

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CAMBIOS ONTOGÉNICOS DE LOS RECEPTORES P2X₄
ACTIVADOS POR ATP EN EL INTESTINO DE RATA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

PRESENTA

LIGIA VALLE MORENO

DIRIGIDA POR

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CAMBIOS ONTOGÉNICOS DE LOS RECEPTORES P2X₄
ACTIVADOS POR ATP EN EL INTESTINO DE RATA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

PRESENTA

LIGIA VALLE MORENO

DIRIGIDA POR

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SINODALES

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER _____
DIRECTOR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA _____
SINODAL

QFB. SERGIO PACHECO HERNÁNDEZ _____
SINODAL

Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA _____
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE CUADROS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1. Comunicación neuronal	3
II.2. Receptores a neurotransmisores	4
II.3. Cotransmisores	5
II.4. Receptores purinérgicos	5
II.4.1. Receptor P2X ₄	6
II.5. Intestino delgado	9
II.5.1. Histología	11
II.5.2. Sistema nervioso entérico	14
II.5.3. Desarrollo del Sistema Nervioso (Ontogenia)	16
II.5.4. Padecimientos gastrointestinales	16
II.5.4.1. Motilidad anormal e hipersensibilidad visceral	16
II.5.4.1.1. Tratamiento de padecimientos gastrointestinales	17
III. HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVOS	20
IV.1. General	20
IV.2. Específicos	20
V. METODOLOGÍA	21

V.1. Reactivos y materiales	21
V.2. Equipos	21
V.3. Métodos	21
V.3.1. Preparación de reactivos y equipos	21
V.3.2. Animales	22
V.3.3. Extracción y fijación de tejidos	23
V.3.4. Inmunohistoquímica	23
V.3.5. Fotografía	26
V.4. Diseño de experimentos	27
VI. RESULTADOS	28
VII. DISCUSIÓN	37
VIII. CONCLUSIONES	41
IX. BIBLIOGRAFÍA	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Sinapsis neuronal.	3
2. Arquitectura del receptor P2X4.	7
3. Partes que integran el intestino delgado.	10
4. Corte transversal del intestino delgado.	11
5. Células del intestino delgado.	13
6. Unión neuromuscular.	15
7. Cámara húmeda.	22
8. Tejido en tissue tek.	23
9. Crióstato marca Leica.	24
10. Método de inmunoperoxidasa amplificada.	25
11. Técnica de marcaje inmunocitoquímico.	26
12. Tiempo de fijación de los tejidos en paraformaldehido.	28
13. Comparación entre inmunohistoquímica sin amplificar y amplificada.	29
14. Blancos de ratas PO.	30
15. Blancos de ratas adultas.	30
16. Porción proximal de intestino delgado de ratas PO.	32
17. Porción distal de intestino de ratas PO.	33
18. Porción proximal de ratas adultas..	34
19. Porción distal de intestino de rata adulta.	35

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Diseño de los experimentos	27
2. Resumen de resultados	36

RESUMEN

El ATP se ha reconocido como un neurotransmisor, que se ha encontrado en el Sistema Nervioso Entérico. Esta molécula activa receptores purinérgicos que se han clasificado en diferentes grupos: P1 y P2 y dentro de los P2 están los X y los Y. Existen 7 subtipos de los receptores P2X, de los cuales del 1 al 3 han sido extensamente estudiados. Sin embargo, poco se sabe del subtipo P2X₄. Se ha encontrado el receptor P2X₄ en epitelios como el respiratorio y uterino, en macrófagos asociados a tejidos y ha sido asociado con procesos de apoptosis, de dolor e inflamación en macrófagos, interviniendo en la vía de las prostaglandinas, por lo que es posible que este receptor se encuentre en la mucosa intestinal y que probablemente esté relacionado con procesos de dolor e inflamación en el intestino. El objetivo de este estudio fue demostrar la expresión del receptor P2X₄ en los segmentos proximal y distal de vellosidades de intestino delgado de ratas neonatas y adultas. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica en cortes finos de los tejidos y anticuerpos primarios y secundarios para observar la presencia de este receptor. Los resultados indicaron la presencia del receptor P2X₄ en diferentes zonas de las vellosidades según la porción de intestino evaluada. En la porción proximal de ratas neonatas se expresó en los enterocitos y en la distal en el canal linfático, en las ratas adultas se observó señal en la lámina propia; lo que nos sugiere que los receptores P2X₄ se expresan en diferentes zonas según la acción que ejerzan, pudiendo estar involucrados en distintos mecanismos de acción como en la regulación de enzimas en los enterocitos o en defensa celular en las células inmunes. La importancia de este estudio radica en generar mayor conocimiento sobre el receptor P2X₄ debido a que esta implicado en procesos de inflamación pudiera ser un buen blanco farmacológico para combatir padecimientos gastrointestinales.

I. INTRODUCCIÓN

El ATP es una molécula que se ha reconocido como un neurotransmisor del sistema nervioso. Dentro de los receptores a ATP se encuentra la familia de los P2X, que están asociados a canales iónicos y activan una rápida despolarización de la célula. Algunos subtipos de estos receptores P2X, se han estudiado extensamente como es el X₁, X₂ y X₃ y se ha reportado que están expresados en diferentes subtipos de neuronas entéricas. Sin embargo, son pocos los estudios realizados acerca del receptor P2X₄, en las células del intestino que posteriormente puedan ser ampliados en las implicaciones fisiológicas del intestino.

El receptor P2X₄ se ha relacionado con diversos procesos fisiológicos desde transmisión sináptica hasta apoptosis y dolor provocado por la inflamación, característicos de varias enfermedades intestinales, que ocupan una de las primeras causas de consulta médica en México y en el mundo. Debido a que los receptores purinérgicos están implicados en diversas vías de transducción no sería sorpresa que la disfunción de los mismos estuviera implicada en cáncer, inflamación y enfermedades neuronales.

Por lo que es de importancia generar mayor conocimiento sobre estos receptores. Se ha mostrado que algunos receptores a ATP se expresan en diferentes cantidades, dependiendo de la edad del animal en estudio, lo que sugiere pensar que en ciertas etapas de la vida de un animal el tracto intestinal puede ser regulado mayormente por algún receptor específico. La diferencia de esta expresión radica principalmente en la alimentación de un animal neonato lactante a la de un adulto. Si la expresión de los receptores dependiera de la edad, tendría que haber tratamientos a enfermedades gastrointestinales adecuados a cada etapa correspondiente de vida.

En este estudio se exploró la diferencia de la expresión del receptor P2X₄ entre diferentes edades de ratas, así como los cambios en las diferentes porciones analizadas del intestino y el tipo de células en que se expresa éste receptor, lo cual

podría servir para estudios posteriores en los que se explorara la función y mecanismo de acción de este receptor y poder desarrollar medicamentos dirigidos a la activación o inhibición del receptor P2X₄ con fines terapéuticos para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales, tanto para el área pediátrica como en adultos.

II. ANTECEDENTES

II.1. Comunicación neuronal

Las neuronas son células que constituyen principalmente nuestro sistema nervioso. Estas se comunican mediante uniones características llamadas sinapsis y cada neurona puede contener varias sinapsis. Una de las principales funciones de las neuronas es transmitir señales desde el sistema nervioso central (SNC) a órganos periféricos y viceversa. Esta señal (Figura 1) la transmiten a partir de la liberación de moléculas llamadas neurotransmisoras desde una neurona pre sináptica a otra consecuente llamada célula diana. Una gran variedad de células pueden fungir como dicha célula diana, desde una neurona postsináptica hasta células del músculo liso (para producir relajación o contracción) o glándulas (para producir secreción de alguna enzima), entre otras (Bustamante, 2007).

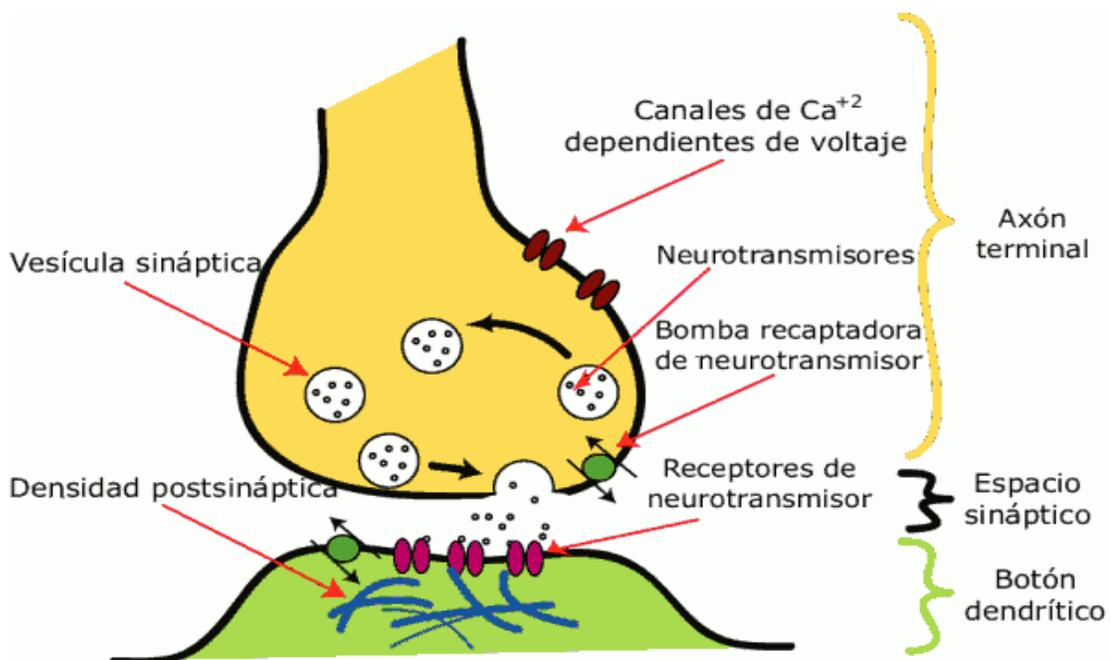


Figura 1. Sinapsis neuronal. La figura muestra la despolarización de la neurona presináptica y la liberación de los neurotransmisores contenidos en vesículas. La neurona postsináptica (en la parte inferior) contiene los receptores a los neurotransmisores en su membrana; estos son los que transmitirán la señal a resto de la célula (Commons, 2006).

Las neuronas que cuentan con canales iónicos pueden ser activadas por ligando, voltaje o estrés. Cuando una neurona es activada por señales del entorno, envía

impulsos eléctricos a otra u otras neuronas, ocasionados por un cambio en el potencial eléctrico, ya sea despolarizándose debido a la entrada de cargas positivas como el sodio (Na^+), o hiperpolarizándose en caso que se abran canales de cloro (Cl^-). Cuando se abren los canales de sodio los iones pasan a través del axón de la neurona hasta llegar a la membrana de la terminal sináptica, donde se encuentran canales de calcio que son activados por esta despolarización y permiten la entrada de iones de calcio (Ca^{++}). Dicho ion activa la liberación de neurotransmisores a un espacio sináptico que comunica con la célula diana. La célula diana contiene en su membrana estructuras proteicas llamadas receptores, que reconocen a los neurotransmisores y al unirse a ellos desencadenan una respuesta (Hall y Guyton, 2001).

II.2. Receptores a neurotransmisores

Para cada neurotransmisor generalmente existe un receptor específico, el cual tiene la función de dar respuesta a la señal recibida. Entre los tipos de receptores a neurotransmisores están los ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos se caracterizan por producir una respuesta rápida al abrir canales iónicos directamente. Con esto se generan despolarizaciones o hiperpolarizaciones en la célula diana y consecuentemente respuestas excitatorias o inhibitorias respectivamente, lo que indica que transforman señales químicas en eléctricas, provocando un cambio en el potencial. Dicho cambio puede desencadenar un impulso nervioso pudiendo alterar las actividades de algunas proteínas y provocar una respuesta, como la liberación de iones Ca^{++} (Alberts y col., 2006).

Por otra parte, los receptores metabotrópicos son de acción lenta y están acoplados a proteínas G, formada por tres subunidades α , β y γ . Cuando se une el ligando al receptor, la subunidad α se desvincula de las otras dos, pudiendo activar o inhibir distintos procesos interactuando con distintas proteínas, como la adenilato ciclasa o proteínas reguladoras de la transcripción de genes. Esta interacción inicia una cascada de reacciones bioquímicas intracelulares, que tendrá como consecuencia la inducción o inhibición de la síntesis de segundos mensajeros, los

cuales producirán señales como: la apertura de canales iónicos, activación de enzimas, activación de genes, etc. (Flórez, 2003; Redolar y Ripoll, 2010).

II.3. Cotransmisores

Los cotransmisores son moléculas liberadas simultáneamente con los neurotransmisores desde una misma neurona presináptica, actuando cada uno con su receptor específico. Se ha encontrado que la molécula de adenosin 5- trifosfato (ATP) actúa como cotransmisor de dos de los neurotransmisores más conocidos: acetilcolina (Ach) y noradrenalina (NA) (Burnstock, 2009b). Los cotransmisores se descubrieron al observar que aun bloqueando los receptores adrenérgicos y colinérgicos se observaba transmisión sináptica en neuronas. Por ésta razón se les llamó cotransmisores no colinérgicos, no adrenérgicos (NCNA) (Langer y Pinto, 1976). Posteriormente se descubrió la presencia de varios cotransmisores en fibras nerviosas, como el polipéptido vasoactivo intestinal (VIP), después la del oxido nítrico (NO) y finalmente la del ATP. Tomó demasiado tiempo aceptar que la molécula de ATP estaba presente en la señalización extracelular debido a su implicación en varios procesos intracelulares como el ciclo de Krebs y la respiración celular. Actualmente se ha aceptado que el ATP se encuentra como cotransmisor de Ach y NA en nervios, tanto del SNC como en la periferia, provocando diversos efectos en varios órganos como riñón, intestino, corazón, etc. (Burnstock, 2008; Zimmermann, 2000).

A los neurotransmisores que contienen adenina se les llamó purinérgicos, como es el ATP. Bajo este concepto está implícita la existencia de receptores purinérgicos, por lo que a partir de esta información se iniciaron nuevas investigaciones en búsqueda de estos receptores (Burnstock, 2008).

II.4. Receptores purinérgicos

Después de que los receptores purinérgicos fueron definidos se clasificaron en dos grupos: P1 y P2. Se les denominó receptores P1 a los que sólo se unen a análogos de adenosina, y receptores P2 a los que se unen a análogos de ATP. Se encontró

que algunos receptores purinérgicos están insertados en la membrana de células postsinápticas y presinápticas, donde en las primeras se han encontrado receptores P1 y en las segundas receptores P2, que actúan como neuromoduladores de retroalimentación (Burnstock, 2009a).

En base a estudios farmacológicos realizados sobre los mecanismos de transducción de los receptores purinérgicos P2, se propuso que se separaran en dos familias: los P2Y que son los receptores acoplados a proteínas G o metabotrópicos (Lustig y col., 1993), y los P2X a receptores ligados a canales iónicos o ionotrópicos (Brake y col., 1994); de los cuales se han identificado 8 subtipos de receptores P2Y y 7 subtipos de P2X.

Los receptores P2X se han encontrado en diferentes tipos de células según la especie analizada, se ha visto que se encuentran en las terminaciones nerviosas del tracto gastrointestinal y en células epiteliales de la mucosa simulando reflejos motores y transmitiendo señales nociceptivas como el dolor, por esto se ha incrementado el interés por investigar más sobre estos receptores (Burnstock, 2008). Los receptores P2X son canales iónicos selectivos a cationes, con ligando a ATP extracelular y se han visto implicados en diversos procesos fisiológicos, desde transmisión sináptica hasta inflamación y sensibilidad al dolor (Kawate y col, 2009).

II.4.1. Receptor P2X₄

El ATP regula transmisiones sinápticas rápidas a través de receptores P2X, de neurona a neurona y de neurona a célula efectora. Solo tres subtipos de receptores P2X han sido extensamente estudiados (P2X₁, P2X₂, P2X₃) y han demostrado estar presentes específicamente en ciertos tejidos y órganos. La transmisión sináptica entre neuronas del sistema nervioso entérico y la pared intestinal, involucra la participación de varios neurotransmisores, entre ellos el ATP que se encontró que actúa vía receptores P2X en potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs) rápidos y vía receptores P2Y₁ mediante estímulos lentos de EPSPs (Monro y col., 2004).

El cuarto miembro de la familia P2X ha sido estudiado recientemente por diferentes grupos de investigación, quienes han reportado su presencia en cerebro y en varios tejidos periféricos, mediante técnicas de Northern Blot. El receptor P2X₄ se ha encontrado especialmente en epitelios como el respiratorio, uterino e intestinal; lo que indica su relación con funciones epiteliales (Tanaka y col., 1996).

El receptor P2X₄ es una proteína compuesta por 3 subunidades (Figura 2) unidas como complejos homoméricos o heteroméricos, cada subunidad tiene dos segmentos transmembranales dejando los dominios amino y carboxi terminales en el espacio intracelular (Kawate y col, 2009).

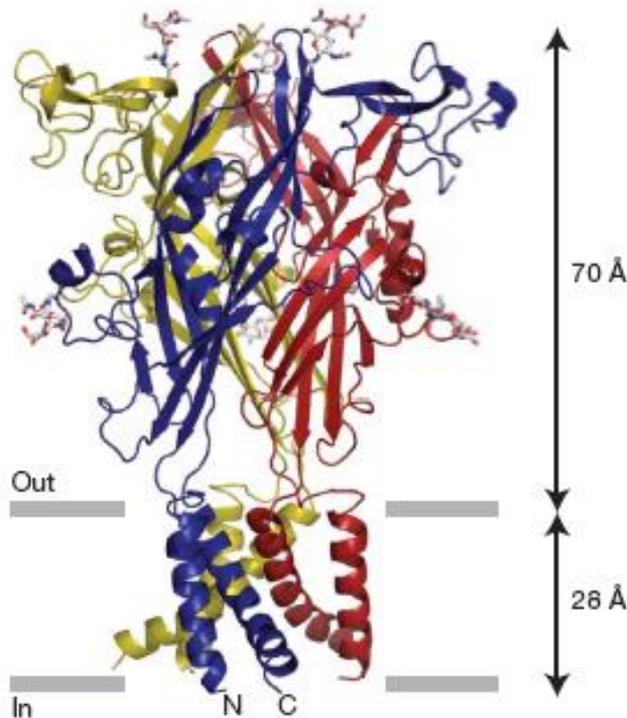


Figura 2. Arquitectura del receptor P2X₄. Estructura homotrimérica del receptor cerrado P2X₄ en vista paralela a la membrana, cada subunidad esta marcada por un color diferente. Las barras grises sugieren los límites de la bicapa lipídica de la membrana, quedando en la parte superior el medio extracelular y en la parte inferior el citoplasma (Kawate y col, 2009).

Las subunidades forman un canal con alta permeabilidad a cationes como sodio, potasio y en especial el calcio, lo que sugiere que esta involucrado en alguna vía de

activación de la contracción del músculo liso o activación de cascadas de señalización. El receptor P2X₄ también puede formar heterodímeros con P2X₁, P2X₆ y P2X₇ y actuar de manera distinta (North y Surprenant, 2000).

En recientes investigaciones se ha reportado que el receptor P2X₄ es el mejor candidato de los receptores P2 como desencadenador de apoptosis en células mesangiales humanas, que se encuentran en el riñón, donde a partir de mezclas de agonistas y antagonistas específicos para los diferentes receptores P2 se observó su presencia y efecto apoptótico mediante citometría de flujo e inmunolocalización por inmunofluorescencia (Solini y col., 2007). En el epitelio intestinal se ha reportado abundante RNAm que codifica para el receptor P2X₄, en el cual las células tienen una vida corta (2-3 días) y mueren por apoptosis. Esto nos sugiere que posiblemente el receptor P2X₄ esté involucrado en la regulación de la muerte celular de las células del epitelio intestinal (Bermúdez y col., 2007).

En el estudio con ratones knock out (P2X₄^{-/-}) en los que se suprimió el gen que codifica para el receptor P2X₄, se concluyó participa en el proceso de inflamación debido a que al someterlos a temperaturas altas en las patas, se observó una disminución en los niveles de inflamación de los ratones P2X₄^{-/-}, respecto a los ratones silvestres. Además se observó en esta línea de ratones P2X₄^{-/-} una respuesta normal al dolor fisiológico agudo y al dolor inducido por daño en tejido (en comparación con los controles que si expresaban P2X₄), por lo que el bloqueo del receptor P2X₄ podría ser una buena opción para el tratamiento al dolor crónico, ya que no afecta otro tipo de dolores (Tsuda y col., 2009). Esta evidencia se complementa con la observación, mediante técnicas de inmunohistoquímica, de la expresión de receptores P2X₄ en células inflamatorias como los macrófagos (Sim y col., 2007).

Se ha asociado previamente la función de la familia de los P2X con dolor, algunos estudios han demostrado específicamente que al activar el receptor P2X₄ induce la producción de prostaglandinas (PGE) y con esto el dolor e inflamación. Esto lo observaron en ratones inyectados con formalina, un agente químico que induce

dolor agudo y de inflamación, en ratones knock out para P2X₄ disminuían la hipersensibilidad respecto a los silvestres, y mantuvieron sus niveles de PGE₂ respecto a los ratones silvestres en los cuales hubo un incremento de PGE₂. También se observó que al agregar ATP extracelular a macrófagos del peritoneo, se incrementaban los niveles de calcio intracelular en ratones silvestres a diferencia de los knock out. El calcio es el segundo mensajero mas importante involucrado en la cascada del acido araquidónico (producción de prostaglandinas) por lo que sugieren que el receptor P2X₄ esta involucrado en el paso de calcio y que este a su vez activa esta cascada (Jakobsson, 2010; Ulmann y col, 2010).

Al saber que el receptor P2X₄ está involucrado en la apoptosis, inflamación, células inmunológicas, etc., por lo que se considera que este receptor está relacionado en la patogénesis de enfermedades gastrointestinales como: el reflujo, el síndrome del intestino irritable, el síndrome de la mala absorción, diarrea, constipación, cáncer intestinal, entre otras (Burnstock, 2008; Galligan, 2004).

Tomando en cuenta que un 99% de la población cursa con enfermedades intestinales en alguna parte de su vida, los receptores P2X₄ son de interés debido a la falta de investigación sobre éstos en el intestino delgado, ya que se ha visto la importancia de encontrar nuevas herramientas para conocer posibles mecanismos de acción de dichos receptores, con objeto de poder diseñar nuevos fármacos para el tratamiento de estas enfermedades.

II.5. Intestino delgado

Los receptores purinérgicos se han encontrado en distintos epitelios como el respiratorio, uterino y también en el intestino delgado, que es la parte del tubo digestivo localizada después del estómago y termina en el ciego del colon (Figura 3). El intestino delgado se divide en tres porciones: duodeno, yeyuno e íleon. Sus funciones principales son la absorción y digestión de nutrientes, funciones de barrera contra agentes extraños, de señal de reconocimiento y producción de hormonas (Junqueira y Carneiro, 2005).

La absorción de los nutrientes inicia cuando el bolo alimenticio es mezclado con el ácido clorhídrico del estómago formando el quimo. En el duodeno intestino delgado se mezcla el quimo con las secreciones tanto biliar como pancreática. El tránsito alimenticio continúa por el intestino delgado, luego por el intestino grueso y terminando en el recto. En todo este trayecto se secretan diferentes enzimas que degradan los alimentos y así se completa el proceso de la digestión. La mayoría de los nutrientes son absorbidos en el intestino delgado, el cual tiene características peculiares en su superficie que lo hacen tan eficiente en esta acción como: las vellosidades intestinales y microvellosidades en las células epiteliales. Estos pliegues o vellosidades, que forman cavernas y protuberancias, amplían considerablemente la superficie que está en contacto con el alimento, permitiendo un mejor contacto y una mayor absorción de nutrientes (Fox, 2003).

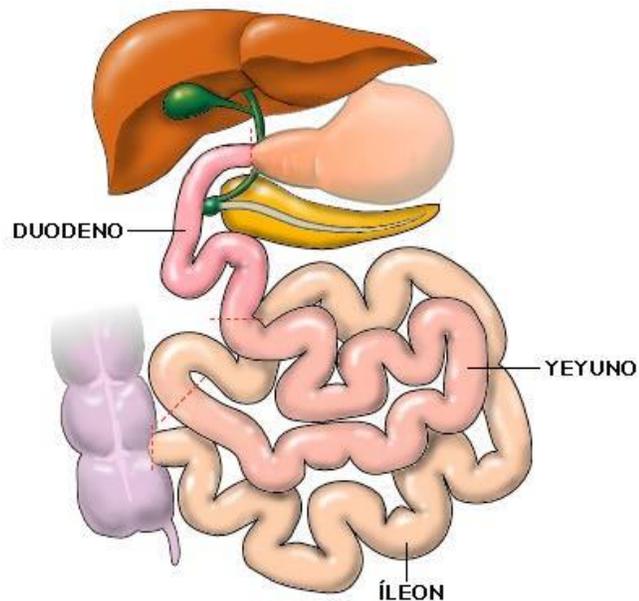


Figura 3. Partes que integran el intestino delgado. En la imagen se puede observar donde inicia y donde termina cada uno de los segmentos del intestino delgado (Pearson, 2008).

Las vellosidades se encuentran en la luz intestinal, estas están conformadas por diversas capas que se mencionan de abajo (luz intestinal) hacia arriba, como se muestra en la Figura 4. La primera capa es de mucosa, aquí se encuentran las

criptas de Lieberkün, donde las células que forman estas criptas están en constante mitosis, remplazando a células viejas del intestino.

Por encima de la mucosa se encuentra la capa submucosa, donde se encuentran todos los vasos linfáticos, venas y arterias que subsiguientemente vascularizarán a la luz intestinal. Posteriormente, se encuentran encima las capas musculares, que están formadas por una capa de músculo liso circular, seguida de una capa de músculo liso longitudinal. Gracias a la combinación de la contracción y relajación de ambas capas de músculo, es posible el movimiento peristáltico del intestino para que el alimento pueda seguir su trayecto (Kierszenbaum, 2008).

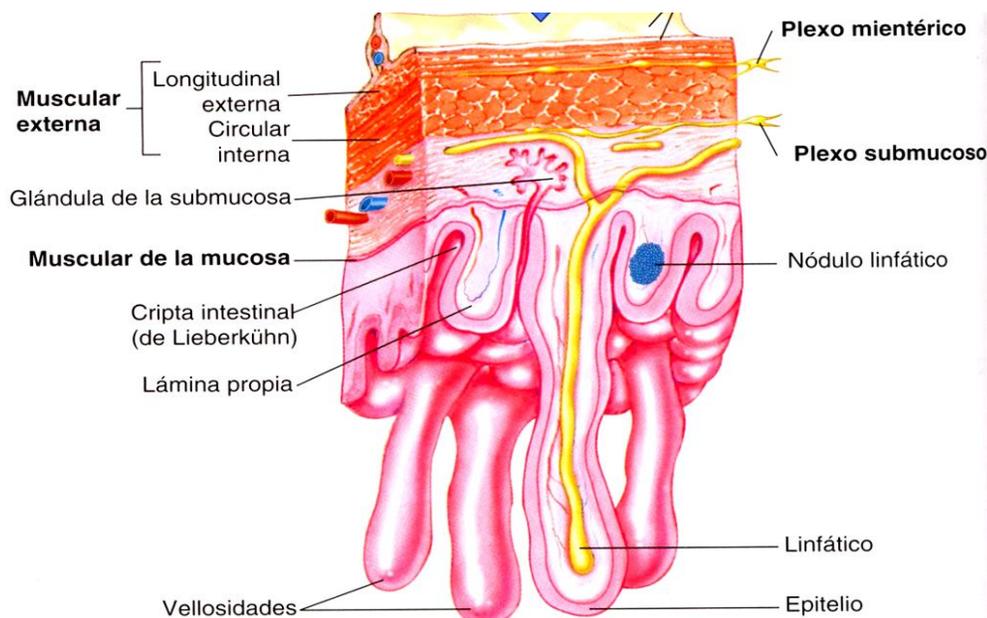


Figura 4. Corte transversal del intestino delgado. En la figura se indican las capas que lo integran. Se pueden observar las vellosidades en la mucosa, que dan a la luz intestinal, las capas submucosa, musculares y los plexos del sistema nervioso entérico como el mientérico y el submucoso (Fox, 2003).

II.5.1. Histología

El epitelio intestinal de la mucosa está formado por diferentes células (algunas de estas se muestran en la Figura 5 con distintas funciones, en las que se incluyen las siguientes:

a) Los enterocitos o células absorbentes, estas células presentan microvellosidades que aumentan la superficie y su capacidad de absorción, la cual es su principal función. Los enterocitos tienen forma columnar y prismática y al ser observadas con el microscopio óptico se caracterizan por la presencia de una condensación en su superficie apical (el borde estriado) (Figura 5). La cantidad de estas células disminuyen en cantidad del duodeno al recto.

b) Las células caliciformes, son células cilíndricas que son secretoras de mucina o moco que protege al epitelio de la abrasión mecánica y de la invasión microbiana, estas se encuentran intercaladas entre los enterocitos y tienen dos dominios: 1) apical en forma de copa, que contiene grandes gránulos de moco que se descargan en la superficie del epitelio, 2) dominio basal estrecho, que se une a la lámina. El moco que se secreta contiene glicoproteínas (80% hidratos de carbono, 20% aminoácidos) que se liberan por exocitosis. El número de estas células son menos frecuentes en el duodeno y aumentan en dirección al íleon.

c) Las células intermedias o indiferenciadas, son la mayoría de las células intermedias de la mitad inferior de la cripta intestinal, suelen dividirse una o dos veces más, antes de decidir qué tipo de célula serán (Ross y col., 1997).

d) Las células de Paneth, producen una enzima bacteriolítica llamada lisozima, que actúa contra microorganismos indeseables y regulan la flora intestinal. Son típicas células exocrinas con gránulos de secreción acidófilos en la porción basal del citoplasma, por lo que se pueden teñir con colorantes como la eosina dando una coloración rojiza (Junqueira y Carneiro, 2005).

En el tubo digestivo, es característica la presencia de MALT, tejido linfoide asociado a mucosa. Este tejido linfoide se encuentra en el corion o lámina propia (Figura 5) de la mucosa. Es por lo general un tejido linfoide difuso o nodular. Junto a este tejido linfoide se encuentran generalmente plasmocitos. En el íleon, el tejido linfoide es especialmente notorio por su disposición en placas, denominadas placas de Peyer. El nódulo linfático produce una modificación en el epitelio de revestimiento.

Las glándulas de Brunner son las glándulas de la submucosa duodenal, que son características de él. Estas glándulas secretan moco que ayuda a contrarrestar el pH ácido que proviene del estómago (Hall y Guyton, 2001).

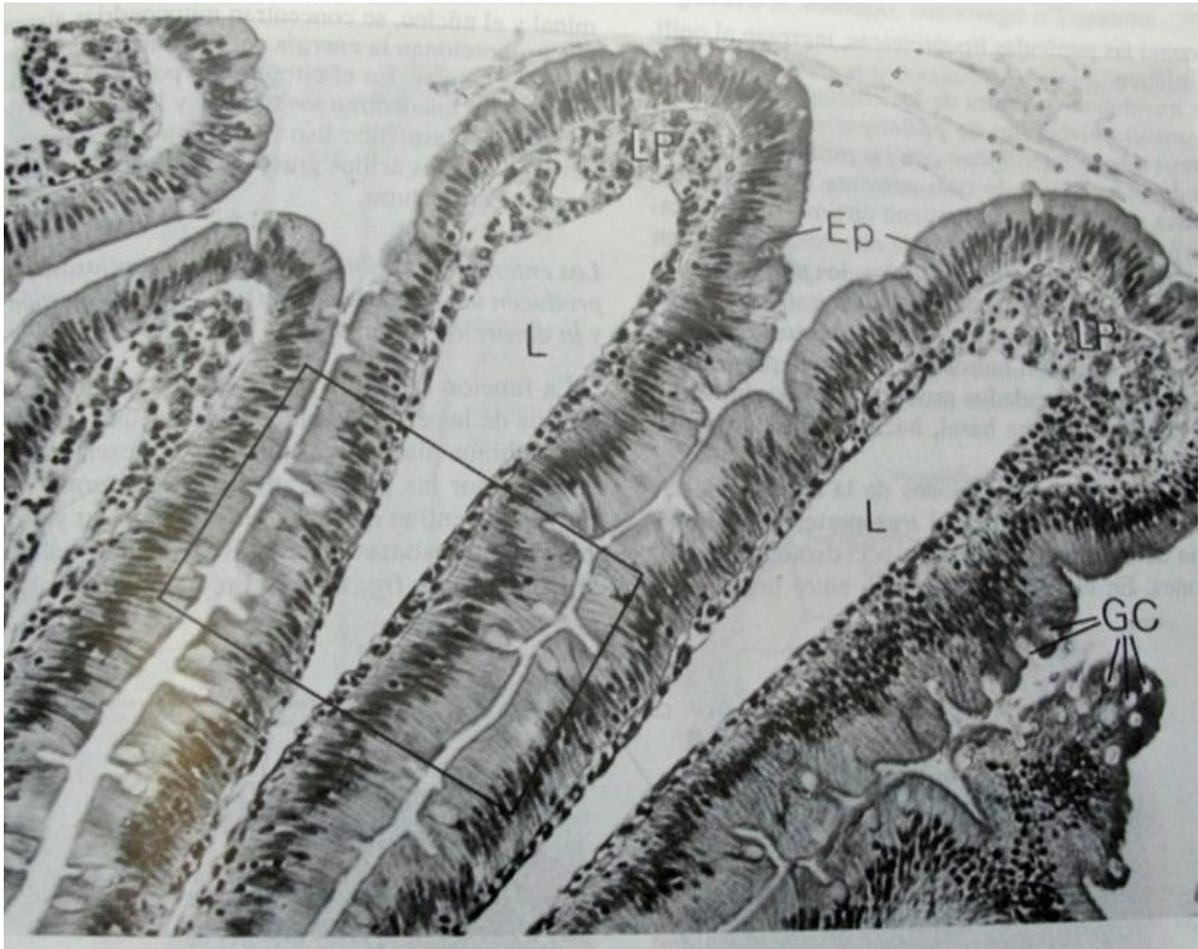


Figura 5. Células del intestino delgado. Microfotografía óptica (X160) de vellosidades intestinales, donde se muestra que la superficie de las vellosidades está revestida por epitelio simple cilíndrico (Ep). Las células son principalmente enterocitos con chapa estriada. En el epitelio también son evidentes células caliciformes (GC) con su característica acumulación de moco. Por debajo del epitelio hay un tejido conectivo llamado lámina propia (LP). En el centro de cada vellosidad se ve un capilar linfático, que se conoce como quilífero central (L) (Ross y col., 1997).

El intestino delgado se encuentra inervado por neuronas, que sirven para que se pueda realizar las contracciones, motilidad intestinal, secreción de enzimas, etc. A esta red de neuronas que lo conectan, se les llama sistema nervioso entérico (SNE) que constituye la tercera división del SNC.

II.5.2. Sistema nervioso entérico

Además de la transmisión de la señal de neurona a neurona, también existen otro tipo de uniones como la neuromuscular (Figura 6), donde se produce la contracción o relajación del músculo a través de los neurotransmisores liberados por la señal de las neuronas.

En el intestino delgado se producen dos tipos principales de contracciones: peristaltismo y segmentación. El peristaltismo es mucho más débil y lento, en cambio la segmentación es la principal actividad contráctil del intestino delgado y consiste en que se producen diversas contracciones musculares simultáneamente en diferentes segmentos intestinales, ayudando a mezclar y mover el quimo hacia adelante, a través del intestino delgado (Fox, 2003).

Existen unas células, llamadas Cajal, que sirven como marcapasos para la contracción intestinal, es decir regulan el ritmo de las contracciones que está marcado por despolarizaciones graduadas denominadas ondas lentas. Se han visto que están inervadas por nervios entéricos y también se ha encontrado la presencia de receptores purinérgicos $P2X_5$ y $P2X_2$ en estas células de Cajal (Furuzono y col., 2005).

El SNE es la división del sistema nervioso autónomo que inerva a todo el tubo digestivo, este puede funcionar independientemente del SNC, aunque existen nervios que conectan el SNC con los plexos entéricos, por esta razón se le llama al SNE el segundo cerebro. El SNE está formado por dos plexos: uno externo que se encuentra entre las capas musculares tanto longitudinales como circulares, que regula principalmente los movimientos gastrointestinales y recibe el nombre de plexo mientérico de Auerbach; y otro plexo interno llamado plexo submucoso o de Meissner, que se encuentra inervando a la submucosa y controla fundamentalmente la secreción y el flujo sanguíneo local. Estos plexos se muestran en la Figura 3 (Córdova, 2003; Hall y Guyton, 2001). Las neuronas del SNA tiene neuronas que pueden haber sinapsis con las neuronas del intestino, y por lo tanto

que se pueden liberar neurotransmisores de las neuronas del sistema nervioso autónomo simpático y parasimpático a células intestinales y viceversa. Se ha encontrado que los receptores de Ach y P2X, juegan un rol central en transmisiones sinápticas rápidas en el plexo mientérico (Burnstock, 2008).

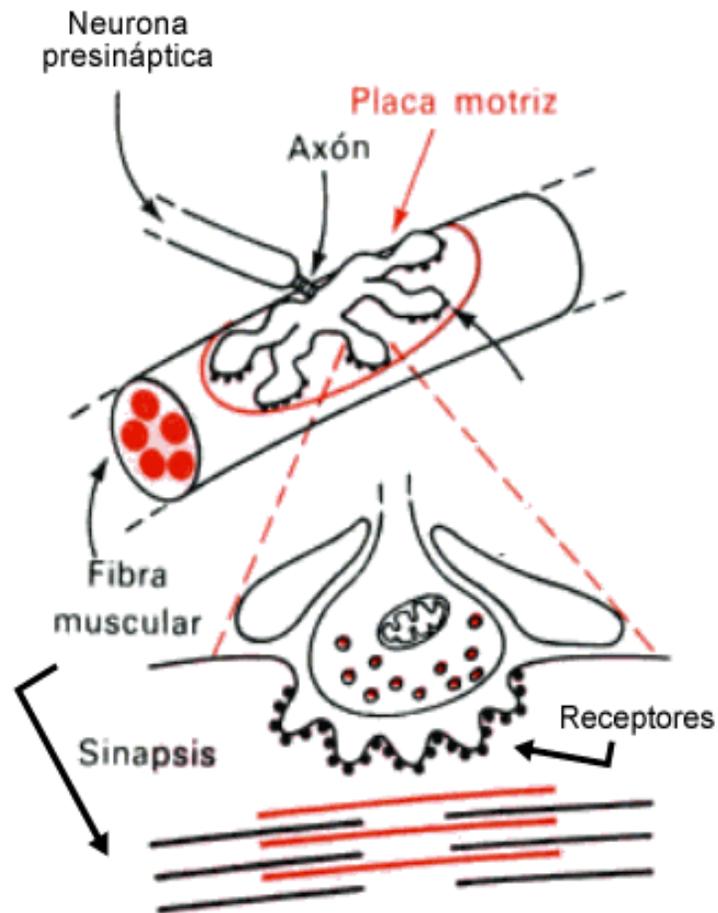


Figura 6. Unión neuromuscular. En la imagen se muestra la unión de una neurona con una fibra muscular. Al liberarse los neurotransmisores a partir de la neurona presináptica las células diana reciben la señal de contraerse o relajarse (Macarulla y Goñi, 1994).

La población principal de células inmunes del SNC es la microglia, que representa el sistema mononuclear fagocítico del SNC. Se ha observado en microglías, que la expresión del RNAm del receptor P2X₄ varía con la edad de los ratones (Crain y col., 2009), lo que indica que algunos receptores purinérgicos aumentan o disminuyen su expresión dependiendo de la etapa de desarrollo, en la que se encuentre el animal.

II.5.3. Desarrollo del Sistema Nervioso (Ontogenia)

El desarrollo del SNE se lleva a cabo durante la fase prenatal, aunque después del parto sigue habiendo cambios en la morfología y expresión de diferentes receptores o proteínas, debido principalmente a las variaciones en la alimentación que recibe el ser vivo. Por ejemplo, en los animales neonatos que aún son lactantes tanto su sistema gastrointestinal como el SNE, es diferente al de animales adultos que ya consumen alimentos sólidos. En una investigación realizada por Giaroni y col., 2006 se examinó la presencia y función de algunos receptores P2 (P2Y₁₋₄, P2X₁₋₃) en el intestino de ratón neonato durante su desarrollo posnatal, para esto se utilizaron herramientas como inmunohistoquímica, Western Blot, y estudios farmacológicos, donde se observó que la expresión de diferentes receptores iba cambiando conforme la edad de la rata. La presencia de los receptores P2Y_(1, 2 y 4) en el ratón neonato fue más marcada, respecto a los receptores P2X_(1, 2 y 3), que solo se observaron a partir del día 8 en el músculo liso del íleon de ratón, excepto el P2X₁ cuya presencia no se observó su a ninguna edad.

II.5.4. Padecimientos gastrointestinales

Existen diversos trastornos gastrointestinales funcionales (FGIDs) en los que sus síntomas se relacionan con combinaciones de diversos determinantes fisiológicos conocidos: incremento de la reactividad motora, aumento en la hipersensibilidad visceral, alteración de la función inmune de la mucosa y la función inflamatoria, regulación alterada del CNS- sistema nervioso entérico, entre otras. Los FGIDs se pueden clasificar de acuerdo al intervalo de edad, si la patología pertenece al adulto o al neonato/infante, debido a las diferencias existentes tanto en la ingesta de alimentos, como en el desarrollo gastrointestinal en las diferentes etapas del desarrollo del humano (Drossman, 2006).

II.5.4.1. Motilidad anormal e hipersensibilidad visceral

Es ampliamente reconocido que el vómito, la diarrea, el dolor abdominal agudo y otros síntomas del tracto gastrointestinal se generan por una perturbación en la

motilidad gastrointestinal, y también en sujetos sanos con emociones fuertes o estrés ambiental puede conducir a un aumento en la motilidad en el esófago, estomago, intestino delgado y colon. Estos padecimientos y otros ya mencionadas llevan a que un 99% de la población cursa alguna vez en su vida con algún padecimiento gastrointestinal. Esto hace prestar atención sobre el tratamiento de estos padecimientos (Drossman y col., 2006).

La asociación negativa del dolor con trastornos de la motilidad GI y con muchos de los trastornos GI funcionales (por ejemplo: síndrome de dolor epigástrico, síndrome de intestino irritable, síndrome de dolor abdominal funcional) es explicado mediante estudios más recientes en relación con anormalidades en la sensación visceral. Pacientes que cursan con hipersensibilidad visceral tienen un bajo umbral del dolor y padecen de dolor de hinchazón en el intestino (hiperalgesia visceral) o tienen mayor sensibilidad incluso a la función intestinal normal (alodinia), incluso puede existir un área creciente de referencia somática de dolor visceral (Drossman y col., 2006).

II.5.4.1.1. Tratamiento de padecimientos gastrointestinales

Durante mas de 30 años los tratamientos más empleados en pacientes con FGIDs involucra el uso de agentes psicotrópicos. Recientemente, algunos estudios se han enfocado en evaluar los efectos de los antidepresivos tricíclicos y se han visto beneficiados pacientes con patologías gastrointestinales, principalmente aquellos con enfermedad moderada.

Se ha comprobado que los antidepresivos, principalmente la paroxetina, inhiben fuertemente las respuestas de calcio mediadas por ATP en células que expresan receptores P2X₄. Estos resultados sugieren que la paroxetina actúa como un analgésico potente vía receptores P2X₄, por lo que es posible que los antidepresivos utilizados clínicamente en pacientes con dolor neuropático deban su efecto, por lo menos en parte, a una inhibición de receptores P2X₄ (Drossman, 2006; Nagata, 2009).

Todas estas investigaciones, indican que el receptor P2X4 pudiera ser un buen sitio de acción para el tratamiento de algunas enfermedades intestinales donde estén involucrados el dolor crónico, inflamación, cáncer, etc., por esto la importancia de conocer la distribución de este receptor en las células del epitelio intestinal.

III. HIPÓTESIS

Los receptores purinérgicos X_4 se encuentran diferencialmente distribuidos durante la ontogenia del intestino delgado de la rata.

IV. OBJETIVOS

IV.1. General

- Identificar los niveles y zonas de expresión del receptor purinérgico P2X₄ en el intestino delgado de rata neonata y adulta.

IV.2. Específicos

- Implementar las mejores condiciones de la técnica de inmunohistoquímica para el estudio de interés.
- Explorar la marca inmunorreactiva de los receptores a ATP P2X₄, en las porciones proximal y distal del intestino delgado de ratas recién nacidas.
- Conocer la distribución de los receptores purinérgicos P2X₄ en la porción proximal y distal de ratas adultas.
- Comparar los niveles de expresión del receptor P2X₄ en los diferentes segmentos del intestino delgado de rata neonato y adulto.

V. METODOLOGÍA

V.1. Reactivos y materiales

- Solución Buffer de sales de fosfatos (PBS) 10 X
- Solución de para-formaldehído (PFA) al 4 %
- Sacarosa al 30 % en PBS 1 X
- Solución buffer de fosfato con Tritón X-100 (PBT)
- Adhesivo para tejidos Tissue junge
- Cámara húmeda
- Peróxido de hidrógeno al 1 % en PBS 1 X
- Leche al 3 % en PBT
- Anticuerpo primario contra P2X₄ en conejo
- Anticuerpo secundario anticonejo hecho en cabra
- Reactivo ABC (Vectastain, elite ABC kit de laboratorios vector)
- Solución de di-amino bencidina (DAB)
- Material de disección

V.2. Equipos

- Estereoscopio (ZEISS, SstemiDV4)
- Crióstato marca (Leica cM 1850)
- Microscopio con cámara (Leica, DME)
- Plato caliente con agitación
- Balanza analítica
- Refrigerador (4 °C) y Congelador (-20 °C y -70 °C)

V.3. Métodos

V.3.1. Preparación de reactivos y equipos

El buffer PBS 10 X se mantuvo como stock y se preparó pesando los siguientes reactivos: 1 g de cloruro de potasio, 40 g de cloruro de sodio, 1 g de fosfato ácido

de potasio y 5.7 g fosfato de sodio dibásico heptahidratado. La solución PBT se realizó con 995 ml de PBS 1 X y 5 ml de Tritón X-100, en constante agitación hasta que se disolvió por completo.

Para la solución de PFA al 4 % se agregaron poco a poco 20 g de PFA en 500 ml de PBS 1 X, en agitación y calentamiento constante.

Se utilizó una dilución 1:200 en PBT del anticuerpo primario específico (obtenido en conejo) para el receptor P2X₄. Para el anticuerpo secundario (obtenido en cabra anticonejo y asociado a biotina) se utilizó una dilución 1:750 en PBT.

El reactivo ABC y la DAB se prepararon en el momento en que se utilizaron.

La cámara húmeda (Figura 7) consta de un recipiente con el fondo plano y con tapa, que contiene papel absorbente humedecido con agua para evitar que el tejido se seque. Se colocaron encima del papel pipetas de plástico con el fin de sostener las laminillas para que no quedaran en contacto directo con el papel.



Figura 7. Cámara húmeda. En la imagen se muestra una cámara húmeda de vidrio. Después de cada lavado se le colocó una tapa para mantener húmedas las laminillas con los tejidos.

V.3.2. Animales

Se utilizaron ratas Sprague Dawley de edad adulta y recién nacidas, las cuales fueron conservadas a una temperatura de 22 ± 2 °C, con ciclos de luz-obscuridad de 12 h y con acceso a agua y alimento *ad libitum*.

Las ratas PO son las ratas que se utilizaron el mismo día en que nacieron. Las ratas PO fueron decapitadas y las ratas adultas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico 40 mg/Kg vía intraperitoneal, y posteriormente se llevó a cabo la disección de las mismas para extraer del intestino delgado la porción proximal (duodeno), que se reconoce por estar justo después del estómago, y la porción distal (íleon) que se identifica por estar justo antes del colon. Posteriormente se colocaron en PBS.

V.3.3. Extracción y fijación de tejidos

Los tejidos se limpiaron mecánicamente de cualquier residuo de alimento que pudieran tener y se abrieron longitudinalmente con la ayuda de un estereoscopio. Se colocaron en PFA 4 % durante 6, 12 y 24 h a 4 °C, para explorar el tiempo en que se observara la mejor tinción.

V.3.4. Inmunohistoquímica

Los tejidos se transfirieron posteriormente a una solución de sacarosa al 30 % en PBS aproximadamente 1 día, a fin de evitar el daño del tejido al congelarse. Después se colocaron en recipientes de aluminio donde se cubrieron con tissue junge (figura 8), cuidando que las vellosidades quedaran hacia abajo.

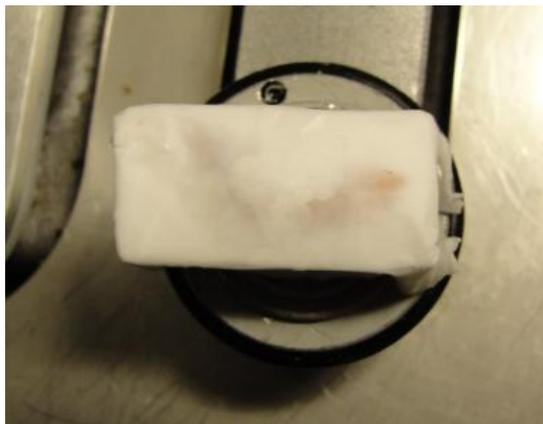


Figura 8. Tejido en tissue junge. En la imagen se muestra una porción de intestino de rata cubierta con tissue junge y congelado a -70 °C por lo que se encuentra en estado sólido.

Después se congelaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y con la ayuda del crióstato (Figura 9) y se realizaron cortes longitudinales del tejido con un espesor de $12\text{ }\mu\text{m}$, después se colocaron en laminillas y se guardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

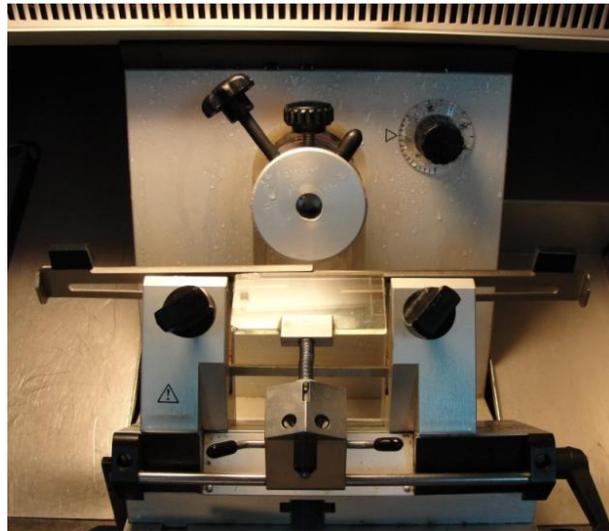


Figura 9. Crióstato marca Leica. En esta imagen se muestra el interior de un crióstato, donde se encuentra la navaja y el soporte donde se cortaron los tejidos.

Para llevar a cabo los experimentos de inmunohistoquímica (Figura 10), las laminillas fueron sometidas a tres lavados con PBS 1X de 10 minutos cada uno, y se dejaron reposar en la cámara húmeda. Después se realizó un bloqueo con una solución de peróxido de hidrógeno al 1 %, posteriormente se realizaron otros tres lavados con PBS 1X y se incubaron con una solución de leche al 3 % en PBT durante 2 horas. Se volvieron a lavar 3 veces con PBT y se aplicaron $300\text{ }\mu\text{l}$ del anticuerpo primario dirigido contra el receptor P2X_4 , obtenido en conejo a una dilución 1:200 en PBT. Se incubó toda la noche en la cámara húmeda. Al día siguiente las laminillas se lavaron tres veces con PBT y se les aplicó $500\text{ }\mu\text{l}$ del anticuerpo secundario (anti-conejo hecho en cabra acoplado a biotina) en una dilución 1:750 y se incubó posteriormente por dos horas, después se volvieron a realizar 3 lavados con PBT de 10 minutos cada uno. Se amplificó con el complejo ABC marca Vectastain Elite que constaba de dos reactivos: el reactivo A que contenía a la avidina y el reactivo B que contenía la enzima peroxidasa asociada a

biotina; estos reactivos se mezclaron en una proporción 1:1 y se le colocaron a las laminillas con el tejido dejándolo incubar durante 30 minutos. Después se revelaron con una solución de di-aminobencidina (DAB) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2). La enzima peroxidasa oxida el peróxido de hidrogeno liberando oxígeno, este oxígeno liberado oxida la DAB que es una sustancia que al oxidarse se precipita y adquiere un color marrón que se puede observar. Finalmente se observaron los tejidos marcados en un microscopio de campo claro con objetivos de 10 X y 40 X, donde se estudió la marca inmunorreactiva visible (Ausubel y col., 2008; Maestú y col., 2008).

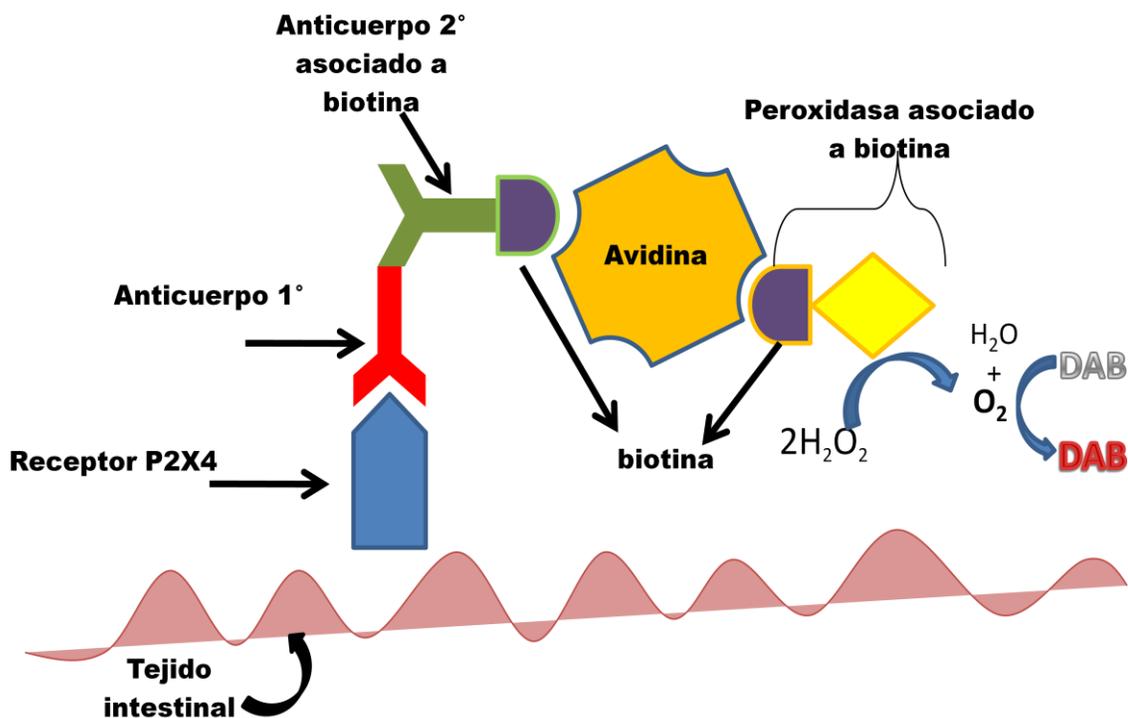


Figura 10. Método de inmunoperoxidasa amplificada. El primer anticuerpo se une al epítipo del receptor específico P2X₄ que se encuentra en el tejido intestinal, el segundo anticuerpo asociado a biotina reconoce al primer anticuerpo y se une a éste. La avidina contiene cuatro sitios de reconocimiento muy específicos para la biotina a la cual se une. La peroxidasa asociado a biotina se une a cualquiera de los tres epítipos restantes de la avidina y por esto se amplifica la señal, finalmente peroxidasa libera oxígeno a partir de peróxido de hidrogeno, y este a su vez oxida a la DAB dando una coloración café detectable en el microscopio.

Se evaluaron algunos parámetros para obtener mejores resultados en las pruebas de inmunohistoquímica, como es el tiempo de fijación en para-formaldehído PFA,

que es una sustancia que sirve para fijar las proteínas al tejidos y mantenerlas íntegras durante el tratamiento que se le dé al tejido. También se evaluó el tipo de técnica a utilizar, que se muestran los parámetros evaluados en el Cuadro 1, ya fuera inmunohistoquímica amplificada (Figura 10) o sin amplificar (Figura 11).

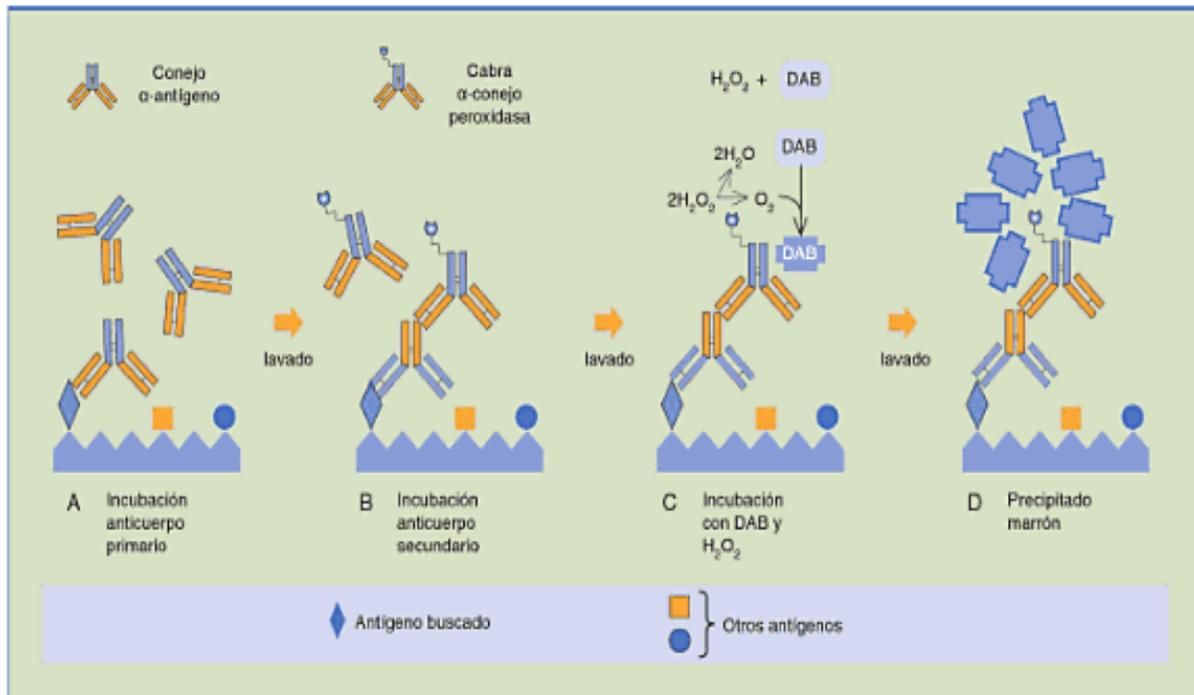


Figura 11. Técnica de marcaje inmunocitoquímico A) el tejido se incuba con un anticuerpo primario donde B) un anticuerpo secundario se une al primario. El anticuerpo secundario C) se encuentra unido a una peroxidasa de rábano que oxida el peróxido de hidrogeno liberando oxígeno. Se le añade al tejido H₂O₂ y DAB que es una sustancia que al oxidarse se precipita y adquiere un color marrón (Maestú y col., 2008).

V.3.5. Fotografía

Las fotografías de las secciones de la inmunohistoquímica se tomaron con una cámara digital AxioCam MRC (Zeiss) acoplada a un microscopio Axioplan (Zeiss). Las imágenes fueron importadas, recopiladas y editadas gracias al software KS-300.

V.4. Diseño de experimentos

En el Cuadro 1 se muestra el resumen de las inmunohistoquímicas que se realizaron con diferentes variables y condiciones experimentales.

Cuadro 1. Diseño de experimento.

Edad de la rata	Porción del intestino delgado	Tiempo de fijación en PFA (horas)	Técnica de inmunohistoquímica
Neonata (PO)	Proximal	6	Amplificada
		12	
	Distal	24	Sin amplificar
Adulta (Ad)	Proximal	6	Amplificada
		12	
	Distal	24	Sin amplificar

VI. RESULTADOS

Se realizaron estudios preliminares para conocer las condiciones óptimas de la inmunotinción. Dentro de las condiciones que se evaluaron fue el tiempo de exposición al para-formaldehído (PFA). Los tejidos se mantuvieron a 6, 12 y 24 horas en PFA al 4 % (figura 12) y la mejor marca inmunorreactiva (MIR) se observó a las 6 horas de fijación del tejido con PFA, por lo que se prosiguió a usar este parámetro en las siguientes pruebas de inmunohistoquímica.

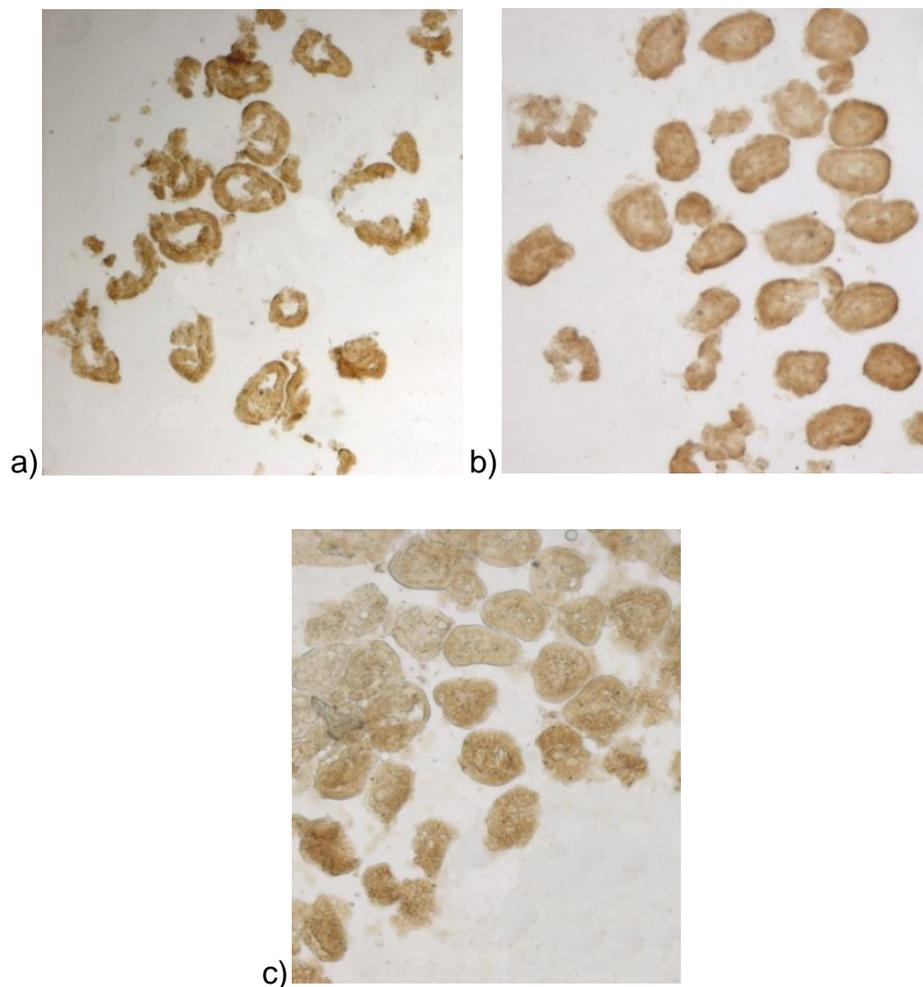


Figura 12. Tiempo de fijación de los tejidos en paraformaldehído. En las imágenes se muestran tejidos de intestino delgado el cual se sometió a diferentes tiempos en PFA, el tejido de la imagen a) se fijó durante 6 hrs. El tejido de la b) durante 12hrs. y el de la c) durante 24 hrs. Se puede observar que la marca es más puntual e intensa mientras menor fue el tiempo en PFA. Las fotografías pertenecen a ratas PO y fueron tomadas a un aumento de 10X.

El siguiente parámetro que se evaluó fue la técnica de marcaje inmunohistoquímico: uno basado en la reacción de peroxidasa sin amplificar, como se mostró en la Figura 11, en donde el anticuerpo secundario asociado a la peroxidasa de rábano, oxida directamente al DAB; otro basado en la reacción de peroxidasa amplificada mostrado en la Figura 9. Se observó una mayor y mejor señal utilizando la técnica de peroxidasa amplificada respecto a la técnica de peroxidasa sin amplificar (Figura 13).

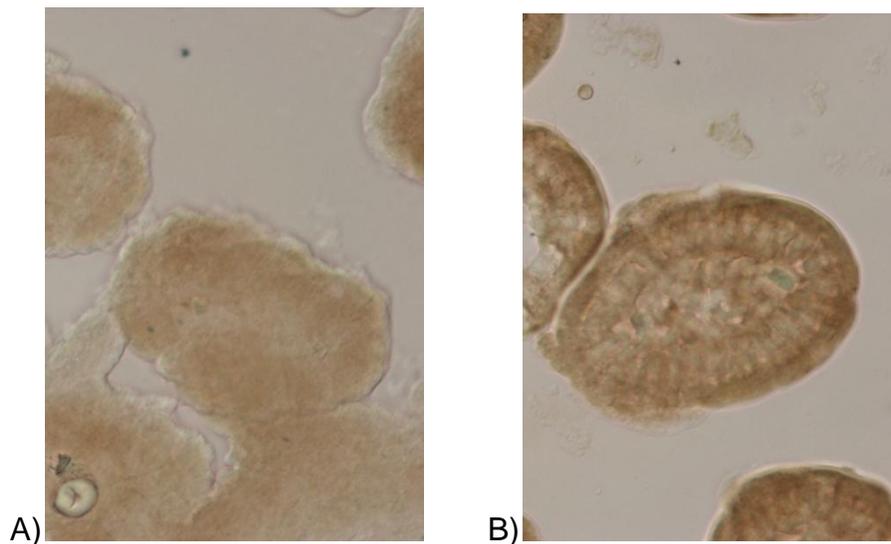


Figura 13. Comparación entre inmunohistoquímica sin amplificar y amplificada. En la figura A) se muestra al tejido con la técnica inmunohistoquímica sin amplificar, donde se observa una señal más difusa y menos intensa que en B) donde se utilizó la técnica de peroxidasa amplificada.

Se prosiguió a realizar el montaje de los tejidos de intestino delgado, donde se utilizaron como blancos a tejidos a los que se les realizó el mismo tratamiento que a las muestras excepto la adición del primer anticuerpo. Los blancos sirvieron para observar la especificidad del anticuerpo secundario. Este anticuerpo secundario resultó ser bastante específico al unirse solo al primer anticuerpo en las muestras, ya que no se observó marca inmunoreactiva en los blancos (Figura 14 y 15), además se pudo distinguir diferencias en las morfologías entre las vellosidades del intestino de ratas neonatas, que resultaron ser redondas y pequeñas, en comparación con las vellosidades del intestino de ratas adultas, que fueron alargadas y de mayor tamaño.

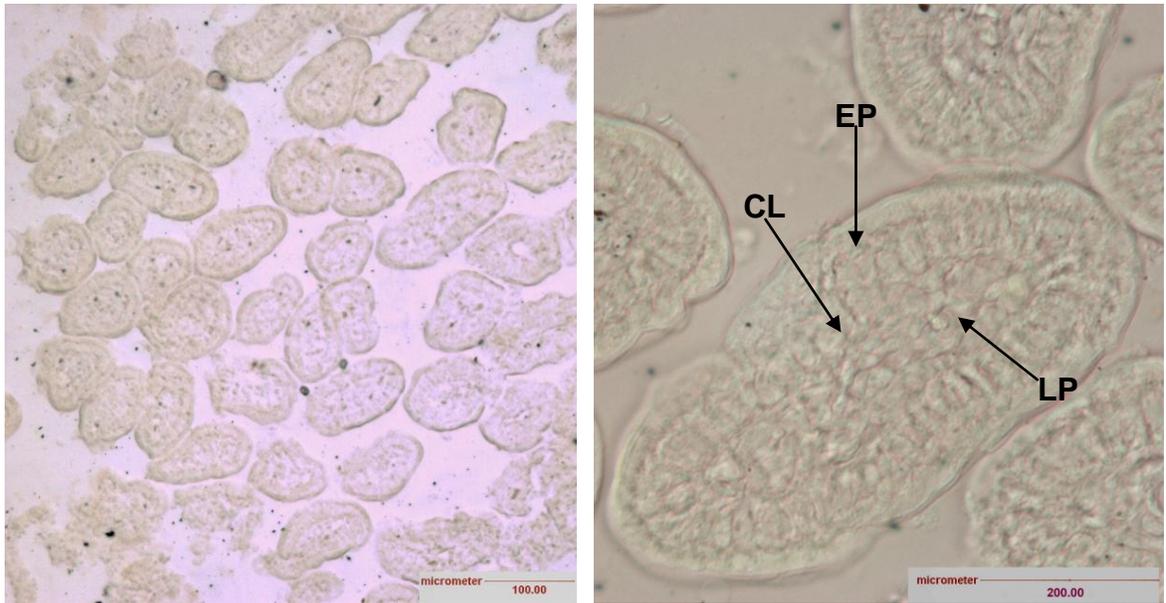


Figura 14. Blancos de ratas PO. Se muestran las vellosidades intestinales de rata neonata, donde se pueden diferenciar los distintos tipos de tejido: epitelio cilíndrico (EP), canal linfático (CL) y lámina propia (LP). Además se observa que no hay MIR en ninguna porción de las vellosidades. La imagen de la izquierda se encuentra con una ampliación en microscopio óptico de 10X y la de la derecha de 40X.

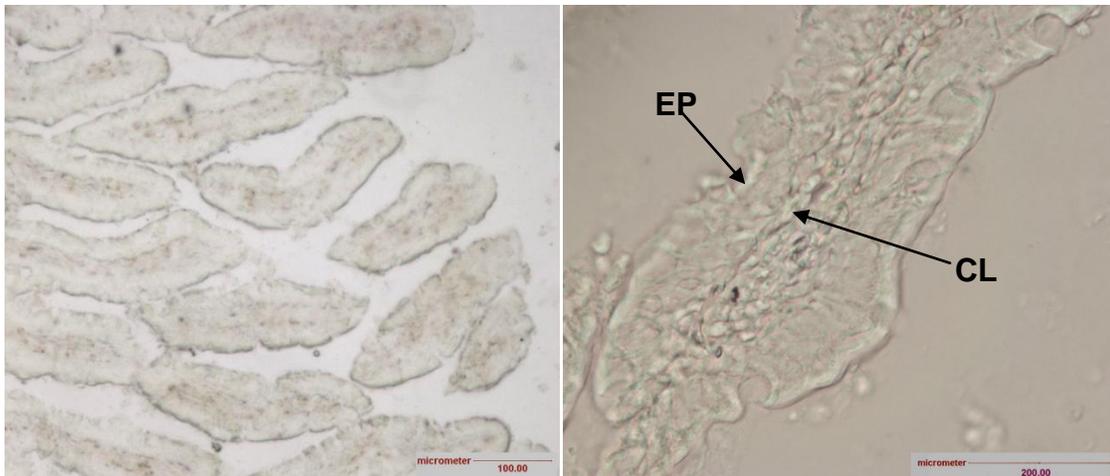


Figura 15. Blancos de ratas adultas. En estas imágenes se encuentran cortes transversales de las vellosidades del intestino delgado de rata adulta. No hubo marca inmunoreactiva y también se podían observar los diferentes tejidos, tanto en el epitelio cilíndrico (EP) como el canal linfático (CL). A la izquierda se muestra una ampliación de 10X y a la derecha de 40X.

En cada vellosidad de los blancos se pudo observar también los diferentes tipos de tejido (Figura 14 y 15) como: el epitelio simple cilíndrico, que consta de

enterocitos principalmente y se encuentra en la superficie de la vellosidad, un canal linfático en el centro de la vellosidad, que también se conoce como quilífero central y una de sus funciones es transportar los agentes del sistema inmunológico, la lámina propia que es tejido conectivo y se encuentra entre la capa de epitelio y el canal linfático, aunque también aquí se encuentran muchos linfocitos.

Consecuentemente se realizaron las pruebas inmunohistoquímicas, de las porciones proximales y distales de intestino delgado de rata neonata y adulta para observar la distribución del receptor P2X₄ en las diferentes zonas del intestino delgado.

En las vellosidades intestinales de ratas neonatas se observaron diferencias entre la porción proximal y distal. En la porción proximal (Figura 16) se observó que la MIR se encontraba principalmente en la chapa estriada apical que se encuentra en la superficie de las vellosidades y está conformada mayormente por enterocitos.

En la porción distal del intestino delgado de ratas PO (Figura 17) se observó que el lugar de la MIR difería, observándose principalmente en el centro de la vellosidad, que corresponde al canal linfático de las mismas.

En cuanto a las vellosidades intestinales de las ratas adultas se observó una marca muy diferente a la encontrada en las ratas PO. Esta marca se encontró en la lámina propia de las vellosidades que es tejido conectivo y se encontró tanto en la porción proximal (Figura 18) como en la distal (Figura 19) aunque en la porción distal la marca fue un poco más intensa. La marca fue puntual pero menos intensa respecto a las ratas PO en ambas porciones.

En el Cuadro 2 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en las diferentes porciones del intestino delgado de rata adulta o neonata.

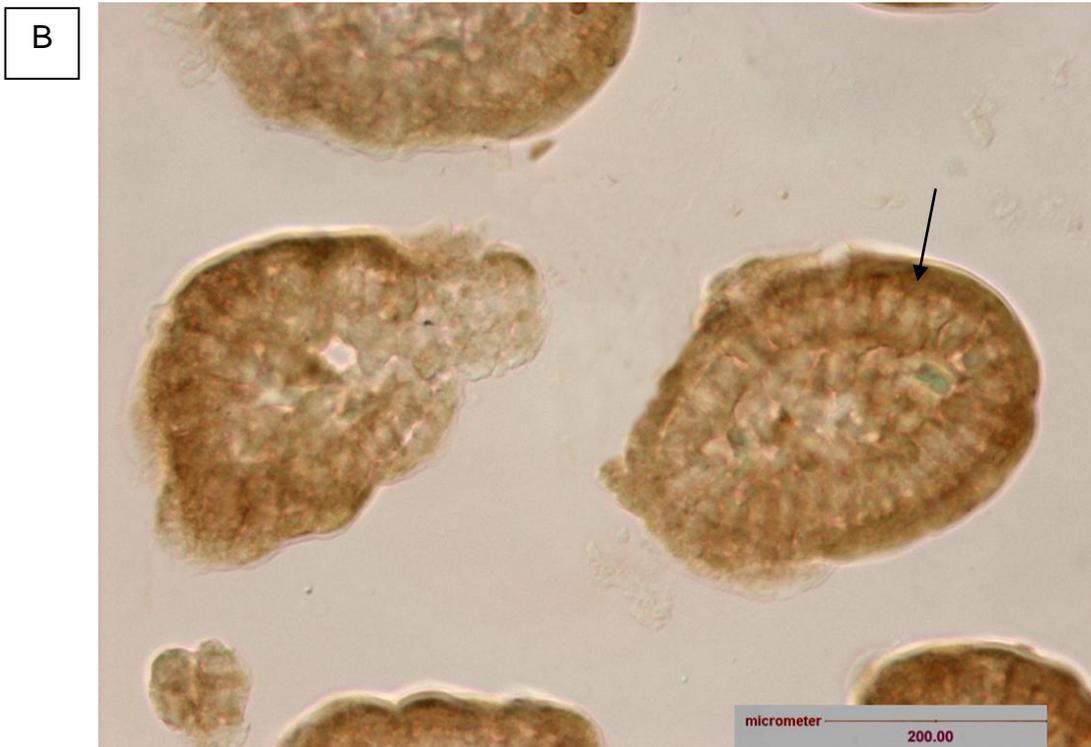
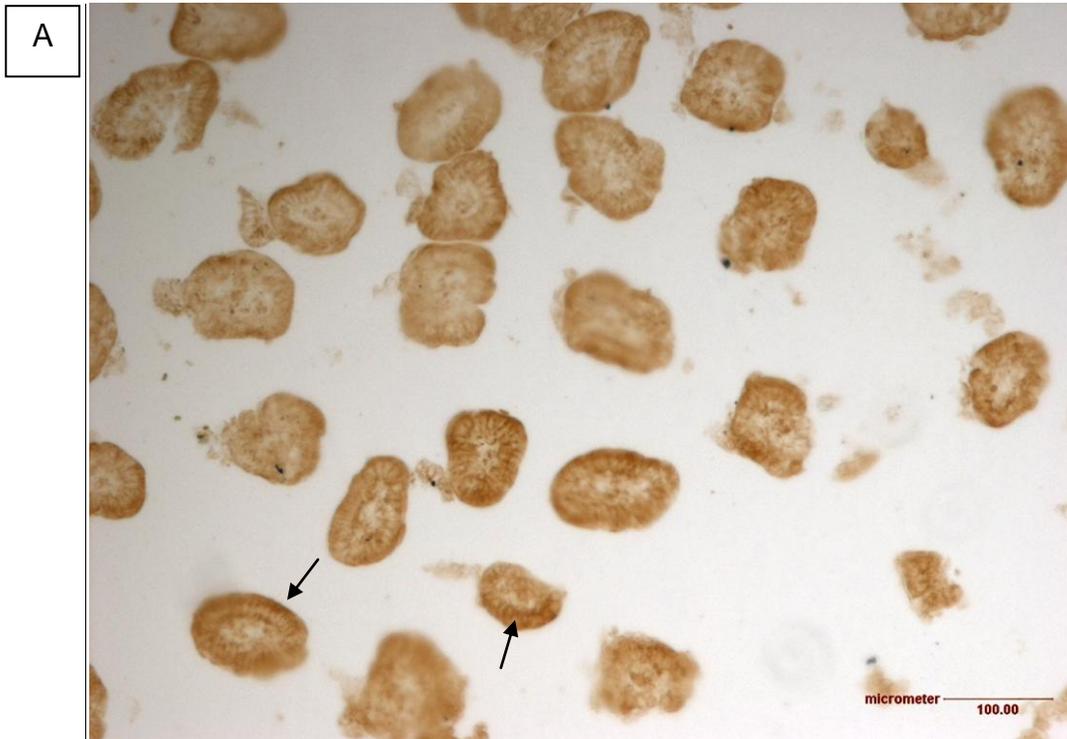


Figura 16. Porción proximal de intestino delgado de ratas PO. En la imagen se puede observar la MIR en las orillas de las vellosidades que corresponden a la chapa estriada conformada por los enterocitos, la marca es intensa. En la figura A se muestra a un aumento de 10X y en la B de 40X.

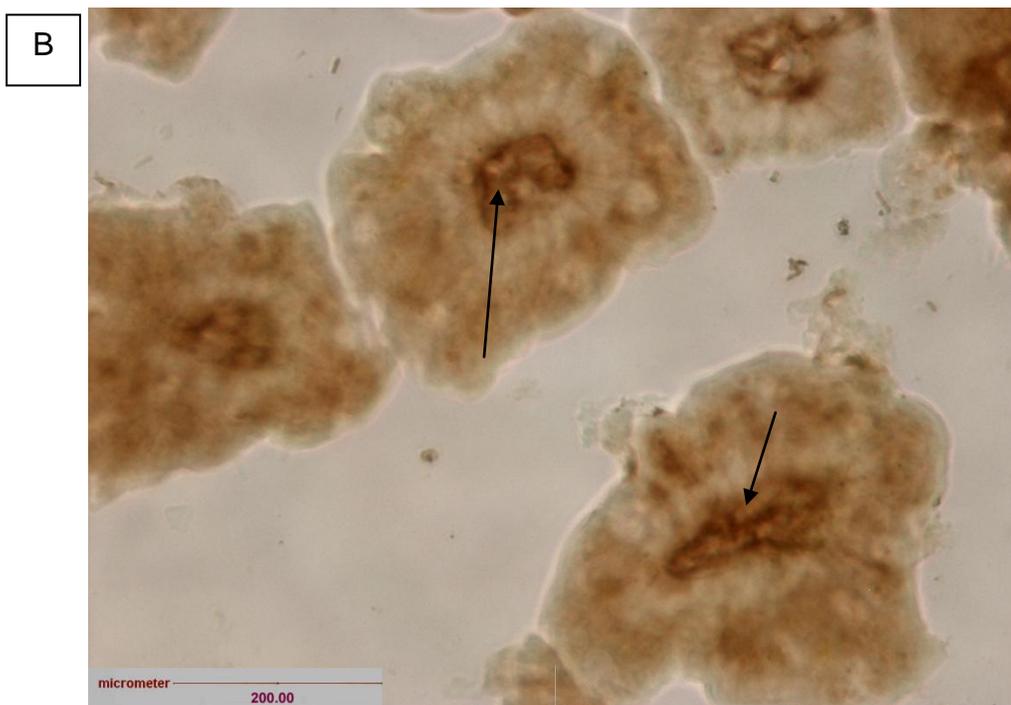
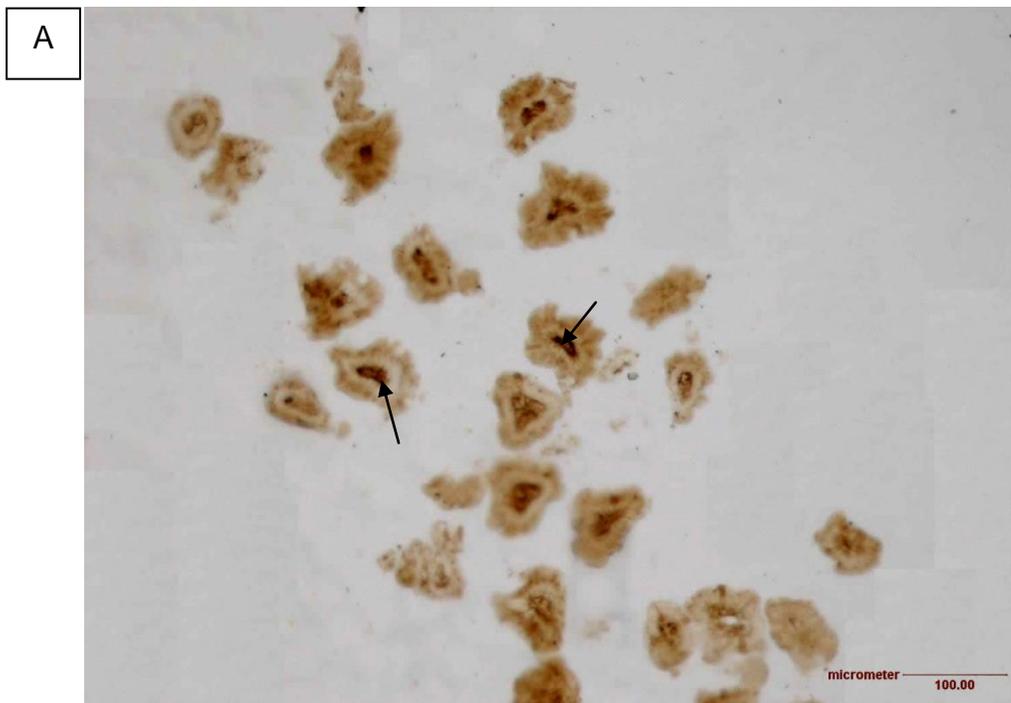
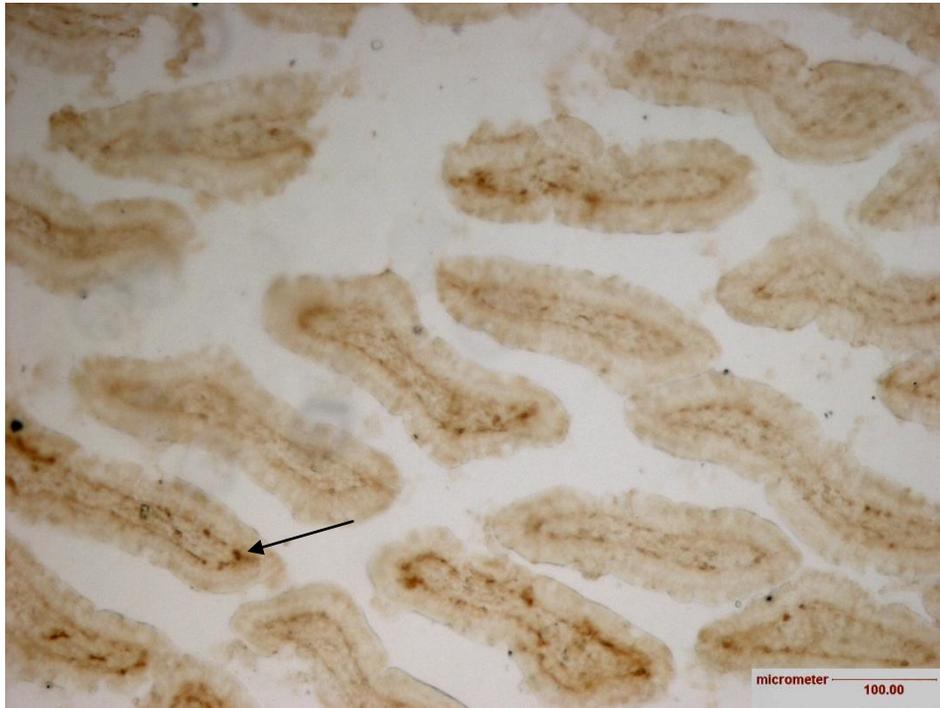


Figura 17. Porción distal de intestino de ratas PO. La MIR en esta porción distal del intestino, se localizó mayoritariamente y de una manera intensa, en el centro de la vellosidad, correspondiendo al canal linfático de la misma. Aunque también se encontró MIR en la lámina propia de los enterocitos, pero esta fue de menor intensidad. En la figura A se muestra a un aumento de 10X y en la B de 40X.

A



B

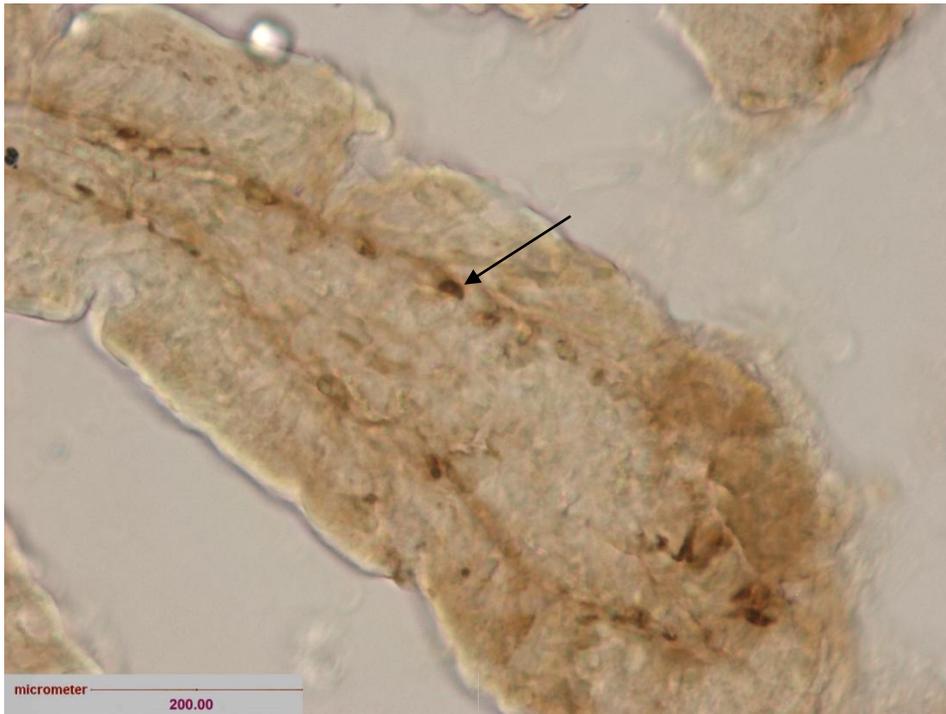


Figura 18. Porción proximal de ratas adultas. La MIR se muestra en las flechas, donde se observa que se encuentra con mayor intensidad en la lámina propia que es tejido conectivo que se encuentra entre el epitelio de la superficie y el canal linfático. En la figura A se encuentra en un aumento de 10X y en la B de 40X.

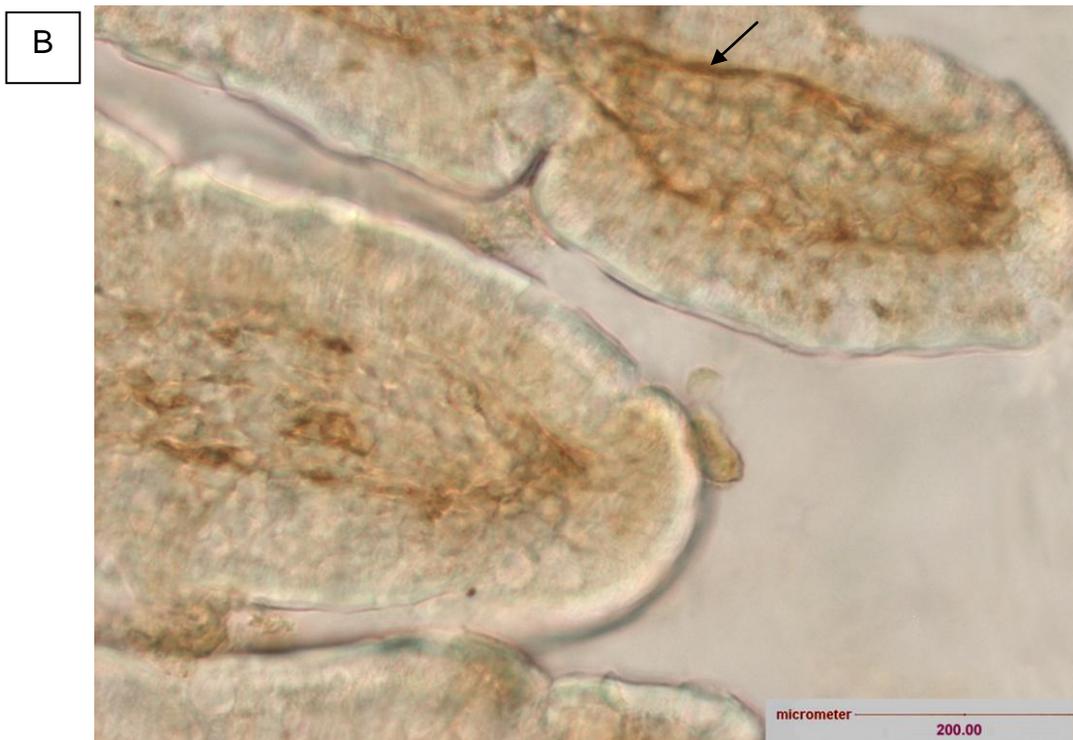
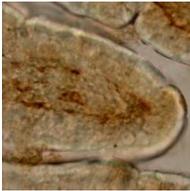


Figura 19. Porción distal de intestino de rata adulta. La MIR en esta porción distal se localizó principalmente en la lámina propia de las vellosidades y resultó ser ligeramente más intensa que en la porción distal. En la imagen de arriba se muestra un aumento de 10X y en la de debajo de 40X.

Cuadro 2. Resumen de resultados. En el siguiente cuadro se muestran todos los resultados obtenidos de los diferentes tejidos y edades de la rata analizados.

Edad de la rata	Porción del intestino delgado	Marca inmunohistoquímica		
		Imagen	Tejido	Intensidad
Neonata (PO)	Proximal		Chapa estriada (enterocitos)	+++
	Distal		Canal linfático	+++
Adulta (Ad)	Proximal		Lámina propia (tejido conectivo)	+
	Distal		Lámina propia (tejido conectivo)	++

*En la intensidad + es ligeramente intenso, ++ es moderadamente intenso y +++ es muy intenso.

VII. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo concuerdan con algunos reportes previos, en los que se publica que los receptores P2X están en células de la mucosa epitelial del intestino, en glándulas gástricas y que el ATP modula la secreción intestinal (Burnstock, 2008), lo que sugiere que los receptores purinérgicos P2X están involucrados en procesos fisiológicos del intestino. También se han hecho propuestas acerca de la relación de estos receptores purinérgicos con la motilidad y sensibilidad intestinal, vía fibras motoras extrínsecas y nocicepción vía fibras sensitivas extrínsecas (Burnstock, 2009c).

Los receptores purinérgicos pueden ser un buen blanco de acción farmacológica para combatir padecimientos gastrointestinales. Esto se relaciona con reportes en los que se han usado psicotrópicos, como los antidepresivos tricíclicos (TCAs), los cuales modifican la concentración de calcio intracelular e inhiben el dolor gastrointestinal. Se ha visto que los TCAs también inhiben la función del receptor P2X₄ en células humanas, siendo el TACs más específico y con mayor efecto la paroxetina (Nagata y col., 2009), lo que permite proponer que al inhibir los receptores p2X₄ se podría inhibir también el dolor neuropático, y que conduciría a lograr efectos analgésicos (Drossman, 2008).

Con base en lo anterior, en el presente estudio se investigaron diferentes zonas de expresión del receptor purinérgico P2X₄ en la mucosa del intestino delgado de ratas durante la ontogenia mediante técnicas de inmunohistoquímica, para constatar la presencia de este receptor y así contemplarlo como un blanco farmacológico para enfermedades o padecimientos gastrointestinales.

Al realizar las inmunohistoquímicas se utilizó paraformaldehído (PFA) que sirve para fijar las proteínas del tejido, el cual actúa formando puentes reversibles entre las proteínas estructurales y solubles del tejido, insolubilizándolas e inactivando las enzimas que darían lugar a la autólisis celular, con lo que se preserva la estructura del tejido, además de conservar su antigenicidad (Maestú y col., 2008). Los resultados de este trabajo sugieren que es importante estandarizar los tiempos de

fijación para evitar que un exceso de puentes proteicos formados disminuyan la marca. Otra posibilidad es que la MIR que se observó mejor a las 6 horas (Figura 10), se debiera a que el PFA precipitó algunas de las proteínas en los tiempos más prolongados de 12 y 24 horas, lo que originó una señal más difusa y menos específica a la hora de añadir los anticuerpos y el revelador.

La MIR encontrada en las vellosidades tanto de ratas adultas como de ratas PO, revela la presencia del receptor purinérgico P2X₄, esto es consistente con investigaciones donde se ha encontrado la presencia de receptores purinérgicos P2X de subtipo 1, 2 y 3 en el tracto gastrointestinal de ratones a diferentes etapas de desarrollo respecto a su edad (Giaroni y col., 2006), por las mismas técnicas utilizadas en el presente trabajo. También estos resultados confirman otros trabajos realizados por técnicas de Northern Blot en epitelios como el respiratorio, uterino e intestinal, en los que se reportó que el receptor P2X₄, estaba presente (Tanaka y col., 1996).

La MIR para los receptores P2X₄ localizada en el intestino proximal de ratas PO, confirma que estos receptores se encuentran presentes en los enterocitos localizados en la superficie o capa más externa de las vellosidades, las cuales contienen un epitelio cilíndrico simple (Ross y col., 1997), la principal función de los enterocitos es la absorción de alimentos por lo que es posible que la MIR de los receptores P2X₄ encontrados aquí, pudieran estar involucrados en la regulación de enzimas para la digestión de los alimentos; esta zona también se encuentra provista regularmente de células caliciformes que tienen la función de secretar mucosa (Junqueira y Carneiro, 2005) y también se localiza una zona hermética entre la luz intestinal y los tejidos (*zonulae occludentes*), que es donde se permite la movilización de tejidos a través de transporte activo realizado por bombas de sodio, las cuales originan que salga agua a la luz intestinal y el alimento siga su trayectoria (Ross y Pawlina, 2008). La secreción de agua a la luz intestinal podría estar relacionada con la movilización de iones a través de los receptores P2X₄, ya que los receptores P2X son canales iónicos selectivos a cationes, entre ellos el

sodio, y podrían ser parte de este proceso de secreción de agua a la luz intestinal, con lo que se podrían prevenir padecimientos intestinales como el estreñimiento.

En la porción distal del intestino delgado de ratas neonatas se observó la MIR en el canal linfático de las vellosidades, este dato podría relacionarse con la acción del receptor P2X₄ en el sistema inmune o en el proceso de inflamación, ya que en previas investigaciones también se ha encontrado el receptor P2X₄ en células inflamatorias como los macrófagos y se ha utilizado este receptor para el tratamiento de dolor de inflamación (Sim y col., 2007; Tsuda y col., 2009). También dentro del canal linfático se llegan a encontrar células musculares lisas (Ross y Pawlina, 2008) que permiten el movimiento de las vellosidades y se conectan hasta la muscular de la mucosa (Fox, 2003), donde el receptor P2X₄ pudiera estar involucrado en la motilidad de las vellosidades intestinales.

En el intestino delgado de ratas adultas se observó la marca del receptor P2X₄ en la lámina propia o tejido conectivo entre el canal linfático y la chapa estirada, esta zona se encuentra provista diversas células inmunológicas como células plasmáticas, linfocitos, histiocitos, entre otras; llevándonos de nuevo a pensar que realmente este receptor pudiera estar relacionado con procesos inmunológicos como el dolor e inflamación, que corroboraría estudios en los que se demuestra que el receptor P2X₄ al ser activado incrementa los niveles de prostaglandinas, y estas a su vez el dolor y la inflamación (Jakobsson, 2010; Ulmann y col, 2010), lo cual nos hace pensar que este receptor podría ser un buen blanco de acción para tratar padecimientos intestinales en personas adultas. el encontrar un fármaco que actuara sobre este receptor pudiera ser una vía alterna para tratar el dolor e inflamación, debido a que los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) causan diversos efectos secundarios como gastritis y úlceras gástricas.

Es de importancia recalcar el objetivo de haber realizado la búsqueda del receptor P2X₄ en diferentes edades de la rata (neonata y adulta), ya que diferentes trastornos gastrointestinales funcionales (FGIDs) se pueden encontrar en diferentes intervalos de edad, si la patología pertenece al adulto o a neonato/infante. La

diferencia de las patología radica principalmente en las diferencias existentes en la ingesta de alimentos y en el desarrollo gastrointestinal en las diferentes etapas del humano (Drossman, 2006). La MIR del receptor P2X₄ se encontró en los neonatos en el canal linfático y en los enterocitos, por lo que se puede sugerir que el receptor P2X₄ pudiera estar involucrado en patologías comunes en los neonatos como son la regurgitación infantil, inflamación intestinal, cólico infantil, entre otros.

VIII. CONCLUSIONES

En el presente estudio se lograron implementar las condiciones para el método de inmunohistoquímica donde la MIR fuera mejor. Se observó la marca inmunoreactiva del receptor P2X₄ en las porciones proximal y distal del intestino delgado de rata, y se identificó su distribución en las diferentes tipos de células de las vellosidades intestinales, también se logró hacer una comparación en los niveles de expresión del receptor purinérgico P2X₄ entre el intestino delgado de rata neonata con el de rata adulta.

Los resultados obtenidos en esta investigación, sugieren que el receptor purinérgico P2X₄ podría ser un buen blanco farmacológico para padecimientos intestinales de neonatos como es estreñimiento, mala absorción de los alimentos o infecciones intestinales, como también para padecimientos en adultos, ya que se observó la presencia de este receptor en las vellosidades intestinales de rata y también se ha visto en otros estudios que está involucrado en procesos de señalización de dolor, de secreción de enzimas, de movimiento, etc.

A futuro podrían realizarse más estudios acerca de los receptores a ATP (P2X₄) en los que se pudieran localizar en diferentes tipos de tejidos del intestino delgado (en la musculatura y plexos de neuronas) el nivel de expresión de este receptor y así asociarlo a alguna función en específico como la locomoción, sensibilidad o secreción. Además también se pudieran realizar estudios farmacológicos en los que se monitoreara la actividad relajante del músculo intestinal inhibiendo o potenciando la actividad de los receptores P2X₄. En especial este receptor P2X₄ resulta ser de gran interés debido a que es el mejor candidato, entre los receptores purinérgicos, en provocar apoptosis (Solini y col., 2007) y se ha visto su ausencia provoca disminución en la producción de prostaglandinas y en la hipersensibilidad (Jakobsson, 2010; Ulmann y col, 2010), por lo que encontrar fármacos específicos que actuaran sobre este receptor pudieran dar resultados interesantes como combatir cáncer, dolor e inflamación.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2006.** Introducción a la biología celular. 2a ed. Médica Panamericana, Buenos Aires: 360-533.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. 2008.** Current Protocols in Molecular Biology. Vol. 14.2.1-14.2.4:
- Brake, A.J., Wagenbach, M.J., Julius, D. 1994.** New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. Nature. Vol. 371: 519-523.
- Burnstock, G. 2008.** The journey to establish purinergic signalling in the gut. Neurogastroenterology and motility. Vol. 20: 8-19.
- Burnstock, G. 2009a.** Purinergic cotransmission. Experimental Physiology. Vol. 94: 20.
- Burnstock, G. 2009b.** Purinergic signalling: past, present and future. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Vol. 42: 3-8.
- Burnstock, G. 2009c.** Purinergic mechanosensory transduction and visceral pain. Molecular Pain. Vol. 5: 69.
- Bustamante, Z.E. 2007.** El sistema nervioso, desde las neuronas hasta el cerebro humano. 1a ed. Editorial Universidad de Antioquia. Colombia: 36-99.
- Commons, C. 2006.** <http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Synapsellustration.png>. 13/septiembre/2010.
- Córdova, A. 2003.** Fisiología dinámica. 1a ed. Masson, Barcelona: 488-492.
- Crain, J.M., Nikodemova, M., Watters, J.J. 2009.** Expression of P 2 nucleotide receptors varies with age and sex in murine brain microglia. Journal of Neuroinflammation. Vol. 6: 24.
- Drossman, A.D. 2008.** Trastornos Gastrointestinales Funcionales ROMA III. 3a ed. México: Tomo 1, 200-2010.
- Flórez, J. 2003.** Farmacología Humana. 4a ed. Masson, Barcelona: 19-41, 221-227.
- Fox, S.I. 2003.** Fisiología humana. 10a ed. McGrawHill, Barcelona: 606.

- Furuzono, S., Nakayama, S., Imaizumi, Y. 2005.** Purinergic modulation of pacemaker Ca^{2+} activity in interstitial cells of Cajal. *Neuropharmacology*. Vol. 48: 264-273.
- Galligan, J.J. 2004.** Enteric P2X receptors as potential targets for drug treatment of the irritable bowel syndrome. *British journal of pharmacology*. Vol. 141: 1294-1302.
- Giaroni, C., Knight, G.E., Zanetti, E., Chiaravalli, A.M., Lecchini, S., Frigo, G., Burnstock, G. 2006.** Postnatal development of P2 receptors in the murine gastrointestinal tract. *Neuropharmacology*. Vol. 50: 690-704.
- Hall, G., Guyton, A.C. 2001.** *Tratado de Fisiología Médica*. 10a ed. McGrawHill Interamericana, España: 626-629.
- Jackobsson, P. 2010.** How macrophages mediate inflammatory pain via ATP signaling. *Nature Reviews of Rheumatology*. Vol. 6: 679-681.
- Junqueira, L., Carneiro, J. 2005.** *Histología Básica*. 6a ed. Masson, Barcelona: 469-492.
- Kawate, T., Michel, J.C., Birdsong, W.T., Gouaux, E. 2009.** Crystal structure of the ATP-gated P2X4 ion channel in the closed state. *Nature*. Vol. 460: 592-597.
- Kierszenbaum, A. 2008.** *Histología y biología celular: introducción a la anatomía patológica*. 2a ed. Elsevier Mosby, Barcelona: 453-464.
- Langer, S.Z., Pinto, J.E. 1976.** Possible involvement of a transmitter different from norepinephrine in the residual responses to nerve stimulation of the cat nictitating membrane after pretreatment with reserpine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Vol. 196: 697.
- Lustig, K.D., Shiau, A.K., Brake, A.J., Julius, D. 1993.** Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 90: 5113.
- Macarulla, J.M., Goñi, F.M. 1994.** *Bioquímica Humana*. 2a ed. Reverté, Barcelona: 459-476.
- Maestú, F., Ríos, M., Cabestrero, R. 2008.** *Neuroimagen Técnicas y Procesos Cognitivos*. 1ª ed. Elsevier Masson, Barcelona: 3-4.

Monro, R.L., Bertrand, P.P., Bornstein, J.C. 2004. ATP participates in three excitatory postsynaptic potentials in the submucous plexus of the guinea pig ileum. *The Journal of physiology*. Vol. 556: 571.

Nagata, K., Imai, T., Yamashita, T., Tsuda, M., Tozaki-Saitoh, H., Inoue, K. 2009. Antidepressants inhibit P2X₄ receptor function: a possible involvement in neuropathic pain relief. *Molecular Pain*. Vol. 5: 20.

North, R.A., Surprenant, A. 2000. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Vol. 40: 563-580.

Pearson, G. 2008. www.vi.cl/foro/topic/8200-sistema-digestivo/. 23/junio/2010.

Redolar, D., Ripoll, D.R. 2010. *Fundamentos de Psicobiología*. 1a ed. UOC, Barcelona: 210-220.

Ross, M.H., Reith, E.J., Romrell, L.J. 1997. *Histología*. 3a ed. Medicina Panamericana, Buenos Aires: 450-463.

Ross, M.H., Pawlina, W. 2008. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. 5a ed. Medica Panamericana, Buenos Aires: 582-594.

Sim, J.A., Park, C.K., Oh, S.B., Evans, R.J., North, R.A. 2007. P2X₁ and P2X₄ receptor currents in mouse macrophages. *British journal of pharmacology*. Vol. 152: 1283-1290.

Solini, A., Santini, E., Chimenti, D., Chiozzi, P., Pratesi, F., Cuccato, S., Falzoni, S., Lupi, R., Ferrannini, E., Pugliese, G. 2007. Multiple P2X receptors are involved in the modulation of apoptosis in human mesangial cells: evidence for a role of P2X₄. *American Journal of Physiology- Renal Physiology*. Vol. 292: F1537.

Tanaka, J., Murate, M., Wang, C.Z., Seino, S. 1996. Cellular distribution of the P2X₄ ATP receptor mRNA in the brain and non-neuronal organs of rats. *Archives of histology and cytology*. Vol. 59: 485-490.

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*. Vol. 5: 28.

Ulmann, L., Hiebec, H., Rassendren, F. 2010. P2X₄ receptors mediate PGE₂ release by tissue-resident macrophages and initiate inflammatory pain. *the EMBO journal*. Vol. 29: 14.

Zimmermann, H. 2000. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. Vol. 362: 299-309.