody have been tested before by others (Hodges *et al.*, 2011; Van Crombruggen *et al.*, 2007). Apparent molecular weights were assigned with the protein ladder (Benchmark Prestained Protein Ladder, Invitrogen Co., CA, USA). Total amount of protein extracted was quantified by the method of Bradford (Bradford, 1976).

Electrophysiology

In order to compare the effects of ATP and α,β -meATP on myenteric neurons from both newborn and adult guinea pigs we used the whole cell configuration of the patch clamp techniques. We used the Axopatch 1D or the Axopatch 200B amplifiers (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The patch pipette was manufactured as previously described (Barajas-Lopez *et al.*, 1996a) and had resistances between 1 and 4 M Ω . Whole cell currents were recorded using the AxoScope 9 software (Molecular Devices), while they were held at -60 mV. The composition of the internal pipette solution was (mM): CsCl, 150; EGTA, 10; HEPES, 5; NaCl, 10; ATPMg, 4.5 and GTPNa, 0.1, and was adjusted to pH 7.3–7.4 with CsOH. The external solution composition was (mM): NaCl, 160; CaCl₂, 2; glucose, 10; HEPES, 5 and CsCl, 3; the pH was adjusted to 7.3–7.4 with NaOH. Gigaseals obtained were always at least 1 G Ω . Drugs used in these experiments were applied using a fast perfusion system that allows recordings of fast desensitizing currents (Barajas-Lopez *et al.*, 1996a; Barajas-Lopez *et al.*, 2002).

Sequence analysis

The oligonucleotides used in this work were designed with the Primer Premier software (Biosoft) and tested for *in silico* PCR with FastPCR software (Primer Digital). The information obtained from the sequencing of the different P2X PCR

products were analyzed using the DNASTar software (Lasergene). We made sequence alignments using nBLAST, pBLAST (both searching mouse genomic and transcript database) and the Align software of the European Bioinformatics Institute in his local (water) and global (needle) modes. The software Mega 5 was also used with the Clustal V and Clustal W algorithms.

Statistical analysis

The data obtained from semi quantitative RT-PCR and electrophysiology was tested using one-way ANOVA with Bonferroni-Haselman *post-hoc* test for paired comparisons. The statistical difference in frequency of single cell gene expression was analyzed using Fisher's exact test, a non-parametric statistical test. Two-tailed P-values of 0.05 or less were considered statistically significant. Data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). The number of cells used is represented by "n".

RESULTS

The P2X₃ subunit is downregulated in the small intestine preparation during development

Using semi quantitative RT-PCR we compared the P2X₃ expression in small intestine as function of the normalized expression of GAPDH, at least three different cDNA from a different subjects were used for each stage of development. Three stages of development were selected: newborn (P0-P3), juvenile (P7-P15) and adult (\geq P35). We found that the highest P2X₃ transcript expression levels were found in the newborn specimens, this level diminished in the juvenile intestine until the lowest expression levels in the adult stage (Fig. 1A).

To assess if changes in the P2X₃ transcript correlate with changes in P2X₃ protein, we performed the *western blot* technique in total protein extracts from small intestine (Figure 1B). The amount of total protein extracts loaded into the gels was 3 µg, with this quantity we were able to detect a band between 82 and 115 KDa (90 KDa approximately) in the newborn sample that was barely detectable in the juvenile and adult samples. It is likely that this band represents a trimer that includes the P2X₃ subunit. While this observation is not quantitative, it correlates well with the downregulation seen at the mRNA level. Bands with lower molecular weights were detected below 84 and 49 KDa, which can represent P2X dimers and monomers, respectively. P2X₃ transcripts are expected to be on myenteric neurons and it is likely that, at least part of this downregulation is due to changes occurring in these cells. In order to test this hypothesis we determined the frequency of P2X₃ expression in single myenteric neurons.

The P2X₃ and P2X₅ subunits are differentially regulated in myenteric neurons during development

We examined the presence of the P2X₃ subunit in single myenteric neurons from newborn, juvenile and adult guinea pigs (Figure 2), using the single cell RT-PCR technique and the transcripts for P2X₂ (known to be expressed by most myenteric neurons; (Linan-Rico *et al.*, 2012)) and GAPDH as controls. We found that for the P2X₂ subunit was detected in the great majority neurons and its expression frequency was virtually the same for newborns (87%; 40 out of 46 neurons), juvenile (75%; 6 out of 8 neurons) and adults (89%; 16 out of 18 neurons). The P2X₃ subunit, however, is present in 59% of analyzed neurons (14 out of 24) from newborn animals, dropping to a frequency of expression to 38% (3

out of 8 neurons) and 10% (3 out of 29 neurons) in the juvenile and adult animals, respectively (Figure 2A-D). The frequency of P2X₃ expression in newborns was significantly different than in adults (Figure 3C). In most analyzed neurons, we tested the expression of GAPDH as control gene to confirm the correct cDNA synthesis. In few neurons of adult animals we used expression of P2X₂ as a control gene (Figure 2D).

We also investigated if the downregulation was specific for P2X₃ receptor by testing simultaneously for the transcripts of P2X₄ and P2X₅ in myenteric neurons from newborn and adult animals (Figure 3A and 3B). We found that the frequency of P2X₄ positive neurons in newborn animals (63%, n=24) was not different than that observed in adults (75%, n=76). However, as it is shown in Figure 3C, the frequency of P2X₅ positive neurons in newborns (29%, n=24) was significantly lower than in adults (62%, n=29).

Myenteric P2X receptors from newborn and adult animals have the same ATP sensitivity

Whole cell currents induced by ATP (10, 30, 100, and 300 μ M) were normalized (considering as 100% the response to 300 μ M ATP) and plotted to generate concentration-response curves of neurons from newborn and adult animals (Fig. 4). For both cases, data were well fitted with a logistic equation, which yield EC₅₀s of 56 μ M and 44 μ M, respectively.

α,β -meATP is a weak agonist in myenteric P2X channels of newborn animals

We examined the response of newborn guinea pig myenteric neurons to α,β -meATP at a concentration sufficient to activate P2X₃ channels (100 μ M). ATP (100

μM) induced an average current of -1007 ± 198 pA in 26 out of 27 neurons. In 6 out of these 26 neurons, α, β -meATP induced a current response but in only one neuron this current (175 pA) was similar in amplitude than the one observed with ATP (185 pA). In the other five neurons that responded to α, β -meATP the magnitude of the average response was $6 \pm 2.5\%$ of that induced by ATP (100 μM), typical responses to these two agonists are shown in Fig 5A-B.

DISCUSSION

This study presents evidence indicating that in the intestinal myenteric neurons P2X₃ receptors are downregulated in the newborn guinea pigs than in adults; whereas, the P2X₅ mRNA is upregulated during postnatal development. The great majority of neurons expressing P2X₃ also expressed P2X₂ transcripts. This is important because these last two subunits are known to form heteromeric channels (Jiang *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 1995). Our electrophysiological experiments indicates, however, that the higher frequency of P2X₃ subunit expression in newborns does not correlate with changes in the sensitivity of P2X myenteric channels to either ATP or α,β -meATP, a known P2X₃ receptor agonist. These findings imply that P2X₃ subunits are forming heteromeric channels, which are mainly α,β -meATP insensitive. Other subunits expressed in myenteric plexus might be more important as they are more frequently co-expressed. Thus, P2X₂ and P2X₄ transcripts are expressed by a larger number of the myenteric neurons at the different ages tested.

Our data are consistent with previous findings that have shown a higher expression of P2X₃ receptors in peripheral neurons at earlier stages of development. Thus, in the rat gastric myenteric neurons (Xiang *et al.*, 2004a), P2X₃-immunoreactivity appears postnatal at P1, and it becomes maximal at P14, when the number of neurons expressing the P2X₃ receptor peaked at 45%. This immunoreactivity decreased subsequently, and at P30 is only present in about 13% of gastric myenteric neurons. Similar differences exist regarding the expression of P2X₃ receptor in sensory ganglia (Xiang *et al.*, 2004a). However, in sensory neurons immunoreactivity for P2X₃ is detected much early during

development (E12-14); whereas, in the myenteric plexus of the rat stomach is seen only after birth (Xiang *et al.*, 2004a). Expression of P2X₃ receptors in gut enterochromaffin cells is downregulated during inflammatory conditions (Linan-Rico *et al.*, 2013) and by peripheral nerve injury in sensory ganglia (Bradbury *et al.*, 1998). In the small intestine of adult guinea pigs, P2X₃ transcript was found in 10% of myenteric neurons, a lower percentage than the calculated (36%) from neurochemical experiments in the guinea pig ileum (Van Nassauw *et al.*, 2002). However, in newborns we detect the transcript of this subunit in about 60% of myenteric neurons, therefore, even if the dissociation (which removes the neuronal processes) and culturing procedures decrease P2X₃ expression, the subunit downregulation remain significant and distinguishable in both stages of postnatal development. In agreement with our findings in single neurons, we also documented the downregulation of this receptor in acutely dissected small intestinal tissues. It is important to underline that the number of neurons expressing P2X₃ mRNA (10%) found here is similar to that reported in mouse (Bian *et al.*, 2003) and rats (Xiang *et al.*, 2004a).

At least five different P2X subunits appear to be expressed in the small intestine myenteric neurons of guinea pigs (present study; (Castelucci *et al.*, 2002; Linan-Rico *et al.*, 2012; Valdez-Morales *et al.*, 2011; Xiang *et al.*, 2005)). Thus, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅ and P2X₇ mRNAs are present in these neurons, which is in agreement with the presence of some of these transcripts in mouse myenteric neurons (Nieto-Pescador *et al.*, 2013a) and in enriched enteric neuronal cultures of rat (Ohta *et al.*, 2005). The four transcripts are translated into proteins in rodent myenteric neurons as it is indicated by the immunoreactivity for P2X₂ (Castelucci *et*

et al., 2002; Ren *et al.*, 2003; Ruan *et al.*, 2004), P2X₃ (Xiang *et al.*, 2005; Xiang *et al.*, 2004b) P2X₄ (Bo *et al.*, 2003a; Nieto-Pescador *et al.*, 2013a), P2X₅ (Nieto-Pescador *et al.*, 2013a; Ruan *et al.*, 2005; Xiang *et al.*, 2004b) and P2X₇ receptors (Gulbransen *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2001b; Valdez-Morales *et al.*, 2011). We showed that in myenteric neurons P2X₅ is lower and that P2X₃ receptor is higher during the early postnatal development than in adults. These findings contrast with previous findings in the rat prostate where ageing associates to higher levels of P2X₃ and lower P2X₅ receptors (Slater *et al.*, 2000), suggesting that changes in these receptors might be the result of local and tissue-specific modulatory signals.

Our results confirm previous findings where P2X₂ is the most prominent P2X subunit in the myenteric plexus of adult guinea pigs (Linan-Rico *et al.*, 2012; Valdez-Morales *et al.*, 2011; Xiang *et al.*, 2005), and extend the same predominance to myenteric neurons in early stages of postnatal development. In newborn animals, more than half of myenteric neurons expressed P2X₃ mRNA and most of these neurons also co-expressed the P2X₂ transcript. These two subunits have been shown to form heteromeric P2X_{2/3} channels (Jiang *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 1995), which exhibit pharmacological properties similar to those of P2X₃ homomeric channels, including sensitivity to α,β -meATP, but they can be distinguished from homomeric P2X₃ channels by a slow desensitization rate. Recent experimental evidence has been provided that the quaternary trimeric structure of the later heteromeric channels would have the stoichiometry of one P2X₂ subunit and two P2X₃ subunits (Hausmann *et al.*, 2012; Wilkinson *et al.*, 2006), described as: P2X_{2/3}[1:2]. Two P2X₃ subunits per channel are needed to acquire α,β -meATP sensibility. In the present study, we found that α,β -meATP: i)

did not activated most P2X native channels of newborn animals, ii) induced a marginal response (6%) in one fifth of the neurons, and iii) induced a similar current than ATP in only one neuron (1 out of 26). It is unlikely that the marginal response to α,β -meATP could be mediated by channels either homomeric P2X₃ or heteromeric P2X_{2/3}[1:2] because our laboratory has demonstrated that this agonist also marginally activates (~7% of maximal I_{ATP}) the two P2X₂ receptor variants (P2X₂₋₁ and P2X₂₋₂) cloned from guinea pig myenteric neurons (Linan-Rico *et al.*, 2012). Furthermore, neurons from adult guinea pigs also show a marginal response to α,β -meATP (Barajas-Lopez *et al.*, 1996a). Therefore, the small effect of α,β -meATP seen in one fifth of newborn myenteric neurons is not indicative of the presence of homomeric P2X₃ or heteromeric P2X_{2/3}[1:2] channels. We proposed that if P2X₃ subunits participate in forming heterologous channels they do it by providing only one subunit to form heterotrimers (P2X_n/3[2:1]). To date only the stoichiometry P2X_{2/3}[1:2] has been reported; however, mRNA expression levels of P2X₂ subunit can alter the stoichiometry of the formed channels when co-expressed with P2X₆ (Hausmann *et al.*, 2012; Wilkinson *et al.*, 2006). Therefore, other two subunits of these heterotrimers could be P2X₄, P2X₅, or any of the two P2X₂ splicing variants present in these neurons. P2X₇ receptor immunoreactivity or mRNA are found in most myenteric neurons (Gulbransen *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2001b; Valdez-Morales *et al.*, 2011); however, this subunit is considered to form only homomeric channels (Burnstock *et al.*, 2012), which are activated in the guinea pig at ATP concentrations higher than 300 μ M (Valdez-Morales *et al.*, 2011), which were not used here. Therefore, it is unlikely that this subunit participates in the ATP induced currents recorded here.

In summary, our data indicate that in the intestinal myenteric neurons P2X₃ receptors are expressed more frequently in the newborn guinea pigs than in adults; whereas, P2X₅ mRNA is found more frequently in adults. Expression of P2X₂ and P2X₄ transcripts do not change during postnatal development. In newborn animals, virtually all neurons expressing P2X₃ also expressed P2X₂ transcripts. This is important because these two subunits are known to form heteromeric channels. α,β -meATP, a known P2X₃ receptor agonist, induces only a marginal current despite the fact of the higher presence of P2X₃ subunits in newborns. These findings would imply that P2X₃ subunits are mainly forming heteromeric channels that are α,β -meATP insensitive perhaps because this subunit contributes with a maximal of one subunit to the heterotrimers and others (e.g. P2X₂, P2X₅, or P2X₄) complete these channels with the two additional subunits. How the different expression of these receptors affect the physiology of P2X receptors, enteric neurons and the small intestine needs to be addressed in future experiments.

Acknowledgements

This work was supported by CONACYT, México (Project no. 48297). Scholarships of L-VR (33667), VEC (250280), J-VNN (239777), and EHJ (204156), supported by CONACYT.

REFERENCES

Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, *et al.* (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological reviews* **58**(3): 281-341.

Abdollah S, Catlin MC, Brien JF (1993). Ethanol neuro-behavioural teratogenesis in the guinea pig: behavioural dysfunction and hippocampal morphologic change. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **71**(10-11): 776-782.

Antonio LS, Stewart AP, Xu XJ, Varanda WA, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM (2011). P2X4 receptors interact with both P2X2 and P2X7 receptors in the form of homotrimers. *British journal of pharmacology* **163**(5): 1069-1077.

Asatryan L, Nam HW, Lee MR, Thakkar MM, Saeed Dar M, Davies DL, *et al.* (2011). Implication of the purinergic system in alcohol use disorders. *Alcoholism, clinical and experimental research* **35**(4): 584-594.

Asatryan L, Popova M, Perkins D, Trudell JR, Alkana RL, Davies DL (2010). Ivermectin antagonizes ethanol inhibition in purinergic P2X4 receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **334**(3): 720-728.

Asatryan L, Popova M, Woodward JJ, King BF, Alkana RL, Davies DL (2008). Roles of ectodomain and transmembrane regions in ethanol and agonist action in purinergic P2X2 and P2X3 receptors. *Neuropharmacology* **55**(5): 835-843.

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. *European journal of pharmacology* **250**(1): 141-145.

Barajas-Lopez C, Huizinga JD, Collins SM, Gerzanich V, Espinosa-Luna R, Peres AL (1996a). P2x-purinoceptors of myenteric neurones from the guinea-pig ileum and their unusual pharmacological properties. *British journal of pharmacology* **119**(8): 1541-1548.

Barajas-Lopez C, Montano LM, Espinosa-Luna R (2002). Inhibitory interactions between 5-HT3 and P2X channels in submucosal neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**(6): G1238-1248.

Barajas-Lopez C, Peres AL, Espinosa-Luna R (1996b). Cellular mechanisms underlying adenosine actions on cholinergic transmission in enteric neurons. *The American journal of physiology* **271**(1 Pt 1): C264-275.

Barclay J, Patel S, Dorn G, Wotherspoon G, Moffatt S, Eunson L, *et al.* (2002). Functional downregulation of P2X3 receptor subunit in rat sensory neurons reveals a significant role in chronic neuropathic and inflammatory pain. *J Neurosci* **22**(18): 8139-8147.

Bennett MR, Gibson WG (1995). On the contribution of quantal secretion from close-contact and loose-contact varicosities to the synaptic potentials in the vas deferens. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **347**(1320): 187-204.

Bhatt S, Diaz R, Trainor PA (2013). Signals and switches in Mammalian neural crest cell differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**(2).

Bian X, Ren J, DeVries M, Schnegelsberg B, Cockayne DA, Ford AP, *et al.* (2003). Peristalsis is impaired in the small intestine of mice lacking the P2X3 subunit. *J Physiol* **551**(Pt 1): 309-322.

Bo X, Kim M, Nori S, Schoepfer R, Burnstock G, North R (2003a). Tissue distribution of P2X4 receptors studied with an ectodomain antibody. *Cell and tissue research* **313**(2): 159-224.

Bo X, Kim M, Nori SL, Schoepfer R, Burnstock G, North RA (2003b). Tissue distribution of P2X4 receptors studied with an ectodomain antibody. *Cell and tissue research* **313**(2): 159-165.

Bo X, Zhang Y, Nassar M, Burnstock G, Schoepfer R (1995). A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. *FEBS letters* **375**(1-2): 129-133.

Bornstein JC, Furness JB, Kunze WA (1994). Electrophysiological characterization of myenteric neurons: how do classification schemes relate? *Journal of the autonomic nervous system* **48**(1): 1-15.

Bortolato M, Yardley MM, Khoja S, Godar SC, Asatryan L, Finn DA, *et al.* (2013). Pharmacological insights into the role of P2X4 receptors in behavioural regulation: lessons from ivermectin. *Int J Neuropsychopharmacol* **16**(5): 1059-1070.

Boue-Grabot E, Archambault V, Seguela P (2000). A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels. *The Journal of biological chemistry* **275**(14): 10190-10195.

Boue-Grabot E, Barajas-Lopez C, Chakfe Y, Blais D, Belanger D, Emerit MB, *et al.* (2003). Intracellular cross talk and physical interaction between two classes of neurotransmitter-gated channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**(4): 1246-1253.

Bradbury EJ, Burnstock G, McMahon SB (1998). The expression of P2X3 purinoreceptors in sensory neurons: effects of axotomy and glial-derived neurotrophic factor. *Mol Cell Neurosci* **12**(4-5): 256-268.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D (1994). New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* **371**(6497): 519-523.

Braun M, Wendt A, Karanauskaite J, Galvanovskis J, Clark A, MacDonald PE, *et al.* (2007). Corelease and differential exit via the fusion pore of GABA, serotonin, and ATP

from LDCV in rat pancreatic beta cells. *The Journal of general physiology* **129**(3): 221-231.

Brookes SJ (2001). Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *The Anatomical record* **262**(1): 58-70.

Brosenitsch TA, Adachi T, Lipski J, Housley GD, Funk GD (2005). Developmental downregulation of P2X3 receptors in motoneurons of the compact formation of the nucleus ambiguus. *Eur J Neurosci* **22**(4): 809-824.

Brown SG, Townsend-Nicholson A, Jacobson KA, Burnstock G, King BF (2002). Heteromultimeric P2X(1/2) receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **300**(2): 673-680.

Buell G, Lewis C, Collo G, North RA, Surprenant A (1996). An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *The EMBO journal* **15**(1): 55-62.

Burnstock G (2007). Purine and pyrimidine receptors. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **64**(12): 1471-1483.

Burnstock G (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* **24**(3): 509-581.

Burnstock G, Ulrich H (2011). Purinergic signaling in embryonic and stem cell development. *Cell Mol Life Sci* **68**(8): 1369-1394.

Burnstock G, Verkhratsky A (2012). *Purinergic Signalling and the Nervous System*. edn. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Castelucci P, Robbins HL, Poole DP, Furness JB (2002). The distribution of purine P2X(2) receptors in the guinea-pig enteric nervous system. *Histochem Cell Biol* **117**(5): 415-422.

Catlin MC, Abdollah S, Brien JF (1993). Dose-dependent effects of prenatal ethanol exposure in the guinea pig. *Alcohol* **10**(2): 109-115.

Chaumont S, Jiang LH, Penna A, North RA, Rassendren F (2004). Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors. *The Journal of biological chemistry* **279**(28): 29628-29638.

Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN (1995). A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* **377**(6548): 428-431.

Clyne JD, LaPointe LD, Hume RI (2002). The role of histidine residues in modulation of the rat P2X(2) purinoceptor by zinc and pH. *The Journal of physiology* **539**(Pt 2): 347-359.

Coddou C, Yan Z, Obsil T, Huidobro-Toro JP, Stojilkovic SS (2011). Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacological reviews* **63**(3): 641-683.

Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* **56**(1): 2-5.

Compan V, Ulmann L, Stelmashenko O, Chemin J, Chaumont S, Rassendren F (2012). P2X2 and P2X5 subunits define a new heteromeric receptor with P2X7-like properties. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32**(12): 4284-4296.

Costa M, Brookes SJ, Steele PA, Gibbins I, Burcher E, Kandiah CJ (1996). Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* **75**(3): 949-967.

Davies DL, Asatryan L, Kuo ST, Woodward JJ, King BF, Alkana RL, *et al.* (2006). Effects of ethanol on adenosine 5'-triphosphate-gated purinergic and 5-hydroxytryptamine receptors. *Alcoholism, clinical and experimental research* **30**(2): 349-358.

Davies DL, Kochegarov AA, Kuo ST, Kulkarni AA, Woodward JJ, King BF, *et al.* (2005). Ethanol differentially affects ATP-gated P2X(3) and P2X(4) receptor subtypes expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuropharmacology* **49**(2): 243-253.

Davies DL, Machu TK, Guo Y, Alkana RL (2002). Ethanol sensitivity in ATP-gated P2X receptors is subunit dependent. *Alcoholism, clinical and experimental research* **26**(6): 773-778.

Denlinger LC, Fisette PL, Sommer JA, Watters JJ, Prabhu U, Dubyak GR, *et al.* (2001). Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* **167**(4): 1871-1876.

Dubyak GR (2007). Go it alone no more--P2X7 joins the society of heteromeric ATP-gated receptor channels. *Molecular pharmacology* **72**(6): 1402-1405.

Dunn PM, Gever J, Ruan HZ, Burnstock G (2005). Developmental changes in heteromeric P2X(2/3) receptor expression in rat sympathetic ganglion neurons. *Dev Dyn* **234**(3): 505-511.

Edwards FA, Gibb AJ, Colquhoun D (1992). ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* **359**(6391): 144-147.

Eickhorst AN, Berson A, Cockayne D, Lester HA, Khakh BS (2002). Control of P2X(2) channel permeability by the cytosolic domain. *The Journal of general physiology* **120**(2): 119-131.

Ennion S, Hagan S, Evans RJ (2000). The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X1 receptors. *The Journal of biological chemistry* **275**(45): 35656.

Ennion SJ, Evans RJ (2002). Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X(1) receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface. *Molecular pharmacology* **61**(2): 303-311.

Evans RJ, Derkach V, Surprenant A (1992). ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature* **357**(6378): 503-505.

Foong JP, Nguyen TV, Furness JB, Bornstein JC, Young HM (2012). Myenteric neurons of the mouse small intestine undergo significant electrophysiological and morphological changes during postnatal development. *J Physiol*.

Fountain SJ, Burnstock G (2009). An evolutionary history of P2X receptors. *Purinergic signalling* **5**(3): 269-272.

Fountain SJ, North RA (2006). A C-terminal lysine that controls human P2X4 receptor desensitization. *The Journal of biological chemistry* **281**(22): 15044-15049.

Furness JB (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the autonomic nervous system* **81**(1-3): 87-96.

Furness JB, Costa M (1980). Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience* **5**(1): 1-20.

Furness JB, Kunze WA, Bertrand PP, Clerc N, Bornstein JC (1998). Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Progress in neurobiology* **54**(1): 1-18.

Furness JB, Sanger GJ (2002). Intrinsic nerve circuits of the gastrointestinal tract: identification of drug targets. *Current opinion in pharmacology* **2**(6): 612-622.

Gabella G (1972). Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *Journal of anatomy* **111**(Pt 1): 69-97.

Galligan JJ (2002a). Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* **14**(6): 611-623.

Galligan JJ (2002b). Pharmacology of synaptic transmission in the enteric nervous system. *Current opinion in pharmacology* **2**(6): 623-629.

Galligan JJ, Bertrand PP (1994). ATP mediates fast synaptic potentials in enteric neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **14**(12): 7563-7571.

Garcia-Guzman M, Soto F, Laube B, Stuhmer W (1996). Molecular cloning and functional expression of a novel rat heart P2X purinoceptor. *FEBS letters* **388**(2-3): 123-127.

Goyal RK, Chaudhury A (2013). Structure activity relationship of synaptic and junctional neurotransmission. *Autonomic neuroscience : basic & clinical* **176**(1-2): 11-31.

Gray EG (1963). Electron microscopy of presynaptic organelles of the spinal cord. *Journal of anatomy* **97**: 101-106.

Guerrero-Alba R, Valdez-Morales E, Juarez EH, Miranda-Morales M, Ramirez-Martinez JF, Espinosa-Luna R, *et al.* (2010). Two suramin binding sites are present in guinea pig but only one in murine native P2X myenteric receptors. *European journal of pharmacology* **626**(2-3): 179-185.

Gulbransen BD, Bashashati M, Hirota SA, Gui X, Roberts JA, MacDonald JA, *et al.* (2012). Activation of neuronal P2X7 receptor-pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis. *Nat Med* **18**(4): 600-604.

Guo LH, Trautmann K, Schluesener HJ (2005). Expression of P2X4 receptor by lesional activated microglia during formalin-induced inflammatory pain. *Journal of neuroimmunology* **163**(1-2): 120-127.

Guo W, Zhang Z, Liu X, Burnstock G, Xiang Z, He C (2013). Developmental expression of P2X5 receptors in the mouse prenatal central and peripheral nervous systems. *Purinergic Signal* **9**(2): 239-248.

Hattori M, Gouaux E (2012). Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* **485**(7397): 207-212.

Hausmann R, Bodnar M, Woltersdorf R, Wang H, Fuchs M, Messemer N, *et al.* (2012). ATP binding site mutagenesis reveals different subunit stoichiometry of functional P2X2/3 and P2X2/6 receptors. *J Biol Chem* **287**(17): 13930-13943.

Heine C, Heimrich B, Vogt J, Wegner A, Illes P, Franke H (2006). P2 receptor-stimulation influences axonal outgrowth in the developing hippocampus in vitro. *Neuroscience* **138**(1): 303-311.

Hirst GD, Holman ME, Spence I (1974). Two types of neurones in the myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig. *The Journal of physiology* **236**(2): 303-326.

Hodges RR, Vrouvlianis J, Scott R, Dartt DA (2011). Identification of P2X(3) and P2X(7) purinergic receptors activated by ATP in rat lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**(6): 3254-3263.

Hu HZ, Gao N, Lin Z, Gao C, Liu S, Ren J, *et al.* (2001a). P2X(7) receptors in the enteric nervous system of guinea-pig small intestine. *The Journal of comparative neurology* **440**(3): 299-310.

Hu HZ, Gao N, Lin Z, Gao C, Liu S, Ren J, *et al.* (2001b). P2X(7) receptors in the enteric nervous system of guinea-pig small intestine. *J. Comp. Neurol.* **440**(3): 299-310.

- Huang LC, Greenwood D, Thorne PR, Housley GD (2005). Developmental regulation of neuron-specific P2X3 receptor expression in the rat cochlea. *J Comp Neurol* **484**(2): 133-143.
- Inoue K, Tsuda M, Koizumi S (2004). ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: chronic pain and microglia: involvement of the ATP receptor P2X4. *Journal of pharmacological sciences* **94**(2): 112-114.
- Jelinkova I, Vavra V, Jindrichova M, Obsil T, Zemkova HW, Zemkova H, *et al.* (2008). Identification of P2X(4) receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **456**(5): 939-950.
- Jelinkova I, Yan Z, Liang Z, Moonat S, Teisinger J, Stojilkovic SS, *et al.* (2006). Identification of P2X4 receptor-specific residues contributing to the ivermectin effects on channel deactivation. *Biochemical and biophysical research communications* **349**(2): 619-625.
- Jiang LH, Kim M, Spelta V, Bo X, Surprenant A, North RA (2003). Subunit arrangement in P2X receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**(26): 8903-8910.
- Jiang LH, Rassendren F, Surprenant A, North RA (2000). Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *The Journal of biological chemistry* **275**(44): 34190-34196.
- Jiang R, Taly A, Grutter T (2013). Moving through the gate in ATP-activated P2X receptors. *Trends in biochemical sciences* **38**(1): 20-29.
- Jo YH, Role LW (2002). Coordinate release of ATP and GABA at in vitro synapses of lateral hypothalamic neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**(12): 4794-4804.
- Jo YH, Schlichter R (1999). Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nature neuroscience* **2**(3): 241-245.
- Katz B (2003). Neural transmitter release: from quantal secretion to exocytosis and beyond. *Journal of neurocytology* **32**(5-8): 437-446.
- Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E (2009). Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* **460**(7255): 592-598.
- Keramidas A, Moorhouse AJ, Schofield PR, Barry PH (2004). Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Progress in biophysics and molecular biology* **86**(2): 161-204.

Khakh BS (2001). Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nature reviews. Neuroscience* **2**(3): 165-174.

Khakh BS, North RA (2006). P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* **442**(7102): 527-532.

Khakh BS, Proctor WR, Dunwiddie TV, Labarca C, Lester HA (1999). Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**(17): 7289-7299.

Kim M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, Surprenant A (2001). Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *The EMBO journal* **20**(22): 6347-6358.

Kimura KA, Brien JF (1998). Hippocampal nitric oxide synthase in the fetal guinea pig: effects of chronic prenatal ethanol exposure. *Brain research. Developmental brain research* **106**(1-2): 39-46.

King BF, Townsend-Nicholson A, Wildman SS, Thomas T, Spyer KM, Burnstock G (2000). Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in *Xenopus* oocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**(13): 4871-4877.

Koshimizu TA, Tsujimoto G (2006). Functional role of spliced cytoplasmic tails in P2X2-receptor-mediated cellular signaling. *Journal of pharmacological sciences* **101**(4): 261-266.

Kunze WA, Furness JB (1999). The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annual review of physiology* **61**: 117-142.

Kyte J, Doolittle RF (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology* **157**(1): 105-132.

Le KT, Babinski K, Seguela P (1998). Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**(18): 7152-7159.

Le Novere N, Changeux JP (1999). The Ligand Gated Ion Channel Database. *Nucleic acids research* **27**(1): 340-342.

Le Novere N, Changeux JP (1995). Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *Journal of molecular evolution* **40**(2): 155-172.

Lewis C, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G, Surprenant A (1995). Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* **377**(6548): 432-435.

Li C, Xiong K, Weight FF (2000). Ethanol inhibition of adenosine 5'-triphosphate-activated current in freshly isolated adult rat hippocampal CA1 neurons. *Neuroscience letters* **295**(3): 77-80.

Linan-Rico A, Jaramillo-Polanco J, Espinosa-Luna R, Jimenez-Bremont JF, Linan-Rico L, Montano LM, *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**(3): 394-404.

Linan-Rico A, Wunderlich JE, Grants IS, Frankel WL, Xue J, Williams KC, *et al.* (2013). Purinergic autocrine regulation of mechanosensitivity and serotonin release in a human EC model: ATP-gated P2X3 channels in EC are downregulated in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* **19**(11): 2366-2379.

Marquez-Klaka B, Rettinger J, Bhargava Y, Eisele T, Nicke A (2007). Identification of an intersubunit cross-link between substituted cysteine residues located in the putative ATP binding site of the P2X1 receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**(6): 1456-1466.

Methot N, Ritchie BD, Blanton MP, Baenziger JE (2001). Structure of the pore-forming transmembrane domain of a ligand-gated ion channel. *The Journal of biological chemistry* **276**(26): 23726-23732.

Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* **423**(6943): 949-955.

Nicke A, Baumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, *et al.* (1998). P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *The EMBO journal* **17**(11): 3016-3028.

Nicke A, Kerschensteiner D, Soto F (2005). Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X1 and P2X4 subunits. *Journal of neurochemistry* **92**(4): 925-933.

Nieto-Pescador MG, Guerrero-Alba R, Valdez-Morales E, Espinosa-Luna R, Jiménez-Vargas N, Liñan-Rico A, *et al.* (2013a). P2X4 subunits are part of P2X native channels in murine myenteric neurons. *Eur J Pharmacol* **709**(1-3): 93-102.

Nieto-Pescador MG, Guerrero-Alba R, Valdez-Morales E, Espinosa-Luna R, Jimenez-Vargas N, Linan-Rico A, *et al.* (2013b). P2X4 subunits are part of P2X native channels in murine myenteric neurons. *European journal of pharmacology* **709**(1-3): 93-102.

Norenberg W, Sobottka H, Hempel C, Plotz T, Fischer W, Schmalzing G, *et al.* (2012). Positive allosteric modulation by ivermectin of human but not murine P2X7 receptors. *British journal of pharmacology* **167**(1): 48-66.

North RA (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews* **82**(4): 1013-1067.

Oglesby IB, Lachnit WG, Burnstock G, Ford APDW (1999). Subunit specificity of polyclonal antisera to the carboxy terminal regions of P2X receptors, P2X1 through P2X7. *Drug Development Research* **47**(4): 189-195.

Ohta T, Kubota A, Murakami M, Otsuguro K, Ito S (2005). P2X2 receptors are essential for $[Ca^{2+}]_i$ increases in response to ATP in cultured rat myenteric neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**(5): G935-948.

Olsen RW, Sieghart W (2009). GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* **56**(1): 141-148.

Pankratov Y, Lalo U, Verkhratsky A, North RA (2007). Quantal release of ATP in mouse cortex. *The Journal of general physiology* **129**(3): 257-265.

Popova M, Asatryan L, Ostrovskaya O, Wyatt LR, Li K, Alkana RL, *et al.* (2010). A point mutation in the ectodomain-transmembrane 2 interface eliminates the inhibitory effects of ethanol in P2X4 receptors. *Journal of neurochemistry* **112**(1): 307-317.

Popova M, Trudell J, Li K, Alkana R, Davies D, Asatryan L (2013). Tryptophan 46 is a site for ethanol and ivermectin action in P2X4 receptors. *Purinergic signalling*.

Priel A, Silberberg SD (2004). Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels. *The Journal of general physiology* **123**(3): 281-293.

Radford KM, Virginio C, Surprenant A, North RA, Kawashima E (1997). Baculovirus expression provides direct evidence for heteromeric assembly of P2X2 and P2X3 receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **17**(17): 6529-6533.

Ren J, Bian X, DeVries M, Schnegelsberg B, Cockayne DA, Ford AP, *et al.* (2003). P2X2 subunits contribute to fast synaptic excitation in myenteric neurons of the mouse small intestine. *J Physiol* **552**(Pt 3): 809-821.

Revah F, Bertrand D, Galzi JL, Devillers-Thiery A, Mulle C, Hussy N, *et al.* (1991). Mutations in the channel domain alter desensitization of a neuronal nicotinic receptor. *Nature* **353**(6347): 846-849.

Roberts JA, Vial C, Digby HR, Agboh KC, Wen H, Atterbury-Thomas A, *et al.* (2006). Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **452**(5): 486-500.

Robertson SJ, Edwards FA (1998). ATP and glutamate are released from separate neurones in the rat medial habenula nucleus: frequency dependence and adenosine-mediated inhibition of release. *The Journal of physiology* **508** (Pt 3): 691-701.

Rokic MB, Stojilkovic SS, Vavra V, Kuzyk P, Tvrdonova V, Zemkova H (2013). Multiple roles of the extracellular vestibule amino acid residues in the function of the rat P2X4 receptor. *PLoS one* **8**(3): e59411.

Royle SJ, Bobanovic LK, Murrell-Lagnado RD (2002). Identification of a non-canonical tyrosine-based endocytic motif in an ionotropic receptor. *The Journal of biological chemistry* **277**(38): 35378-35385.

Ruan HZ, Burnstock G (2005). The distribution of P2X5 purinergic receptors in the enteric nervous system of mouse. *Cell and tissue research* **319**(2): 191-200.

Ruan HZ, Moules E, Burnstock G (2004). Changes in P2X3 purinoceptors in sensory ganglia of the mouse during embryonic and postnatal development. *Histochem Cell Biol* **122**(6): 539-551.

Rubio ME, Soto F (2001). Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**(2): 641-653.

Schwab JM, Guo L, Schluesener HJ (2005). Spinal cord injury induces early and persistent lesional P2X4 receptor expression. *Journal of neuroimmunology* **163**(1-2): 185-189.

Seguela P, Hageghi A, Soghomonian JJ, Cooper E (1996). A novel neuronal P2x ATP receptor ion channel with widespread distribution in the brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **16**(2): 448-455.

Silinsky EM, Gerzanich V, Vanner SM (1992). ATP mediates excitatory synaptic transmission in mammalian neurones. *British journal of pharmacology* **106**(4): 762-763.

Sim JA, Broomhead HE, North RA (2008). Ectodomain lysines and suramin block of P2X1 receptors. *The Journal of biological chemistry* **283**(44): 29841-29846.

Slater M, Barden JA, Murphy CR (2000). The purinergic calcium channels P2X1,2,5,7 are down-regulated while P2X3,4,6 are up-regulated during apoptosis in the ageing rat prostate. *Histochem J* **32**(9): 571-580.

Sneddon P (2000). Electrophysiology of autonomic neuromuscular transmission involving ATP. *Journal of the autonomic nervous system* **81**(1-3): 218-224.

Soto F, Garcia-Guzman M, Karschin C, Stuhmer W (1996). Cloning and tissue distribution of a novel P2X receptor from rat brain. *Biochemical and biophysical research communications* **223**(2): 456-460.

Stelmashenko O, Lalo U, Yang Y, Bragg L, North RA, Compan V (2012). Activation of trimeric P2X2 receptors by fewer than three ATP molecules. *Molecular pharmacology* **82**(4): 760-766.

Surprenant A, Buell G, North RA (1995). P2X receptors bring new structure to ligand-gated ion channels. *Trends Neurosci* **18**(5): 224-229.

Surprenant A, North RA (2009). Signaling at purinergic P2X receptors. *Annual review of physiology* **71**: 333-359.

Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1999). Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *The Journal of biological chemistry* **274**(10): 6653-6659.

Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1998a). N-Linked glycosylation is essential for the functional expression of the recombinant P2X2 receptor. *Biochemistry* **37**(42): 14845-14851.

Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1998b). Topological analysis of the ATP-gated ionotropic [correction of ionotrophic] P2X2 receptor subunit. *FEBS letters* **425**(1): 19-23.

Townsend-Nicholson A, King BF, Wildman SS, Burnstock G (1999). Molecular cloning, functional characterization and possible cooperativity between the murine P2X4 and P2X4a receptors. *Brain research. Molecular brain research* **64**(2): 246-254.

Tsuda M, Kuboyama K, Inoue T, Nagata K, Tozaki-Saitoh H, Inoue K (2009). Behavioral phenotypes of mice lacking purinergic P2X4 receptors in acute and chronic pain assays. *Molecular pain* **5**: 28.

Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, *et al.* (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* **424**(6950): 778-783.

Ulmann L, Hatcher JP, Hughes JP, Chaumont S, Green PJ, Conquet F, *et al.* (2008). Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**(44): 11263-11268.

Unwin N (1993). Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *Journal of molecular biology* **229**(4): 1101-1124.

Valdez-Morales E, Guerrero-Alba R, Linan-Rico A, Espinosa-Luna R, Zarazua-Guzman S, Miranda-Morales M, *et al.* (2011). P2X7 receptors contribute to the currents induced by ATP in guinea pig intestinal myenteric neurons. *European journal of pharmacology* **668**(3): 366-372.

Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, *et al.* (1994). A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* **371**(6497): 516-519.

Van Crombruggen K, Van Nassauw L, Timmermans JP, Lefebvre RA (2007). Inhibitory purinergic P2 receptor characterisation in rat distal colon. *Neuropharmacology* **53**(2): 257-271.

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

Wildman SS, King BF, Burnstock G (1999). Modulation of ATP-responses at recombinant rP2X4 receptors by extracellular pH and zinc. *British journal of pharmacology* **126**(3): 762-768.

Wilkinson WJ, Jiang LH, Surprenant A, North RA (2006). Role of ectodomain lysines in the subunits of the heteromeric P2X2/3 receptor. *Molecular pharmacology* **70**(4): 1159-1163.

Xiang Z, Burnstock G (2004a). Development of nerves expressing P2X3 receptors in the myenteric plexus of rat stomach. *Histochem Cell Biol* **122**(2): 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. *Histochemistry and cell biology* **124**(5): 379-390.

Xiang Z, Burnstock G (2004b). P2X2 and P2X3 purinoceptors in the rat enteric nervous system. *Histochem Cell Biol* **121**(3): 169-179.

Xiong K, Hu XQ, Stewart RR, Weight FF, Li C (2005). The mechanism by which ethanol inhibits rat P2X4 receptors is altered by mutation of histidine 241. *British journal of pharmacology* **145**(5): 576-586.

Xiong KM, Li CY, Weight FF (2000). Inhibition by ethanol of rat P2X(4) receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *British journal of pharmacology* **130**(6): 1394-1398.

Yamamoto K, Korenaga R, Kamiya A, Ando J (2000). Fluid shear stress activates Ca(2+) influx into human endothelial cells via P2X4 purinoceptors. *Circulation research* **87**(5): 385-391.

Yardley MM, Wyatt L, Khoja S, Asatryan L, Ramaker MJ, Finn DA, *et al.* (2012). Ivermectin reduces alcohol intake and preference in mice. *Neuropharmacology* **63**(2): 190-201.

Yi CL, Liu YW, Xiong KM, Stewart RR, Peoples RW, Tian X, *et al.* (2009). Conserved extracellular cysteines differentially regulate the inhibitory effect of ethanol in rat P2X4 receptors. *Biochemical and biophysical research communications* **381**(1): 102-106.

Zeng JW, Cheng SY, Liu XH, Zhao YD, Xiao Z, Burnstock G, *et al.* (2013). Expression of P2X5 receptors in the rat, cat, mouse and guinea pig dorsal root ganglion. *Histochem Cell Biol* **139**(4): 549-557.

Zhou X, Galligan JJ (1996). P2X purinoceptors in cultured myenteric neurons of guinea-pig small intestine. *The Journal of physiology* **496** (Pt 3): 719-729.

Zimmermann H (2008). ATP and acetylcholine, equal brethren. *Neurochemistry international* **52**(4-5): 634-648.

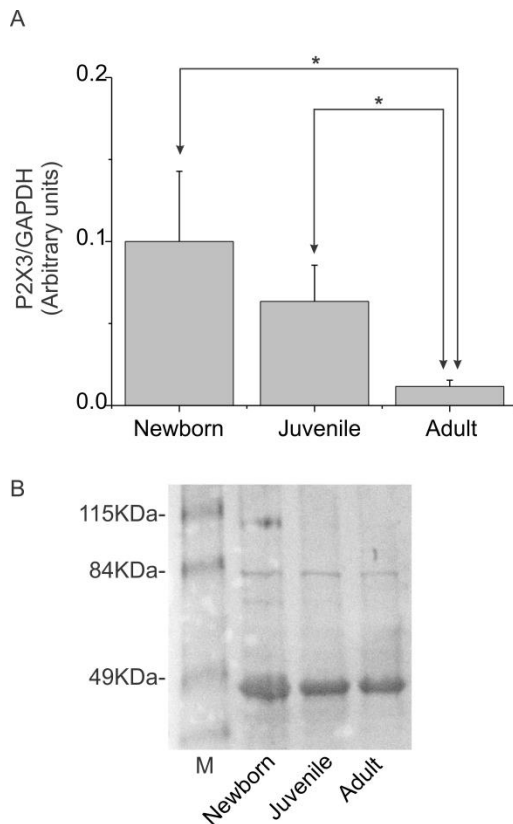


Figure 1. Expression of the P2X₃ subunit is decreased with age in the small intestine of guinea pig. A)

Semiquantitative RT-PCR was performed in total RNA extracts from small intestines of guinea pigs. The expression of P2X₃ transcript is shown as a fraction of GAPDH expression. The relative expression of P2X₃ is shown for newborn (P0-P3), juvenile (P7-P15) and adult (>P35) guinea pig small intestines. The asterisk shows statistical difference

between newborns and adults (*, $P < 0.05$). **B)** *Western blot* of whole protein extracts from small intestine of newborn, juvenile and adult guinea pigs. M denotes the pre-stained molecular weight marker (Invitrogen). All lanes were loaded with 3 micrograms of protein. Primary antibody dilution was 1:1000 and it was revealed with 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine substrate.

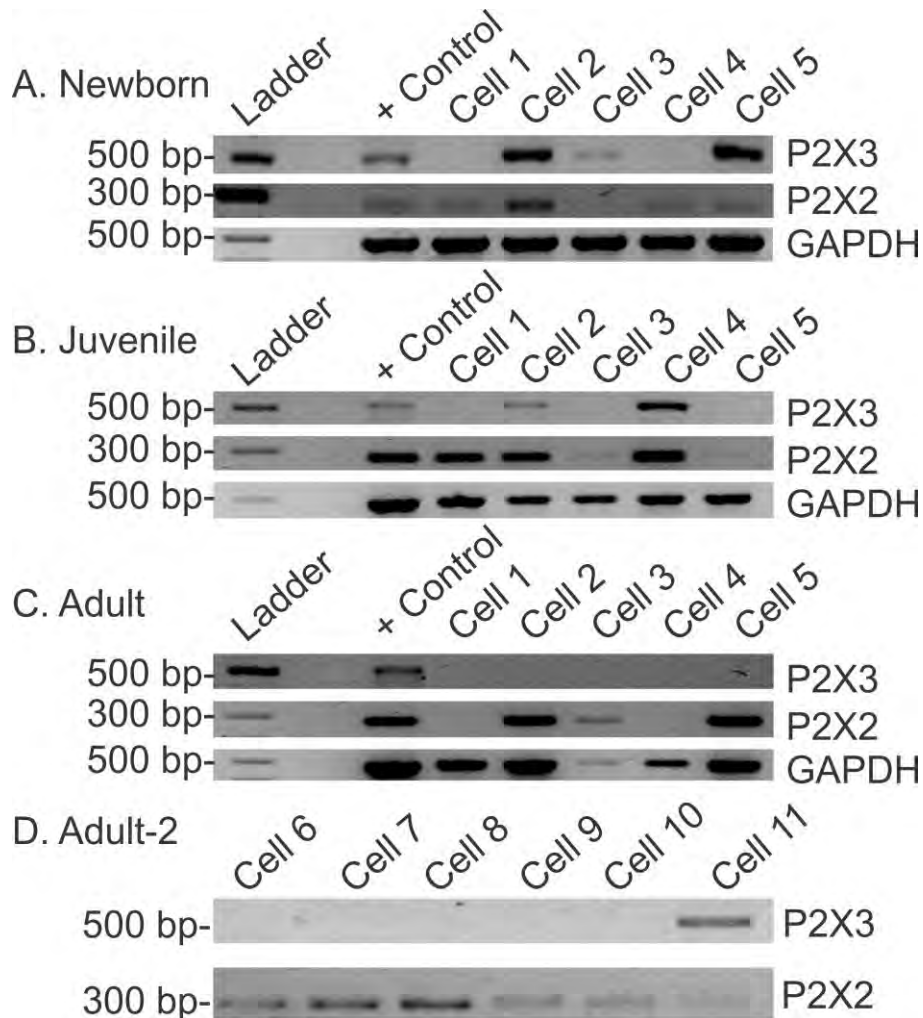


Figure 2. P2X₃ transcript is downregulated in myenteric neurons during postnatal development. RT-PCR was performed in single cultured neurons from newborn (A), juvenile (B), or adult (C-D) guinea pigs to determine P2X₃, P2X₂, and GAPDH transcripts. Each column corresponds to a cDNA sample synthesized from a single myenteric neuron. Whole brain cDNA was used as positive control. Ladder denotes the base pair size (1Kb plus, Invitrogen).

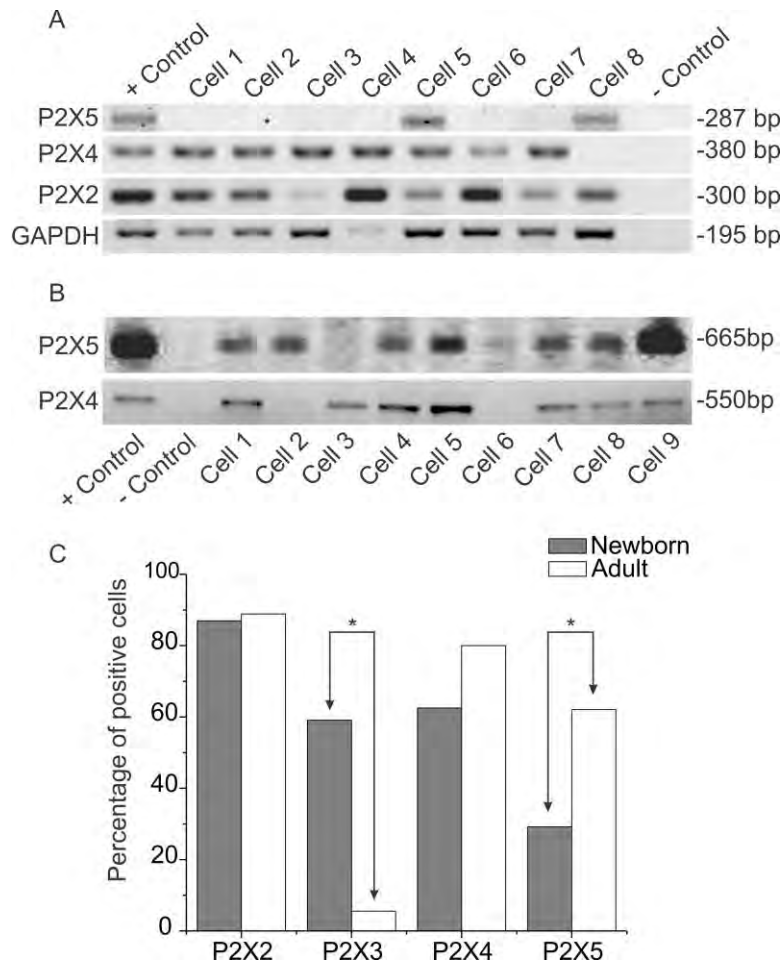


Figure 3. P2X₃ and P2X₅ transcripts are differentially expressed in myenteric neurons during postnatal development. A) RT-PCR was performed in eight neurons from a newborn guinea pigs and the expression of P2X₂, P2X₃, P2X₄ and P2X₅ transcripts was determined. GAPDH is used as control.

RT-PCR was performed in cultured neurons from at least three different guinea pigs. Intestine cDNA was used as positive control. B) RT-PCR was performed in 9 single neurons from adult guinea pigs and the expression of P2X₄ and P2X₅ were determined. Coexpression of these two transcripts can be seen in 6 out of the 9 neurons. C) Frequency histogram for P2X subunits expressed in single neurons. Made with data collected from experiments described in A, but in neurons from both newborn (P2X₂: 46 cells; P2X₃: 22 cells; P2X₄: 24 cells; P2X₅: 24 cells) and adult guinea pigs (P2X₂: 18 cells; P2X₃: 18 cells; P2X₄: 40 cells; P2X₅: 29 cells). The quantity of neurons expressing P2X₃ and P2X₅ transcripts were found to be significantly different at these two developmental stages, using the Fisher's exact test.

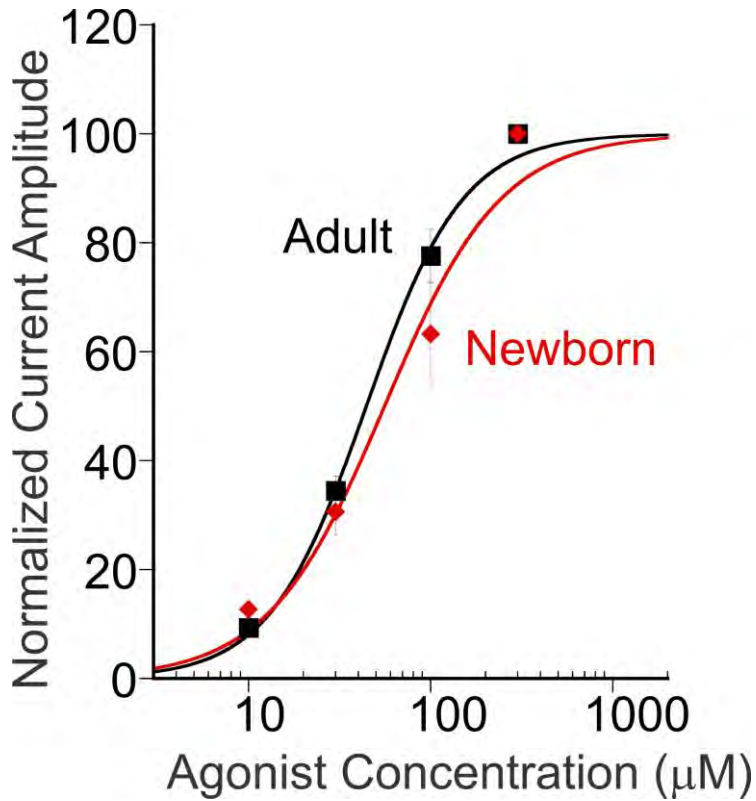


Figure 4. ATP shows, virtually, the same potency to activated P2X myenteric receptors from neurons of newborn or adult animals. For these concentration-response curves data were normalized with respect to the response observed with 300 μM ATP and fitted with a two parameters logistic equation. Each symbol represents the average of 4-10. The calculated EC_{50} for newborn guinea pigs was 56 μM , while for adults was 44 μM . Currents induced at any given ATP concentration, for neurons from animals at both developmental stages, were not significantly different.

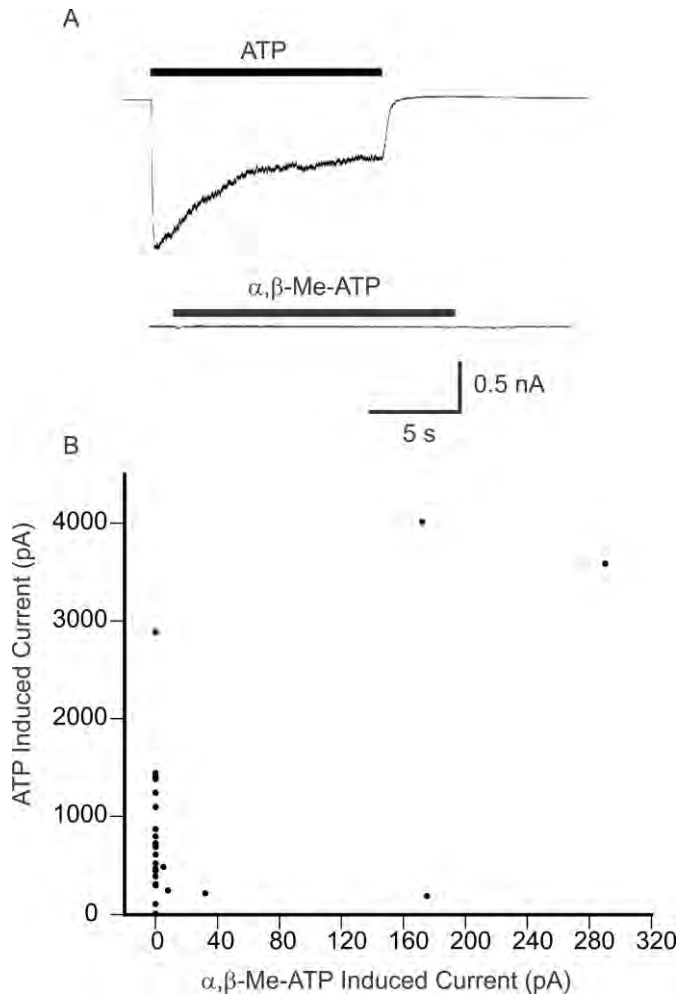


Figure 5. Whole-cell ATP and α,β -Me ATP evoked currents (I_{ATP}) in myenteric neurons from newborn guinea pigs. **A) Recordings of representative currents from the same neuron induced by ATP (upper panel) or α,β -Me ATP (lower panel). I_{ATP} (100 μ M) induced a fast inward current with slow desensitizing kinetics; whereas, α,β -Me ATP evoked only a marginal current. Currents were recorded at -60 mV. **B)** Currents evoked by ATP and α,β -Me ATP in 26 experiments like the one shown in **A**. α,β -Me ATP induced only a small response in 5 out of 26 neurons as compared to the ATP response and only in one of these 26 neurons responded similarly than to ATP. Every circle corresponds to the data from one neuron.**

Table 1

Identifier Position	Oligonucleotide	Annealing Temperature (°C)		Annealing region
Guinea Pig <i>P2X₂</i>				
5	5'-gttctgggcaccatggctgc-3'	55	5'UTR	-12
6	5'-tcctgtctgcagacctggcgt-3'	56	ORF	+1559
7	5'-ttcacagagctggcacacag-3'	55	ORF	+742
8	5'-atggtgggaatcaggctgaa-3'	55	ORF	+944
Guinea pig <i>P2X₃</i>				
1G	5'-atgaactgcatctcagacttcttcac-3'	53	ORF	+1
2G	5'-ttagtggccgatggagtagg-3'	53	ORF	+1157
3G	5'-tgggggacgtggtccggttg-3'	56	ORF	+653
4G	5'-gtccacggactcaggcgcctac-3'	56	ORF	+1161
Guinea pig <i>P2X₄</i>				
5G	5'-ttcctgttcgagtacga-3'	55	5'UTR	+31
6G	5'-ctgtagtacttgcaaac-3'	55	ORF	+885
7G	5'-cagctcaggaggaaaact-3'	58	ORF	+275
8G	5'-aatgcacgacttgaggta-3'	58	ORF	+637
9G	5'-cttgggccatggcaggctg-3'	55	5'UTR	-8
10G	5'-tcactgttccgtgtccccag-3'	55	ORF	+1148
11G	5'-ttacgtcattgggtgggtg-3'	58	ORF	+123
12G	5'-tctcttctcatgcagtagagg-3'	58	ORF	+1071
13G	5'-ggattccggatctaggatgtgg-3'	60	ORF	+238
14G	5'-caggtgacagtcccatttcacct-3'	60	ORF	+767
Guinea pig <i>P2X₅</i>				
15G	5'-agcgttcgactacaagacagaaaa-3'	55	ORF	+35
16G	5'-ggcccagacatctttgaatc-3'	55	3'UTR	+1395
17G	5'-ggagcctgttagagctggaaat-3'	58	ORF	+414
18G	5'-gccggaagatgggacaatagtga-3'	58	ORF	+678
Guinea pig GAPDH				
19G	5'-tgaaggtgaaggtcggtgtgaacg-3'	55	ORF	+55
20G	5'-gtcatcgtatttggccggttctc-3'	55	ORF	+798
21G	5'-ccatggagaaggccgggg-3'	58	ORF	+361
22G	5'-caaagttgcatggatgacc-3'	58	ORF	+536

Table 1. Oligonucleotides used in the RT-PCR of guinea pig P2X₂ (GenBank ID: NM_001172709.1); P2X₃ (ENSEMBL: ENSCPOG00000019432); P2X₄ (NM_001281791.1) and P2X₅ (ENSEMBL: ENSCPOT00000015675).



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

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

Molecular and cellular pharmacology

P2X4 subunits are part of P2X native channels in murine myenteric neurons



Nieto-Pescador María G.^{a,1}, Guerrero-Alba Raquel^{a,1}, Valdez-Morales Eduardo^a, Espinosa-Luna Rosa^a, Jiménez-Vargas Nestor^a, Liñan-Rico Andrómeda^a, Ramos-Lomas Telma L.^a, Díaz-Hernández Verónica^b, Montañón Luis M.^c, Barajas-López Carlos^{a,*}

^a División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, SLP 78216, Mexico

^b Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, Mexico

^c Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 October 2012

Received in revised form

27 March 2013

Accepted 28 March 2013

Available online 6 April 2013

Keywords:

Murine myenteric neurons

P2X receptors

P2X4 receptor

Suramin

PPADS

Ivermectin

Single cell PCR

P2X4 receptor immunoreactivity

ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate if P2X4 receptors are expressed in murine myenteric neurons and if these receptors contribute to form functional channels in the neuronal membrane by using molecular and electrophysiological techniques. The whole-cell recording technique was used to measure membrane currents induced by ATP (I_{ATP}) in myenteric neurons. Compared with recombinant P2X4 receptor-channels (reported by others in a previous study), native myenteric P2X receptors have a relative lower sensitivity for ATP (EC_{50} 102 μ M) and α,β methylene ATP (not effect at 30 or 100 μ M) BzATP was a weak agonist for native P2X receptors. KN-62 had no effect on myenteric P2X channel; whereas PPADS (IC_{50} 0.54 μ M) or suramin (IC_{50} 134 μ M) were more potent antagonists than on P2X² homomeric channels. I_{ATP} were potentiated by ivermectin (effect that is specific on P2X4 receptors) and zinc. Western blotting shows the presence of P2X4 protein and RT-PCR the corresponding mRNA transcript in the small intestine. Immunoreactivity for P2X4 receptors was found in most myenteric neurons in culture. Single-cell RT-PCR shows the presence of P2X4 mRNA in 90% of myenteric neurons. Our results indicate that P2X4 receptors are expressed in the majority of myenteric neurons, contribute to the membrane currents activated by ATP, and because most properties of I_{ATP} does not correspond to P2X4 homomeric channels it is proposed that P2X4 are forming heteromeric channels in these neurons. P2X4 subunits have a widespread distribution within the myenteric plexus and would be expected to play an important role in cell signaling.

©2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

P2X receptors are cation nonspecific channels activated by extracellular adenosine 5' triphosphate (ATP). They are distributed widely along different tissues and are conserved in a large variety of organisms including mammals, birds, and fishes (Fountain and Burnstock, 2009). In mammals there are seven subunits each of them encoded by different genes (P2X1–P2X7) (Coddou et al., 2011; North, 2002). Functional channels are constituted by three P2X subunits (Kawate et al., 2009; Torres et al., 1999). All subunits, except P2X6 (Coddou et al., 2011; North, 2002), can form homomeric channels, and all of them, except P2X7, (however see (Guo et al., 2007)), are able to combine with other subunits to form heteromeric channels 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).

Among P2X receptors, the P2X4 subtype is one of the most ubiquitous in its expression along different tissues (Bo et al., 2003; Surprenant and North, 2009). In the mouse (Norenberg et al., 2012), it is the only P2X receptor that is positively modulated by ivermectin, as it has been determined in heterologous expression systems (Coddou et al., 2011; Khakh et al., 1999; Priel and Silberberg, 2004; Sim et al., 2006). Furthermore, this receptor shows either a low sensitivity (IC_{50} > 100 μ M) (Buell et al., 1996; Soto et al., 1996) or positive modulation by suramin (Bo et al., 1995; Townsend-Nicholson et al., 1999). Zn^{2+} has also been reported that positively modulates P2X4 receptors, however, this action is not specific on these receptors because this cation has a similar effect on P2X2, P2X3, and P2X5 receptors (Coddou et al., 2011). P2X receptors play different roles in accordance to the tissue where they are expressed. In the enteric nervous system they mediate fast excitatory postsynaptic potentials (Galligan and

* Corresponding author. Tel.: +52 444 834-2000ext2033; fax: +52 444 834-2010.

E-mail address: cbarajas@ipicyt.edu.mx (B.-L. Carlos).

¹ Both authors contributed equally to this paper.