



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DISTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES P2X₄ DURANTE LA
ONTOGENIA DEL INTESTINO DE RATA POR
INMUNOFLUORESCENCIA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MARÍA MAGDALENA ERENDIRA GONZÁLEZ TELLO

DIRIGIDA POR

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DISTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES P2X₄ DURANTE LA
ONTOGENIA DEL INTESTINO DE RATA POR
INMUNOFLOURESCENCIA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MARÍA MAGDALENA ERENDIRA GONZÁLEZ TELLO

DIRIGIDA POR

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SINODALES

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER _____
DIRECTOR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA _____
SINODAL

M. en C. DAVID GUSTAVO GARCÍA GUTIÉRREZ _____
SINODAL

M. en C. KARLA MARGARITA PADILLA OLVERA _____
SINODAL

ÍNDICE

	Página
Índice	I
Índice de figuras	iii
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Sistema nervioso	1
1.2. Sistema nervioso central	5
1.3. Sistema nervioso periférico	9
1.3.1. Sistema nervioso somático	9
1.3.2. Sistema nervioso autónomo	10
1.3.3. Sistema nervioso entérico	11
1.4. Ontogenia del intestino delgado	13
1.5. Intestino delgado	16
1.6. Mucosa	17
1.7. Velloidades	18
1.8. Criptas de Lieberkühn	19
1.9. Receptores celulares	23
1.10. Receptores purinérgicos en el intestino delgado	24
1.10.1. Receptores P1	26
1.10.2. Receptores P2	26
1.10.3. Receptores P2X	27
2. HIPÓTESIS	33
3. OBJETIVOS	34
3.1. General	34

3.2. Específicos	34
4. METODOLOGÍA	35
4.1. Materiales y reactivos	35
4.1.1. Animales	35
4.1.2. Reactivos	35
4.1.3. Materiales	35
4.1.4. Equipos	36
4.2. Métodos	36
4.2.1. Extracción y manipulación de tejidos	36
4.2.2. Inmunohistoquímica para los receptores purinérgicos P2X ₄	37
5. RESULTADOS	38
6. DISCUSIÓN	44
7. CONCLUSIONES	49
8. REFERENCIAS	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura de dos tipos de neuronas	2
2	Tres tipos distintos de neuronas	4
3	Médula espinal	6
4	El sistema nervioso central está formado por el encéfalo y la médula espinal	7
5	El diencefalo se encuentra entre el tronco encefálico y el cerebro	8
6	Sistema nervioso autónomo. División simpática y parasimpática	11
7	Estructura de la pared del tubo digestivo en donde se muestra la localización del plexo mientérico (de Auerbach) y del plexo submucoso (de Meissner)	13
8	Diagrama de los ejes del tracto gastrointestinal	15
9	Desde el desarrollo a la diferenciación del epitelio intestinal.	16
10	Esquema general del tubo digestivo de rata	17
11	Vellosidades del intestino delgado de ratones	18
12	Secciones transversales de las vellosidades de la región proximal, en ratas adultas	19
13	Vellosidades de la región proximal de ratas recién nacidas	19
14	Criptas de Lieberkühn y la punta las vellosidades del intestino delgado	20
15	Representación esquemática de los tipos conocidos de células epiteliales intestinales generados a partir de células madre en las criptas de Lieberkühn	21
16	Sección histológica del duodeno en rata Wistar adulto	21

17	Las células caliciformes cargadas de mucina ácida	22
18	Tipos de receptores	24
19	Topología de las subunidades del recetor P2X con sus similitudes	28
20	Representación de la estructura de las tres subunidades que forman a un receptor P2X	28
21	Estructura de las subunidades del receptor P2X ₂ representando el sitio de unión para el ATP	29
22	Modelo espacial del sitio de unión al ATP	30
23	Microfotografías de laminillas control blanco de las vellosidades de intestino de rata neonata utilizando el anticuerpo secundario Alexa 568	39
24	Microfotografías de laminillas control blanco de las vellosidades de intestino de rata adulta utilizando el anticuerpo secundario Alexa 568	39
25	Microfotografía de la laminilla control negativo sin ningún anticuerpo utilizado en el tejido del intestino delgado en ratas neonatas	40
26	Microfotografía de la laminilla control negativo sin ningún anticuerpo utilizado en el tejido del intestino delgado en ratas adultas	40
27	Microfotografía de las vellosidades en región proximal del intestino delgado de ratas neonatas, P0 proximal, utilizando el anticuerpo secundario Alexa 568	41
28	Microfotografía de las vellosidades en región distal del intestino delgado de ratas neonatas, P0 proximal, utilizando el anticuerpo secundario Alexa 568	42

29	Microfotografía de las vellosidades de la región proximal del intestino delgado de ratas adultas, Ad proximal, utilizando el anticuerpo secundario Alexa 568	43
30	Microfotografía de las vellosidades de la región proximal del intestino delgado de ratas adultas, Ad distal, utilizando el anticuerpo secundario Alexa 568	43
31	Transducción de señal mediada por el receptor P2X	46

RESUMEN

El intestino es sometido a varios cambios adaptativos durante el desarrollo postnatal, de manera similar a otros órganos. En la mucosa intestinal, dichos cambios ocurren en gran parte en las estructuras relacionadas con el intercambio y en proceso de absorción tal como son las vellosidades, las criptas, los enterocitos y las microvellosidades. En el intestino delgado están localizados distintos tipos de receptores entre los que se encuentran los receptores purinérgicos, los cuales responden a purinas y se dividen en dos tipos: P1 (responde principalmente a adenosina) y P2 (responden principalmente a ATP). Los agonistas constituidos por purinas y los formados por pirimidinas extracelulares son importantes moléculas señalizadoras que median diversos efectos biológicos a través de receptores celulares denominados receptores purinérgicos. Las señales purinérgicas están involucradas en el control del tono vascular, activación de plaquetas, quimioatracción de células inmunes, la permeabilidad celular y el ATP extracelular actúa como un factor de crecimiento para el músculo liso. Además, están implicadas en transformaciones neoplásicas, embriogénesis, función cardiovascular, regeneración del hueso y músculo, liberación de insulina, inflamación e inmunomodulación, neuroprotección e inhibición del dolor. El objetivo de este trabajo fue comparar la expresión de los receptores P2X₄ durante la ontogenia de intestino de rata por el método de inmunofluorescencia, encontrando marca inmunorreactiva en las células epiteliales intestinales en la región distal en ratas neonatas. En la región distal y proximal del intestino delgado de las ratas adultas se encontró la presencia de los receptores P2X₄ en los vasos capilares.

1. ANTECEDENTES

1.1. Sistema nervioso

El sistema nervioso se divide en sistema nervioso central (SNC), formado por el encéfalo y la médula espinal, y el sistema nervioso periférico (SNP), compuesto por los *pares craneales* que salen del encéfalo y los *nervios raquídeos*, procedentes de la médula espinal (Fox, 2008). Dentro del SNP se encuentra el sistema nervioso somático (SNS), el sistema nervioso autónomo (SNA) y el sistema nervioso entérico (SNE) (Tortora y Derrickson, 2006).

El sistema nervioso sólo consta de dos tipos principales de células: las neuronas y las células de sostén. Las neuronas son unidades anatómicas y funcionales básicas del sistema nervioso, están especializadas en la respuesta a los estímulos físicos y químicos, en la conducción de los impulsos electroquímicos y en la liberación de reguladores químicos. En general, las neuronas no pueden dividirse por mitosis, aunque en determinadas circunstancias muchas pueden regenerar una porción perdida o producir pequeñas ramificaciones nuevas.

Aunque las neuronas tienen formas y tamaños muy variables, en general todas poseen tres regiones principales: (1) un cuerpo celular, (2) dendritas, y (3) un axón (figura 1). El cuerpo celular o pericarión es la parte más amplia de la neurona en la que se encuentra el núcleo. Es el centro de nutrición de la célula, donde se producen las macromoléculas (Fox, 2008). El cuerpo celular contiene al núcleo rodeado por el citoplasma, en el cual se hallan los orgánulos celulares como los lisosomas, las mitocondrias, el complejo de Golgi, ribosomas y condensaciones del retículo endoplasmático rugoso, denominadas cuerpos de Nissl. Los ribosomas son sitios donde se tiene lugar la síntesis de las proteínas. Las proteínas recién sintetizadas que se forman en los cuerpos de Nissl sirven para reemplazar diferentes componentes celulares utilizados en el crecimiento de las neuronas y la regeneración de los axones dañados en el SNP (Tortora y Derrickson, 2006).

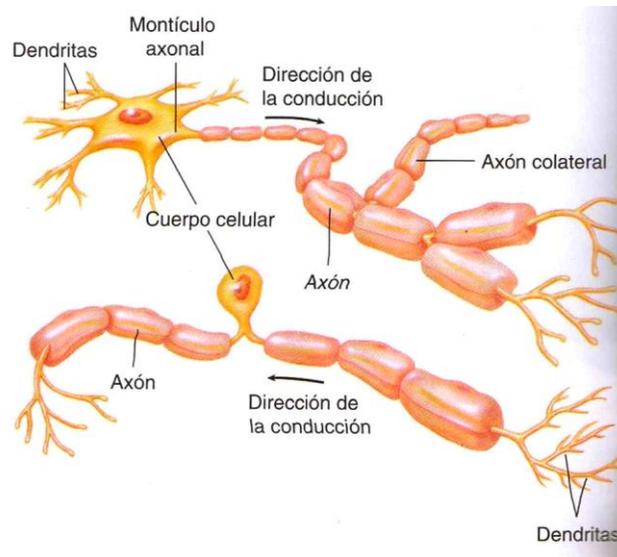


Figura 1. Estructura de dos tipos de neuronas. Se representan (a) a una neurona motora y (b) una neurona sensitiva (Fox, 2008).

Las dendritas son prolongaciones finas y ramificadas cortas que salen del citoplasma del cuerpo celular. Constituyen una zona receptiva que transmite los impulsos eléctricos hacia el cuerpo de la neurona, se extienden en diferentes direcciones y de esta manera incrementan la capacidad de una neurona para recibir impulsos de diversos orígenes (Fox, 2008; Kierman, 2000).

El axón único de una neurona propaga los impulsos nerviosos hacia otra neurona, una fibra muscular o una célula glandular. El axón es una proyección cilíndrica larga y delgada que generalmente se une con el cuerpo celular en una elevación cónica denominada montículo axonal (Tortora y Derrickson, 2006), lugar donde se crean los impulsos nerviosos. La longitud de los axones varía desde sólo algunos milímetros hasta más de un metro. A partir del axón central pueden extenderse ramas laterales llamadas colaterales del axón (Fox, 2008).

Para clasificar a las diferentes neuronas que se encuentran en el organismo se utilizan tanto sus características funcionales como las estructurales. Se pueden clasificar como neuronas sensitivas, interneuronas, de proyección o motoneuronas de acuerdo a su función (Tortora y Derrickson, 2006).

- a) Las neuronas sensoriales reciben información sensorial desde los receptores y la transmiten integrándola en el SNC.
- b) Interneuronas, transmiten señales dentro del SNC y forman circuitos neurales.
- c) Neuronas de proyección, transmiten señales desde un punto a otro dentro del SNC.
- d) Neuronas motoras, transmiten señales fuera del SNC hacia los efectores: músculos y glándulas.

Las neuronas motoras son eferentes, de modo que llevan señales “hacia la periferia”, mientras que las neuronas sensoriales son aferentes, es decir llevan señales “hacia el centro” (Curtis y Schnek, 2008). En cuanto a su estructura, se distinguen según el número de prolongaciones que afloran en su cuerpo celular (figura 2).

- a) Neuronas multipolares tienen generalmente varias dendritas y un axón. La mayor parte de las neuronas situadas en el encéfalo y en la médula espinal son de este tipo.
- b) Las neuronas bipolares tienen una dendrita principal y un axón. Se encuentran en la retina del ojo, oído interno y en el área olfatoria del cerebro.
- c) Las neuronas unipolares o pseudounipolares son células sensitivas que comienzan en el embrión como neuronas bipolares. Durante el desarrollo, el axón y la dendrita se fusionan en una prolongación única que se divide en dos ramas a poca distancia del cuerpo celular. Ambas ramas tienen la estructura y la función característica de un axón (Tortora y Derrickson, 2006). Una de las prolongaciones formadas tras la división recibe los estímulos sensitivos y produce impulsos nerviosos, mientras que la otra lleva estos impulsos hacia sinapsis situadas en el encéfalo o en la médula espinal (Fox, 2008).

Las neuronas pueden transmitir y procesar información utilizando principalmente dos tipos de señales: bioeléctricas y químicas. Las señales bioeléctricas son producidas por el movimiento de iones a través de la membrana plasmática de la neurona. Este movimiento genera corrientes eléctricas que pueden variar en el tiempo y transmitirse

por la superficie de la neurona. Las señales químicas se llevan a cabo en la mayoría de las neuronas, las cuales no son continuas sino contiguas, es decir que hay un espacio o brecha entre una neurona y otra. En cada neurona la información se conduce eléctricamente, pero al llegar al final de las células se liberan moléculas denominadas transmisores nerviosos, que constituyen una señal química para la neurona receptora. De esta manera se realiza la sinapsis, proceso en el que se transfiere información a la o las células contiguas (Curtis y Schnek, 2008).

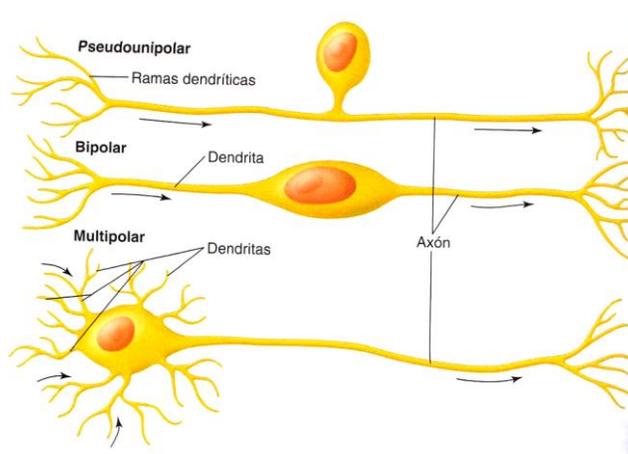


Figura 2. Tres tipos distintos de neuronas. Las neuronas pseudounipolares, que son sensitivas tienen una prolongación que se divide. Las neuronas bipolares, que se encuentran en la retina y el caracol, tienen dos prolongaciones. Las neuronas multipolares, que son motoras y de asociación, tienen muchas dendritas y un axón (Fox, 2008).

Las células de sostén ayudan a las neuronas a desarrollar sus funciones y su número es unas cinco veces mayor que el de estas últimas. En el SNC, las células de sostén, en conjunto, reciben el nombre de neuroglia o, simplemente, de células gliales. A diferencia de las neuronas, que no se dividen por mitosis, las células gliales pueden dividirse por mitosis. Existen dos clases de células de sostén en el sistema nervioso periférico:

- a. Células de Schwann, que forman vainas de mielina alrededor de los axones periféricos.
- b. Células satélites o gliocitos ganglionares, que sostienen a los cuerpos celulares de las neuronas dentro de los ganglios del SNP.

Hay cuatro clases de células de sostén, denominadas células de la neuroglia (o de la glia) en el sistema nervioso central:

- a. Oligodendrocitos, que forman las vainas de mielina alrededor de los axones en el SNC.
- b. Microglia, que migran por el SNC y fagocitan los materiales extraños y degenerados.
- c. Astrocitos, que ayudan a regular el medio ambiente que rodea a las neuronas del SNC.
- d. Células ependimarias, que revisten los ventrículos (cavidades) del encéfalo y del canal central de la médula espinal (Fox, 2008).

1.2. Sistema nervioso central

El SNC tiene como función principal recoger información sobre el entorno procedente del SNP; procesa esta información, organiza respuestas reflejas y conductuales, es responsable del conocimiento, la memoria y el aprendizaje y planifica y ejecuta movimientos voluntarios (Koeppen y Stanton, 2009). El SNC, formado por el encéfalo y la médula espinal, recibe impulsos aferentes que proceden de las neuronas sensitivas y dirige la actividad de las neuronas motoras que inervan los músculos y las glándulas (Fox, 2008).

La médula espinal actúa como un enlace entre el encéfalo y el resto del cuerpo, al transmitir información en ambos sentidos; también posee algunos circuitos que controlan la locomoción, los esfínteres, ciertos reflejos y otras funciones. La médula espinal es un cilindro delgado que tiene dos áreas principales claramente visibles en un corte transversal: un área central de sustancia gris y un área periférica de sustancia blanca (figura 3) (Curtis y Schnek, 2008).

Histológicamente el SNC de los vertebrados consiste en dos tipos de tejido: sustancia gris y sustancia blanca (Hill y Wyse, 2006). Las regiones que contienen altas

concentraciones de axones (con muy pocas neuronas) se denominan sustancia blanca, porque las vainas de mielina del axón refractan mucho la luz. Las regiones altas de concentraciones de neuronas y dendritas se llaman sustancia gris (Koeppen y Stanton, 2009).

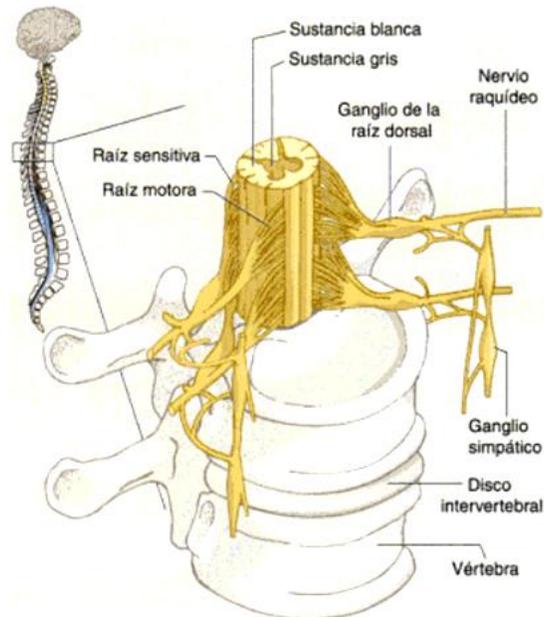


Figura 3. Médula espinal. Porción de la médula espinal y de la columna vertebral humana, vista lateroventral (Curtis y Schnek, 2008).

La médula espinal se continúa con el encéfalo, que comprende el cerebro, el diencefalo, el cerebelo y el tronco cerebral (o encéfalico) (figura 4).

a) Cerebro, consta de dos hemisferios cerebrales claramente diferenciados, derecho e izquierdo. En la mayoría de los vertebrados, la sustancia gris recubre a los hemisferios cerebrales (corteza cerebral) y la sustancia blanca es interna. En el cerebro se realiza el principal procesamiento sensitivo de la información entrante y en él se general las salidas motoras que controlan a los músculos corporales.

b) Diencefalo es una región fundamental en el procesamiento de la información, la regulación de las funciones viscerales y endocrinas y en la regulación de los

ritmos biológicos. Está formado por el tálamo, el hipotálamo, la glándula pineal y la glándula hipófisis (figura 5).

- c) Cerebelo, estructura que se encuentra en la parte posterior y basal del encéfalo, se relaciona con el equilibrio y la coordinación motora.
- d) Tronco cerebral, está formado por el mesencéfalo, la protuberancia y el bulbo raquídeo, contiene haces de fibras que conducen señales hacia la médula espinal y cuerpos celulares de neuronas cuyos axones forman de 10 de los 12 nervios craneales, los cuales traen información desde los receptores sensoriales y, por otro lado, inervan los músculos y las glándulas de la cabeza y las vísceras. Además, dentro del tronco cerebral hay núcleos que dirigen algunas funciones reguladoras automáticas importantes, como el control de la respiración, de la frecuencia cardíaca y de la presión sanguínea (Curtis y Schnek, 2008).

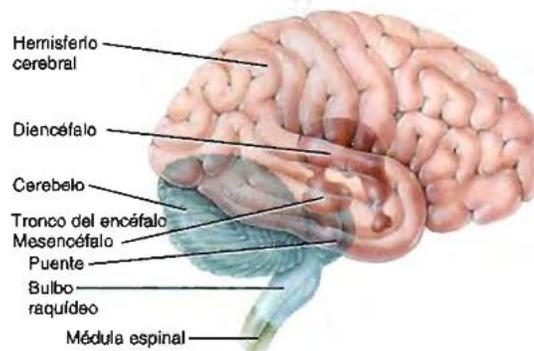


Figura 4. El sistema nervioso central está formado por el encéfalo y la médula espinal. El diencefalo y la parte superior del tronco encéfalico han sido proyectados sobre la superficie (Tortora y Derrickson, 2006).

Los nervios conectados con el cerebro se denominan nervios craneales y los unidos a la médula espinal se llaman nervios espinales. La médula espinal recibe estímulos sensitivos a través de las raíces dorsales y envía respuestas motoras hacia la periferia a través de las raíces ventrales. El cerebro recibe aferencias sensitivas desde los nervios craneales y también a través de vías que ascienden desde la médula espinal.

Asimismo, aunque las neuronas cerebrales controlan directamente los efectores de la cabeza, gran parte de las aferencias cerebrales sirven para controlar o modular la médula espinal (Hill y Wyse, 2006).

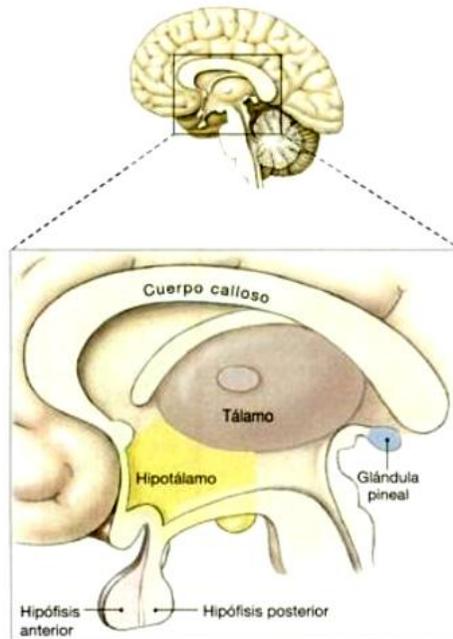


Figura 5. El diencéfalo se encuentra entre el tronco encefálico y el cerebro (Silverthorn, 2008).

Los nervios conectados con el cerebro se denominan nervios craneales y los unidos a la médula espinal se llaman nervios espinales. La médula espinal recibe estímulos sensitivos a través de las raíces dorsales y envía respuestas motoras hacia la periferia a través de las raíces ventrales. El cerebro recibe aferencias sensitivas desde los nervios craneales y también a través de vías que ascienden desde la médula espinal. Asimismo, aunque las neuronas cerebrales controlan directamente los efectores de la cabeza, gran parte de las aferencias cerebrales sirven para controlar o modular la médula espinal (Hill y Wyse, 2006).

El SNC se encuentra protegido no sólo por el cráneo y la columna vertebral, sino también por capas de membranas llamadas meninges y están bañadas por el líquido cefalorraquídeo. Este líquido rodea en encéfalo y la médula espinal, circulando por los

canales y ventrículos, llevando nutrientes y linfocitos desde el sistema inmunitario a diferentes partes del SNC. El líquido cefalorraquídeo actúa también como un amortiguador de impactos (Curtis y Schnek, 2008).

1.3. Sistema nervioso periférico

La división eferente del SNP puede subdividirse en neuronas motoras somáticas, que controlan a los músculos esqueléticos, y las neuronas autónomas, que regulan la actividad del músculo liso, el músculo cardíaco, numerosas glándulas y parte del tejido adiposo. A las divisiones somáticas y autónomas a veces se les denomina divisiones voluntarias e involuntarias del sistema nervioso, respectivamente (Silverthorn, 2008).

En el SNP contiene nervios raquídeos, craneales y segmentarios que transportan información sensitiva desde las diferentes partes del cuerpo y transmiten las señales motoras hacia los efectores. Los cuerpos celulares de las neuronas sensitivas espinales están ubicados en los ganglios de la raíz dorsal. Las raíces ventrales contienen axones de neuronas somáticas motoras que inervan los músculos esqueléticos y axones de neuronas autonómicas que inervan los ganglios autonómicos. Los nervios craneales están más especializados en su función. Los mamíferos tienen 12 pares de nervios craneales. Algunos se asocian con los principales órganos de los sentidos de la cabeza (I, olfatorio; II, óptico; VIII, auditivo); otros tienen funciones motoras o mezcladas. El nervio vago (X) es un componente principal del sistema nervioso autónomo que también inerva la laringe y otros componentes somáticos (Hill y Wyse, 2006).

1.3.1. Sistema nervioso somático

El SNS comprende neuronas motoras y sensitivas. Las neuronas sensitivas transportan aferencias de receptores de sentidos especiales (visión, audición, gusto, olfato, equilibrio) y de receptores de los sentidos somáticos (dolor, temperatura, tacto y sensaciones propioceptivas). Todas estas sensaciones son percibidas normalmente de manera consciente. A su vez, las motoneuronas somáticas inervan el músculo

esquelético (el tejido efector del SNS) y producen movimientos voluntarios (Tortora y Derrickson, 2006).

1.3.2. Sistema nervioso autónomo

La división autónoma del sistema nervioso eferente (o SNA) también es denominada como sistema nervioso vegetativo, lo que refleja la observación de que su funcionamiento no está bajo control de la voluntad. Otro de los nombres que tiene esta división autónoma es el sistema nervioso visceral debido a su control sobre órganos internos (Silverthorn, 2008).

Desde el punto de vista anatómico y funcional en la periferia del cuerpo el SNA está bien separado del SNS, mientras que en el SNC ambos sistemas están conectados. El SNA es eferente; sin embargo, los nervios por los que transcurre en general también poseen fibras aferentes. Estas fibras provienen de los sensores de los órganos internos (esófago, tracto digestivo, hígado, pulmón, corazón, arterias, vejiga, etc) (Silbernagl y Despopoulos, 2009).

El SNA se subdivide en las divisiones simpáticas y parasimpáticas. Aunque estas divisiones pueden distinguirse anatómicamente, no existe una manera simple de separar las acciones de las dos ramas sobre sus órganos diana. La manera generalizada es caracterizarlas de acuerdo con el tipo de situación en las que son activadas (Silverthorn, 2008).

La división simpática induce en el cuerpo una reacción de preparación a “de lucha” o “de huida” que se debe principalmente a la liberación de noradrenalina por las fibras posganglionares y de la secreción de adrenalina por la médula suprarrenal. La división parasimpática induce a menudo efectos antagonistas a través de la liberación de acetilcolina a partir de sus fibras posganglionares (figura 6). Los efectos inducidos por las dos divisiones deben permanecer equilibrados para mantener la homeostasis (Fox, 2008).

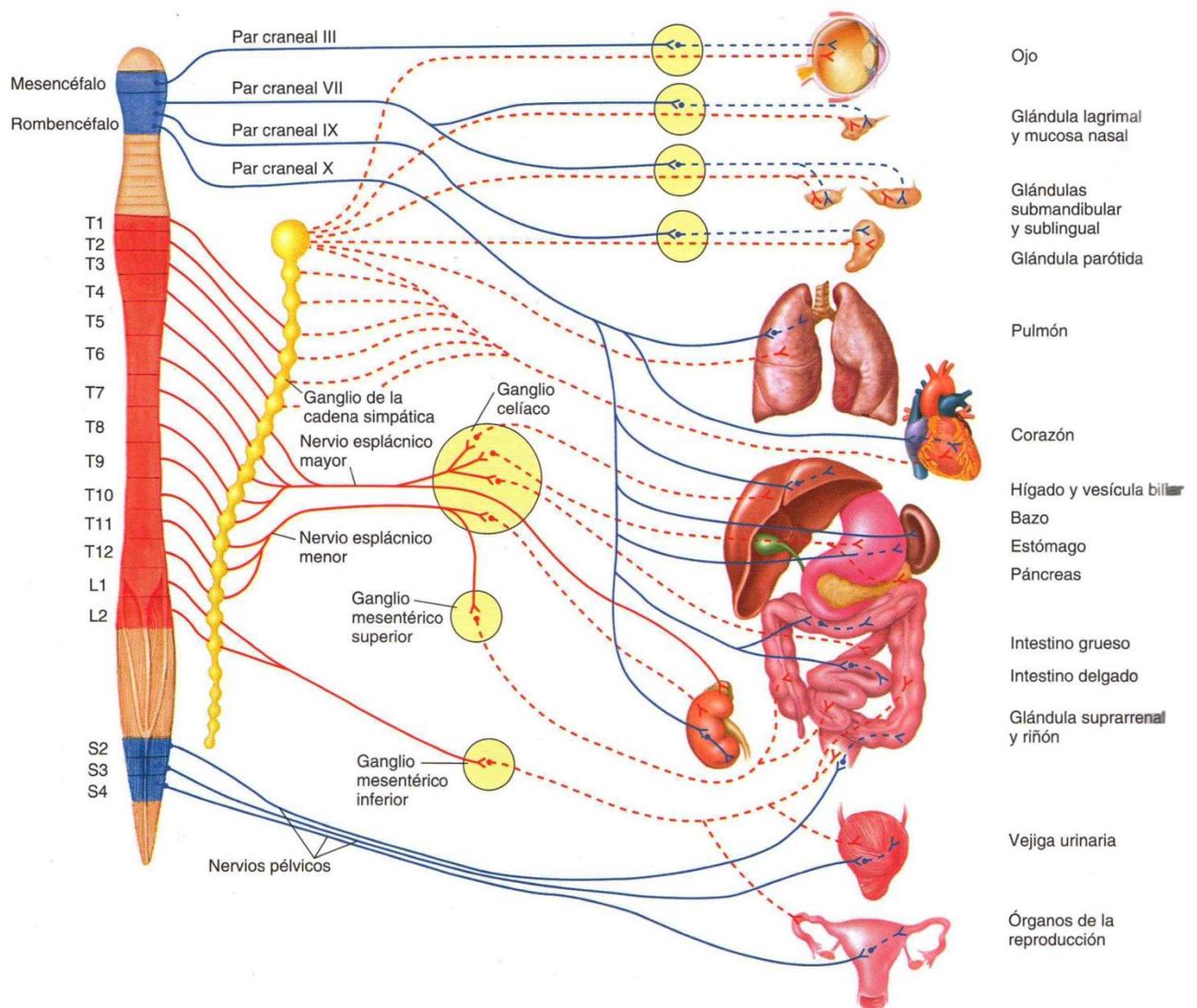


Figura 6. Sistema nervioso autónomo. La división simpática se muestra en rojo; la parasimpática en azul. Las líneas continuas indican las fibras preganglionares y las líneas de rayas las fibras posganglionares (Fox, 2008).

1.3.3. Sistema nervioso entérico

El SNE es el mayor y más complejo de la división de los sistemas periférico y autónomo en los vertebrados. Contiene numerosos tipos de neuronas en comparación con médula espinal, y una variedad de neurotransmisores y neuromoduladores similares encontrados en el SNC. Los componentes del SNE forman un circuito integrado que

controla la motilidad del intestino, intercambio de los fluidos a través de la superficie de la mucosa, el flujo sanguíneo y secreción de hormonas intestinales (Sasselli y col., 2012). En la mayoría de las regiones del intestino, el SNE es capaz de modular la independencia o el control de muchas de las funciones intestinales, incluyendo la motilidad y la secreción, aunque el SNC también puede influir en estos reflejos (Anderson y col., 2007).

El SNE es una red interconectada de neuronas y células gliales que se agrupan en ganglios ubicados en dos grandes plexos: plexo mientérico (de Auerbach) y plexo submucoso (de Meissner) (Sasselli y col., 2012). El plexo mientérico yace entre las capas musculares longitudinal y circular, el plexo submucoso se encuentra en el tejido conjuntivo entre la capa muscular circular y la muscular de la mucosa (figura 7) (Kiernan 2000). Los plexos regulan el peristaltismo y también pueden influir sobre las funciones secretoras de los epitelios del tubo digestivo (Welsch, 2009).

Cada plexo consiste en ganglios entéricos pequeños, unidos uno a otro por delgados nervios en los cuales todos los axones son amielínicos. Nervios similares conectan los dos plexos a través de la capa muscular circular y llevan ramas de los plexos hacia el músculo liso y dentro de la lámina propia de la mucosa.

La mayoría de las neuronas es multipolar, pero también hay muchas bipolares y unipolares, en especial al plexo submucoso. Además de las neuronas, el sistema nervioso entérico (SNE) contiene células de neuroglia, las cuales envuelven las neuronas y sus procesos. El tejido nervioso es avascular y sus recibe nutrientes por difusión desde los vasos capilares, por fuera de la vaina glial (Kiernan 2000).

Aunque el intestino también recibe inervación extrínseca parasimpática y simpática, los circuitos neuronales intrínsecos del SNE son capaces de generar reflejo de la actividad contráctil intestinal independiente de cualquier inervación del SNC (Sasselli y col., 2012).

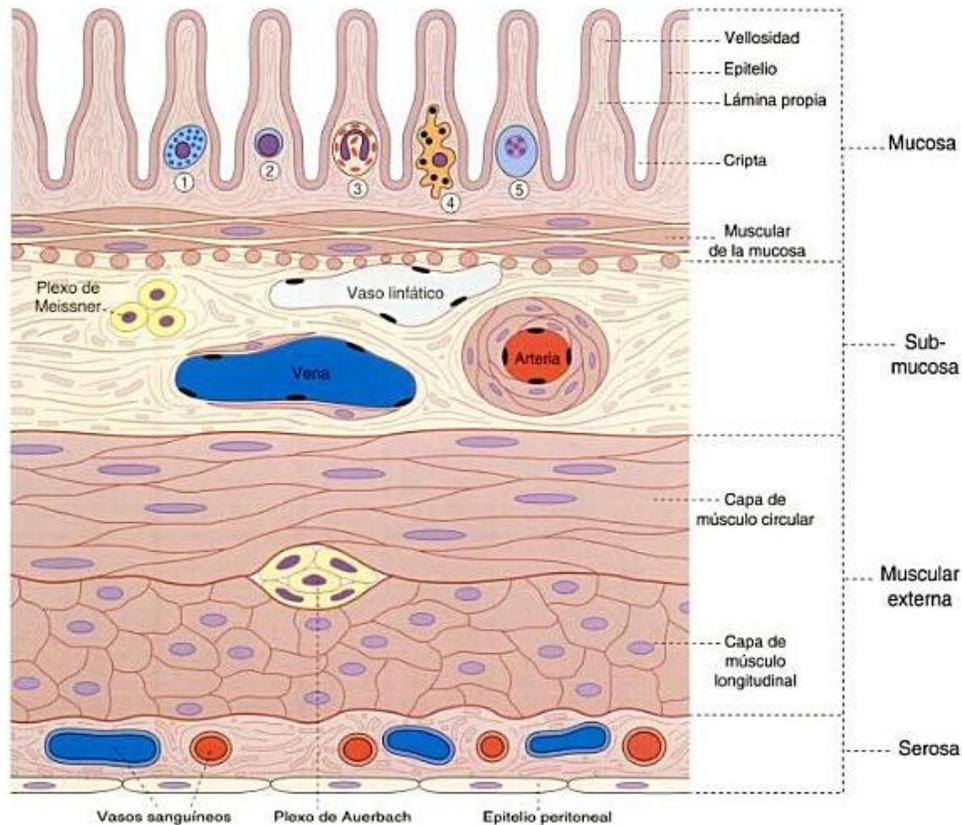


Figura 7. Estructura de la pared del tubo digestivo en donde se muestra la localización del plexo mientérico (de Auerbach) y del plexo submucoso (de Meissner) (Welsch, 2009).

1.4. Ontogenia del intestino delgado

El desarrollo ontogénico del intestino en los mamíferos es un proceso altamente organizado, uno de los resultados cruciales es la formación del epitelio intestinal especializado que cumplen funciones digestivas y de absorción (Pacha, 2000).

El tracto gastrointestinal de los vertebrados se encuentra compuesto por tres sistemas derivados de una estructura simple: el sistema digestivo luminal del esófago, del estómago, intestino y colon y derivados del tracto gastrointestinal. Los derivados del tracto intestinal esencialmente se encuentran fuera del endodermo del intestino temprano y que posteriormente formaran la tiroides, los pulmones y el hígado. El desarrollo del intestino delgado se compone de tres capas germinales: endodermo (que

forma el revestimiento epitelial del lumen), mesodermo (que forma las capas del músculo liso), y el ectodermo (que incluye la estructura luminal digestiva anterior y posterior y el sistema nervioso entérico (De Santa Barbara y col., 2003). La gastrulación es el proceso por el cual se forma el tubo intestinal primitivo (Drozdowski y col., 2010).

En el embrión, el sistema gastrointestinal es una de las primeras estructuras que se condensa mediante la formación de una entrada y salida a los sistemas a lo largo de los ejes anterior y posterior (Drozdowski y col., 2010). En el desarrollo embrionario temprano el intestino es formado en el eje anterior-posterior, eje dorsoventral, el eje izquierdo-derecho y más tarde el eje radial. El desarrollo regional específico y la diferenciación a lo largo del eje anterior-posterior darán lugar a la formación de tres regiones: el intestino anterior, intestino medio y el intestino posterior. Estas estructuras darán lugar al sistema digestivo: faringe, esófago y estómago (para el intestino anterior), intestino delgado (para el intestino medio) y el colon (para el intestino posterior) en el eje izquierdo-derecho se observa relativamente temprano en el desarrollo, por el giro característico del intestino en la que el estómago está generalmente posicionado en el lado izquierdo del organismo (figura 8) (Sanderson y Walker, 1999).

Las especies con desarrollo más lento, como la rata y el ratón, sólo alcanzan la madurez tras el destete, frente a las especies precoces, como el cerdo, la oveja o el humano, que alcanzan un mayor desarrollo en el útero. Los procesos que marcan el desarrollo intestinal son:

- a) Formación de las vellosidades primitivas al doblarse el endodermo embrionario debido a la presencia de invaginaciones en la mesénquima.
- b) Diferenciación progresiva de las células del endodermo en los diferentes tipos de células especializadas del intestino.
- c) Formación de criptas en la base de las vellosidades con células de Paneth resistentes (De la Torre, 2006).

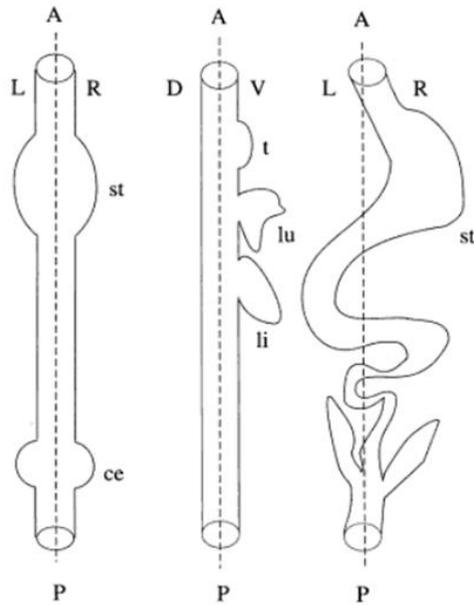


Figura 8. Diagrama de los ejes del tracto gastrointestinal. Eje anterior (A) y posterior (P). Eje dorsal (D), eje ventral (V), eje derecho (R), eje izquierdo (L), estómago (st), tiroides (t), pulmón (lu), hígado (li) (Sanderson y Walker, 1999).

Durante el desarrollo embrionario temprano, el endodermo visceral parece uniforme y presenta capas de células estratificadas. La citodiferenciación epitelial intestinal ocurre durante el desarrollo fetal y se caracteriza por el crecimiento del mesodermo dentro del lumen y la formación de las vellosidades. Estas vellosidades son separadas por un epitelio proliferativo de intervallosidad. Las diferencias del eje anterior-posterior aparecen y se caracterizan por una larga y delgada vellosidad en el intestino delgado y por vellosidades transitorias anchas y planas en el colon. El epitelio de intervallosidad del intestino delgado se forman las criptas.

Las vellosidades del colon desaparecieron en el momento del nacimiento y el epitelio presentes glándulas tubulares del colon maduras (criptas) (figura 9). Por último el endodermo diferencia las señales proporcionadas por el mesodermo dirigidas a los ejes anterior-posterior y dorsoventral. Finalmente, el endodermo convierte fenotípicamente específico los ejes anterior-posterior, dorsoventral y radial (De Santa Barbara y col., 2003).

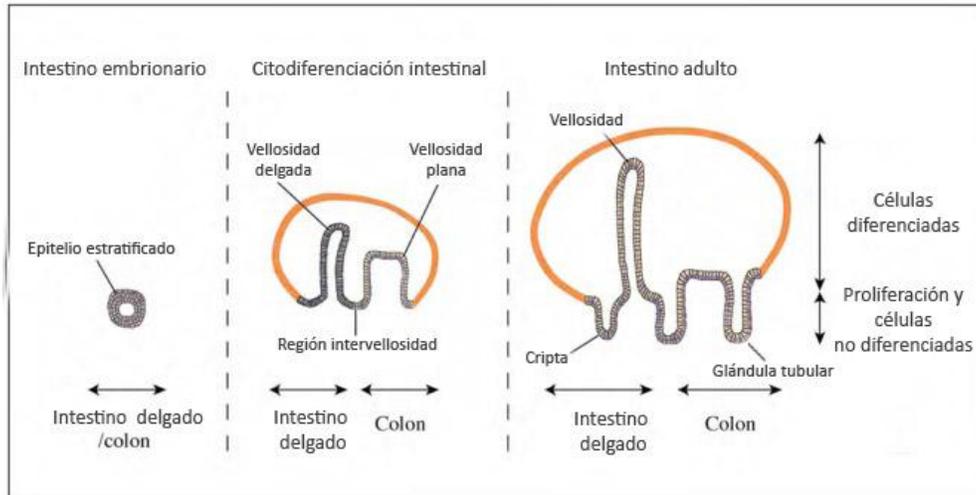


Figura 9. Desde el desarrollo a la diferenciación del epitelio intestinal (Modificado de De Santa Barbara y col., 2003).

1.5. Intestino delgado

El intestino delgado se extiende desde el estómago hasta el colon, consta de tres partes: el duodeno, yeyuno e íleon (figura 10). El duodeno tiene forma de C y se encuentra relativamente fijo a la pared abdominal posterior, ya que no posee mesenterio en la mayor parte de su longitud. El yeyuno y el íleon están suspendidos de la pared abdominal posterior por el mesenterio, El 40% de la porción proximal del intestino delgado se denomina yeyuno y el 60% de la porción distal se llama íleon (Segarra, 2006).

El intestino se somete a varios cambios adaptativos durante el desarrollo postnatal, de manera similar a otros órganos. En la mucosa intestinal, estos cambios ocurren en gran parte en las estructuras relacionadas con el intercambio y en proceso de absorción tal como son las vellosidades, criptas, enterocitos y las microvellosidades (Vigueras y col., 1999).

La estructura del tubo digestivo se mantiene similar en toda su extensión. Está formado por cinco capas que responden a diferentes papeles. De adentro hacia fuera estas capas son: la mucosa, la submucosa, el músculo liso circular, el músculo liso

longitudinal y la serosa. En ocasiones se nombra a la capa muscular circular como capa muscular interna y a la capa muscular longitudinal como capa muscular externa (García, 2011).

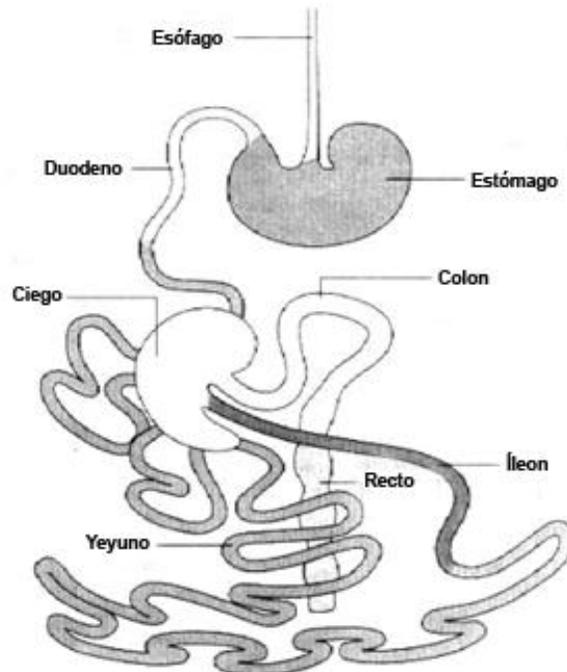


Figura 10. Esquema general del tubo digestivo de rata (Modificado de Suckow, 2005).

1.6. Mucosa

La mucosa del intestino delgado comprende una población heterogénea de células (criptas de Lieberkühn) que proporcionan la oportunidad de estudiar los procesos involucrados en la diferenciación celular y la regulación de la expresión de genes (Tan y Hooi, 2000). En este segmento intestinal se observan diferentes niveles de adaptación de la estructura a la función de absorción de nutrientes. Estas especializaciones que aumentan la superficie de absorción, desde el nivel anatómico al celular son: los pliegues semicirculares, las vellosidades intestinales, las criptas de Lieberkühn y las microvellocidades (Eynard y col., 2008).

La mucosa es la capa que está en contacto directo con la luz del tubo digestivo y se divide a su vez en tres capas: una capa de células epiteliales de revestimiento, la

lámina propia y la *muscularis mucosae*, la cual está formada por una capa delgada de musculatura fina. A lo largo del intestino delgado, este epitelio presenta numerosas modificaciones en su estructura cuyo fin es el incremento del área de superficie de contacto entre la pared del tubo y en el interior del mismo (Gal y col., 2007).

Los pliegues circulares también conocidos como válvulas de Kerckring, son repliegues transversales permanentes que contiene un centro de submucosa. Cada pliegue circular rodea entre la mitad y los dos tercios de la circunferencia de la luz intestinal, comienzan a aparecer después del píloro. Son muy abundantes en la porción distal del duodeno y en el inicio del yeyuno, su tamaño y frecuencia disminuyen desde el tercio medio del íleon (Ross y Pawlina, 2007).

1.7. Vellosidades

Las vellosidades son evaginaciones o proyecciones digitiformes de la mucosa (Figura 11). Consisten en un centro de tejido conjuntivo laxo cubierto por un epitelio cilíndrico. El centro de la vellosidad es una extensión de la lámina propia que contiene una cantidad abundante de fibroblastos, células musculares lisas y una red de capilares sanguíneos (Ross y Pawlina, 2007). En las figuras 12 y 13, se muestra la diferencia morfológica de las vellosidades en ratas neonatas y adultas. Las microvellosidades, también se conocen como “borde en cepillo”, incrementan el área de su superficie para el importante transporte y actividad enzimática (Suckow, 2005).

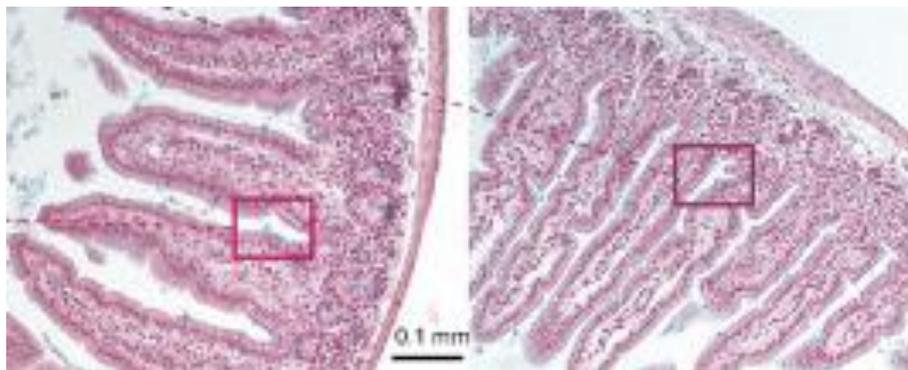


Figura 11. Vellosidades del intestino delgado de ratones. Tinción con Azul Alcian. Amplificación 100x (Sokolović y col., 2007).

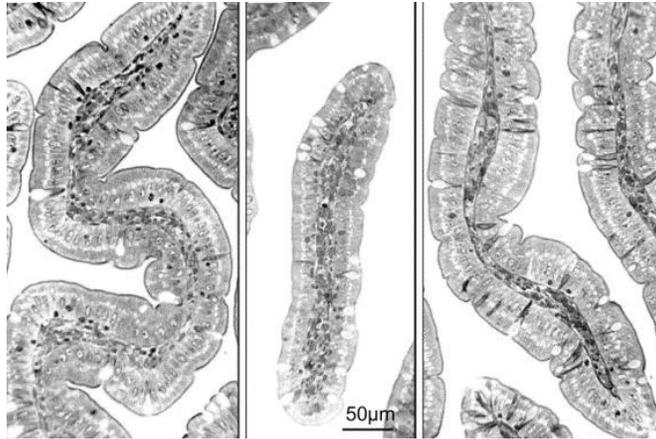


Figura 12. Secciones transversales de las vellosidades de la región proximal, en ratas adultas, amplificación 100x (Dunel-Erb y col., 2001).



Figura 13. Vellosidades de la región proximal de ratas recién nacidas, amplificación 100x (Wang y col., 2003).

1.8. Criptas de Lieberkühn

Las criptas de Lieberkühn localizadas en la base de las vellosidades intestinales contienen aproximadamente 150 células proliferativas cada una, proporcionando una estable fuente de nuevas células (figura 14 A y figura 15). Estas células se diferencian en enterocitos, células caliciformes, células enteroendocrinas y células de Paneth, a medida de que migran a lo largo de la longitud de las vellosidades (figura 14B) (Tan y Hooi, 2000). La formación de criptas se observa sólo después del nacimiento (Pachá, 2000). La tasa de producción de células en la cripta de Lieberkühn a lo largo del intestino delgado es relativamente constante, aproximadamente de 36 células/cripta. La proporción cripta-vellosidades disminuye de 27 células en el duodeno a 10 células en el íleon terminal (Suckow, 2005).

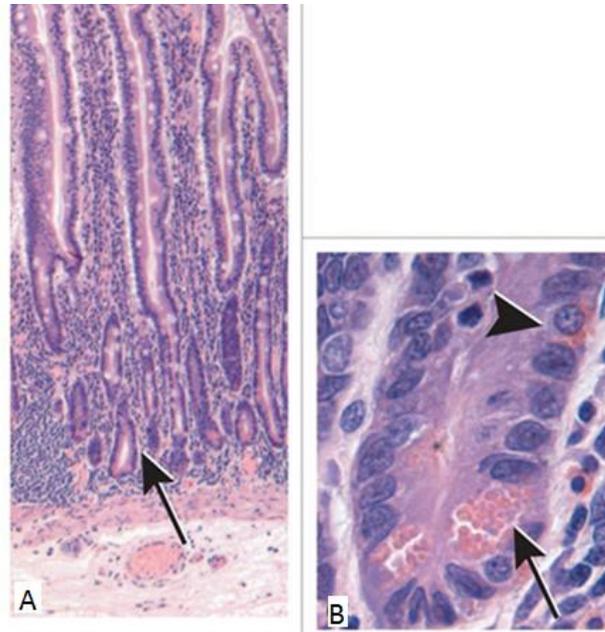


Figura 14. (A) La flecha muestra las criptas de Lieberkühn y la punta las vellosidades del intestino delgado. (B) Aumento de la imagen de una cripta, las células de Paneth presentan gránulos de color rojo (flecha) mientras que las células enteroendocrinas (punta flecha) sus gránulos son más pequeños. Tinción con hematoxilina-eosina (Turner y Turner, 2010).

Los enterocitos son el tipo de células más abundantes en el intestino delgado y grueso (Figura 16). La función primaria de los enterocitos es la absorción de nutrientes, su superficie apical se caracteriza por la presencia de microvellosidades que le dan aspecto de “borde de cepillo” (Noah y col., 2011).

Las células caliciformes (figura 17) son la más abundantes del epitelio intestinal, representan el 5% de las células (De Santa Barbara y col., 2003). Son las encargadas de producir y secretar moco para proporcionar a las demás células del epitelio una protección contra los nocivos contenidos luminales (Noah y col., 2011). Aumentan en cantidad desde el duodeno hasta la porción terminal del íleon (duodeno < yeyuno < íleon < intestino grueso) (Ross y Pawlina, 2007).

Las células enteroendocrinas son células epiteliales intestinales capaces de producir hormonas (Wang, 2004), comprenden aproximadamente el 1% del epitelio del intestino

delgado, se distribuyen a través de la mucosa y de las células individuales (Noah y col., 2011), juegan un papel crítico en la regulación fisiología gastrointestinal en todos los animales, como la secreción gastrointestinal, motilidad y el flujo sanguíneo (Wang, 2004).

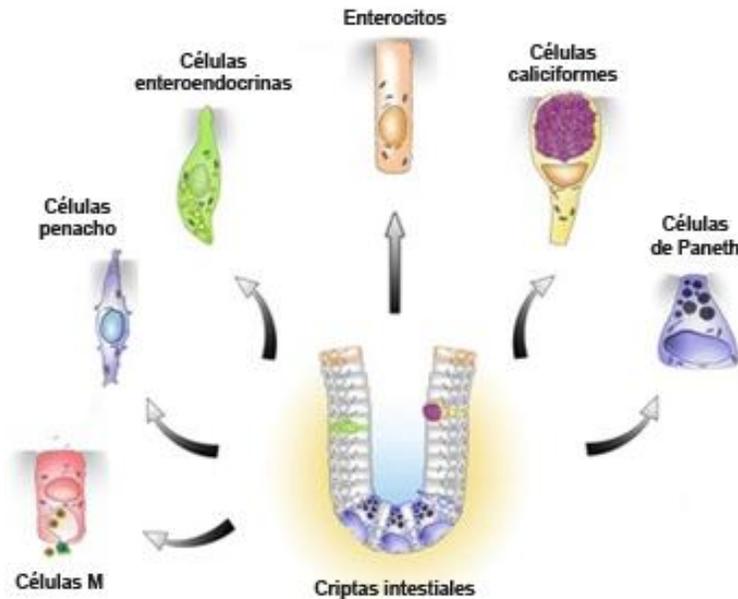


Figura 15. Representación esquemática de los tipos conocidos de células epiteliales intestinales generados a partir de células madre en las criptas de Lieberkühn (Modificado de Gerbe y col., 2012).

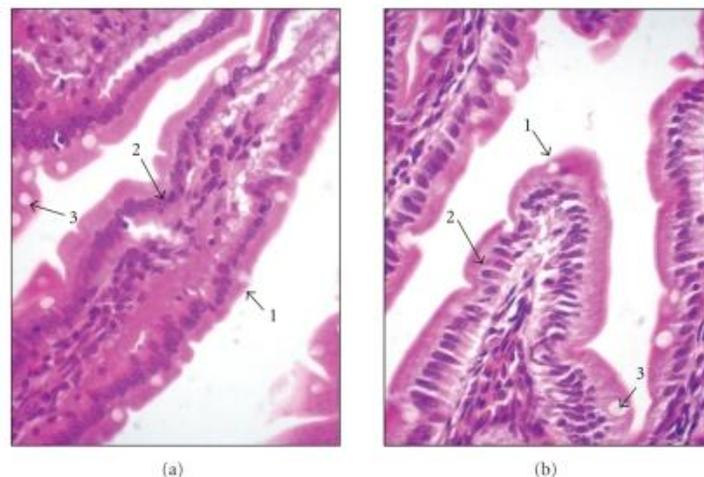


Figura 16. (a) Sección histológica del duodeno en rata Wistar adulto, amplificación 100x (b) amplificación de la punta de la vellosidad 200X. La flecha 1 muestra el borde de las microvellosidades. La flecha 2 muestra el núcleo del enterocitos, la flecha 3 muestra las células caliciformes. Los tejidos se tiñeron con hematoxilina-eosina (Guimarães y col., 2010).

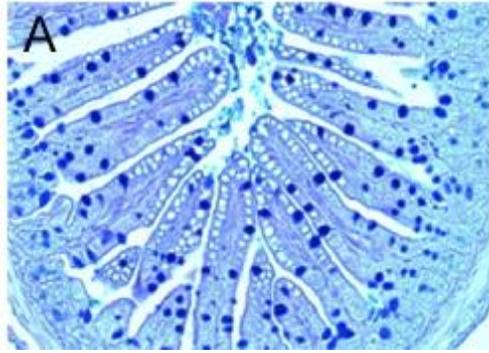


Figura 17. Las células caliciformes cargadas de mucina ácida se tiñen de azul (Tinción Azul alcian –PAS) (Henderson, 2012).

Las Células de Paneth son células secretoras que producen y secretan péptidos antimicrobianos dentro del lumen intestinal (figura 14B). Estas células son únicas en varios aspectos comparados con las otras células secretoras del intestino delgado, por ejemplo son las primeras en aparecer después del nacimiento de la cripta. Una vez que se determina el destino de la célula, las células de Paneth, migran hacia la base de las criptas donde completan su maduración (Andreu y col. 2005). Entre las enzimas que sintetizan se encuentran las lisosimas, criptidinas y defensinas que regulan la microflora del intestino (Suckow, 2005).

Las Células M son células microbianas se encuentran en el folículo asociado al epitelio (FAE; *follicle-associated epithelium*) que recubren las placas de Peyer's y los folículos linfoides. Estas células contienen una membrana de estructura inusual que facilita la presentación de antígenos a los linfocitos, macrófagos y células dendríticas (Mach y col., 2005).

Las Células penacho (también conocidas como células de pincel) son un tipo de células raras y poco estudiadas que se caracterizan con una forma de microvellosidades largas. Se cree que están involucradas en la sensación química del contenido luminal, basadas en la expresión de proteínas involucradas en la sensación del gusto y en la secreción de opioides en respuesta de nutrientes luminales. Las Células penacho se piensan que son un tipo raro de células enteroendocrinas, en base a su frecuencia en el epitelio y en la sensibilidad química (Noah y col., 2011).

1.9. Receptores celulares

La recepción de señal comienza cuando una señal originada en el exterior de la célula diana encuentra una molécula diana perteneciente a esa célula. En casi todos los casos la molécula diana es una proteína receptora (o receptor) y cada receptor se activa por un solo tipo de señal (Alberts, 2006). Los receptores están presentes en todos los procesos fisiológicos conocidos, su acción es muy variada y pueden disparar, acelerar, retardar o detener un proceso celular, se encuentran en membranas celulares, citoplasma y núcleo (Bustamante, 2007). La función principal de los receptores es de reconocer el ligando, y posteriormente, propagar el mensaje. Esto se lleva a cabo por la presencia de dos dominios, un dominio de unión al ligando y un dominio efector (Taleisnik, 2006).

Los receptores se han identificado en cuatro grandes clases o tipos (figura 18) los cuales son:

- Receptores ionotrópicos. Están formados por cinco proteínas o subunidades que conforman una estructura que es de un canal con un poro en el eje central. Que al ser activado por su ligando se abre y permite el paso de iones.
- Receptores metabotrópicos. Son proteínas que atraviesan siete veces la membrana celular. El extremo amino terminal se localiza extracelularmente, mientras que el extremo carboxilo terminal se localiza en el citoplasma. La activación del receptor por el ligando produce principalmente en la tercera horquilla o asa citoplasmática, por lo que permite la unión y activación de la proteína G (GTPasas triméricas). La activación de estas proteínas induce cascadas bioquímicas donde la señal del primer mensajero o ligando es transducida al interior de la célula para formar un segundo mensajero (AMPc, IP₃, DAG, Ca²⁺).
- Receptores con actividad catalítica. Son proteínas que sólo atraviesan una vez la membrana citoplasmática. La unión del ligando en la región extracelular, induce la

dimerización de los receptores que pueden autofosforilarse en sus regiones catalíticas citoplasmáticas (receptores con actividad cinasa).

- Receptores intracelulares. Estas proteínas son factores de transcripción inducibles por ligando que participan en la expresión de genes a través de la regulación del complejo general de transcripción. Estos receptores pueden tener una localización citoplasmática (como los receptores para hormonas esteroides) o una localización nuclear (como los receptores para hormonas no esteroides) (Mendoza, 2008).

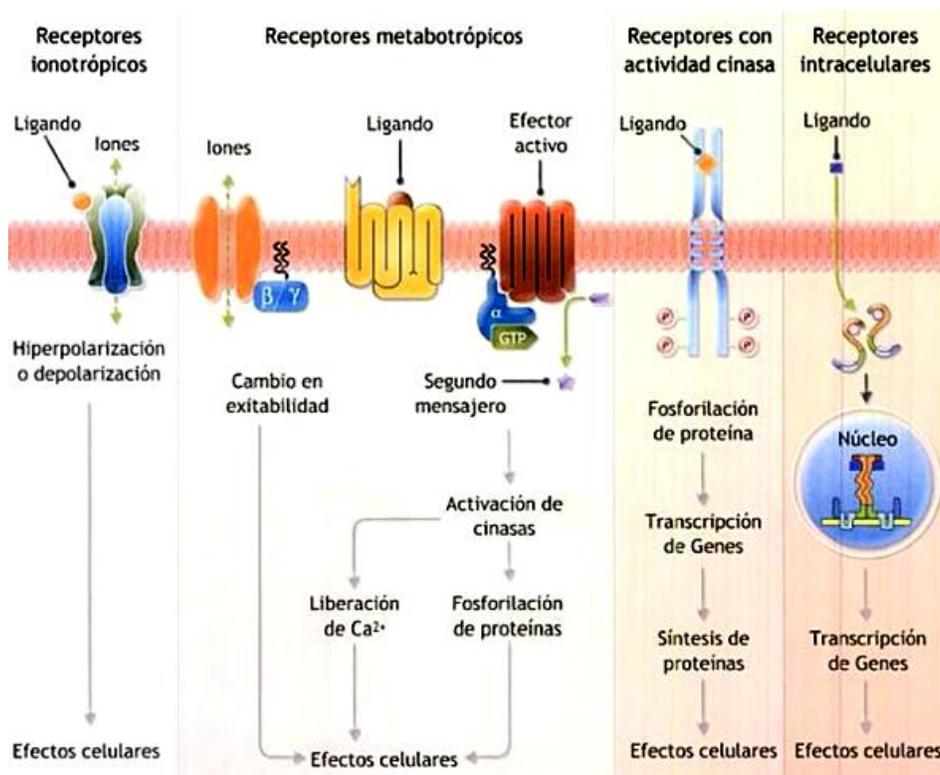


Figura 18. Tipos de receptores (Mendoza, 2008).

1.10. Receptores purinérgicos en el intestino delgado

En el intestino delgado están localizados distintos tipos de receptores entre los que se encuentran los receptores purinérgicos. Los receptores purinérgicos responden a ADP o ATP. El ATP representa la mayor fuente de energía entre los compuestos de fosfatos orgánicos utilizados en el metabolismo (Khakh y col., 2001), también juega un rol

importante en la comunicación intracelular y es liberado en el espacio extracelular como un neurotransmisor de las terminales nerviosas o como una molécula de señalización autocrina o paracrina de las células no neuronales (Rong y col., 2009). Quizás debido a esto, los organismos han desarrollado receptores en la superficie celular para detectar el ATP liberado extracelularmente (Khakh y col., 2001). En los sitios de tejido lesionados o inflamados, las células dañadas liberan grandes cantidades de ATP que pueden interactuar con las células vecinas por vía activación de receptores ionotrópicos P2X y receptores metabotrópicos P2Y (Rong y col., 2009).

Los agonistas constituidos por purinas y los formados por pirimidinas extracelulares son importantes moléculas señalizadoras que median diversos efectos biológicos a través de receptores celulares denominados receptores purinérgicos (Ralevic y Burnstock, 1998). Las señales purinérgicas están involucradas en el control del tono vascular, activación de plaquetas, quimioatracción de células inmunes, la permeabilidad celular y el ATP actúa como un factor de crecimiento para el músculo liso (Glass y col., 2002). Además, están implicadas en transformaciones neoplásicas, embriogénesis, función cardiovascular, regeneración del hueso y músculo, liberación de insulina, inflamación e inmunomodulación, neuroprotección e inhibición del dolor. Diversos estudios de señalización purinérgica en células epiteliales se observa que el ATP y/o UDP extracelular modifican la secreción de Cl^- en varios tipos de células epiteliales y que la regulación del transportador iónico puede ser mediada por los receptores P2 y en algunos casos pueden intervenir los receptores de adenosina (Coutinho-Silva y col., 2004).

Los nucleótidos purinérgicos y pirimidinérgicos no pueden ser transportados a través de la membrana plasmática por simple difusión, por lo que son liberados al medio extracelular por la vía lítica (difusión a través de daños en la membrana plasmática durante un trauma, herida, apoptosis o necrosis) y por mecanismos no líticos (canales liberadores de ATP, proteínas unidas a ATP, transportadores específicos de nucleótidos que facilitan la difusión y por exocitosis de vesículas (Scodelaro y col., 2011).

1.10.1. Receptores P1

Los receptores P1 tiene la capacidad de responder principalmente a la adenosina (Galindo y Flórez, 2006), la cual media una amplia gama de funciones fisiológicas mediante la activación de por lo menos cuatro receptores de superficie celular denominados A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 . Presentan un dominio corto N- terminal extracelular, siete dominios transmembrana y un *loop* corto C-terminal intracelular. Se encuentran acoplados principalmente con la adenilato ciclasa, ya sea de manera negativa (A_1 y A_3) o de manera positiva (A_{2A} y A_{2B} ; Scodelaro y col., 2011). La adenosina es un compuesto biológico altamente activo con una variedad de efectos sobre numerosos tejidos, incluyendo el músculo del corazón, arterias coronarias, las células del músculo liso, plaquetas y células implicadas en las reacciones inmunes e inflamatorias. A través de la interacción con los receptores A_{2A} , la adenosina está implicado en los efectos antiagregantes plaquetarios, las respuestas de neutrófilos antiinflamatorios, así como en la modulación de la función celular inmune (Gessi y col., 2000).

1.10.2. Receptores P2

En 1985, Burnstock y Kennedy, propusieron la primera subdivisión de los receptores P2 de acuerdo con las propiedades moleculares y farmacológicas (Shigematsu y col., 2007; Burnstock y Williams, 2000) como: P2X purinoreceptores (canales ionotrópicos; Burnstock y Williams, 2000), los cuales median la vasoconstricción y contracción visceral del musculo liso con α,β -metileno-ATP como un potente agonista; y los purinoreceptores P2Y (receptores metabotrópicos; Burnstock y Williams, 2000), se encargan de mediar la vasodilatación del músculo liso en el intestino con 2-metiltio-ATP como un agonista particularmente potente (Burnstock, 2000).

La caracterización farmacológica de los receptores P2 se basa generalmente en un orden rango de activación relacionados por agonistas con ATP y UDP, debido a que la mayoría de los receptores antagonistas disponibles son relativamente pocos (Burnstock y Williams, 2000).

1.10.3. Receptores P2X

En los mamíferos los receptores P2X pertenecen a una familia de al menos siete subtipos (P2X₁-P2X₇), están distribuidos en una gran variedad de tejidos y se piensa que desempeñan un papel importante en una gran variedad de procesos fisiológicos, entre ellos, la neurotransmisión, tanto central como periférica, la contracción del músculo liso y procesos inflamatorios (Fernández, 2008; Khakh y col., 2001). El rango de identidad entre las subunidades (P2X₁-P2X₇) se encuentra entre el 26 y el 47%, con una longitud que oscila entre los 379 y los 595 aminoácidos, siendo el P2X₆ el más pequeño, y el P2X₇ el de mayor tamaño (figura 19B) (Khakh y col., 2001).

Los receptores P2X son canales iónicos dependientes de ATP que median de manera rápida y selectiva la permeabilidad para los cationes (Na⁺, K⁺ y Ca²⁺; Ralevic y Burnstock, 1998). Estas subunidades presentan dos dominios transmembranales donde la mayor parte de la proteína se encuentra del lado extracelular, la cual forma un asa de aproximadamente 270 residuos, con el grupo amino y carboxiloterminales en el lado citoplasmático (figura 19A). La presencia de varios residuos de cisteína en esta asa forma puentes disulfuro, los cuales pueden ser importantes al estabilizar el sitio de unión a los ligandos, una situación parecida a lo que sucede con los receptores nicotínicos en la denominada 'asa CysCys' (Galindo y Flórez, 2006).

Kawate y col. (2009) propusieron una estructura cristalina de un canal iónico P2X activado por ATP, en donde muestran cada una de las tres subunidades como un delfín saliendo de la superficie del océano (membrana celular), con la cola sumergida en la bicapa lipídica. La región del cuerpo de tres "delfines" mutuamente entrelazadas de manera que rodean una cavidad central vertical (figura 20).

Para los subtipos de los receptores P2X las proteínas son deducidas a partir de las secuencias de cDNA. En *Northern Blot* y en la hibridación *in situ* muestran una distribución amplia del mRNA con P2X₁ el cual se localiza en músculo liso, P2X₄ y P2X₆ se expresan más fuertemente en cerebro, P2X₃ se encuentra únicamente en neuronas

sensoriales y P2X₇ domina en células del sistema inmune. Los subtipos P2X₁ y P2X₄ forman canales homomultímeros cuando se expresan en ovocitos o en líneas celulares de mamífero; el número de subunidades por canal, no está bien establecido, se cree que es de tres o cuatro (Burnstock, 2000).

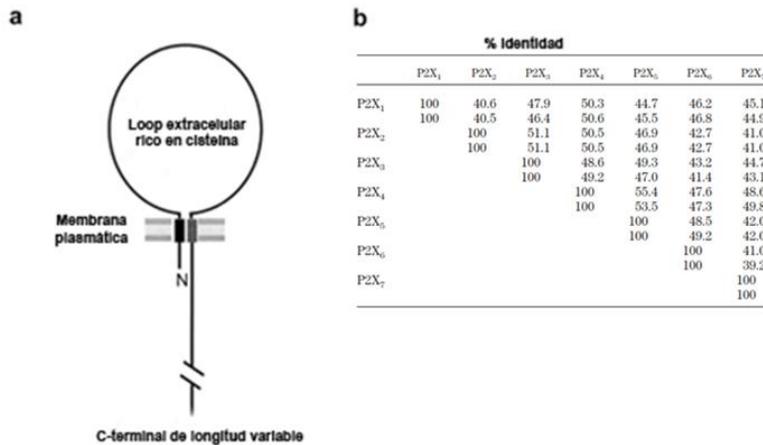


Figura 19. Topología de las subunidades del recetor P2X con sus similitudes. a) Representación esquemática que representa actuales de la topología de las subunidades P2X. b) porcentaje de identidad entre las siete subunidades P2X en rata (Modificado de Khakh y col., 200; North 2002).

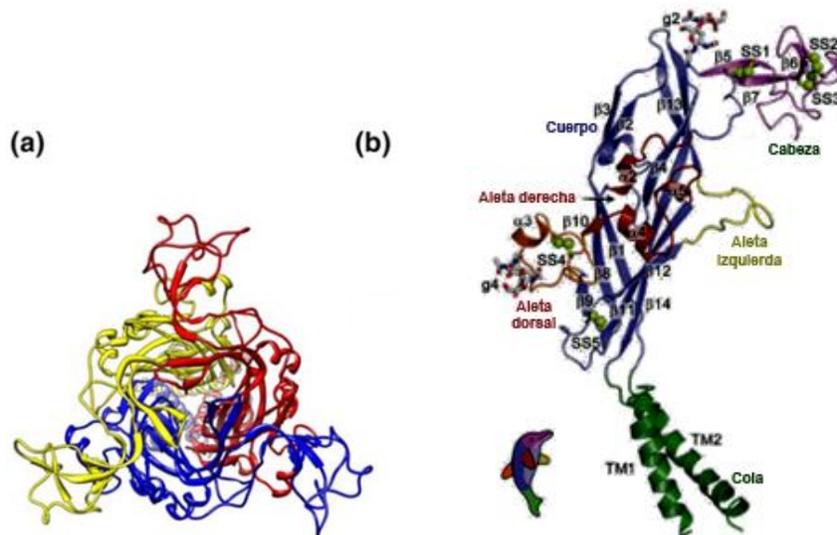


Figura 20. Representación de la estructura de las tres subunidades que forman a un receptor P2X. (a) modelo de un trímero P2X₂, observado a lo largo desde sitio extracelular con cada subunidad señalada de colores diferentes. (b) Una subunidad observada paralelamente al plano de la membrana con un perfil de delfín (modificado de Kawate y col. (2009).

La unión del ATP a un sitio del *loop* extracelular del receptor P2X (figura 21), provoca un cambio conformacional en la estructura del canal provocando la apertura del canal ion-permeable, permitiendo que ciertos cationes, como el Na^+ y Ca^{2+} , entren a la célula induciendo la despolarización de la membrana celular y activando los procesos intracelulares sensibles a Ca^{2+} . El tiempo del estado abierto del canal iónico P2X depende de la subunidad de estos receptores. Por ejemplo, los canales de los receptores P2X₁ Y P2X₃ son desensibilizados en presencia de ATP, mientras que los canales de los receptores P2X₂ quedan abiertos durante un tiempo mayor en presencia de ATP (Petrushenko, 2012).

Se cree que tres moléculas de ATP son necesarias para la activación de los receptores P2X. Esto supone que las moléculas de ATP se unen a las tres subunidades que proporcionan la apertura del canal iónico. La activación de los receptores P2X incrementa la excitabilidad de la célula y aumenta la liberación de aminoácidos excitatorios. Cuando esta intensidad es suficientemente fuerte, una respuesta nociceptiva puede iniciarse; llegando a provocar que el proceso de apoptosis inicie en las células (Petrushenko, 2012).

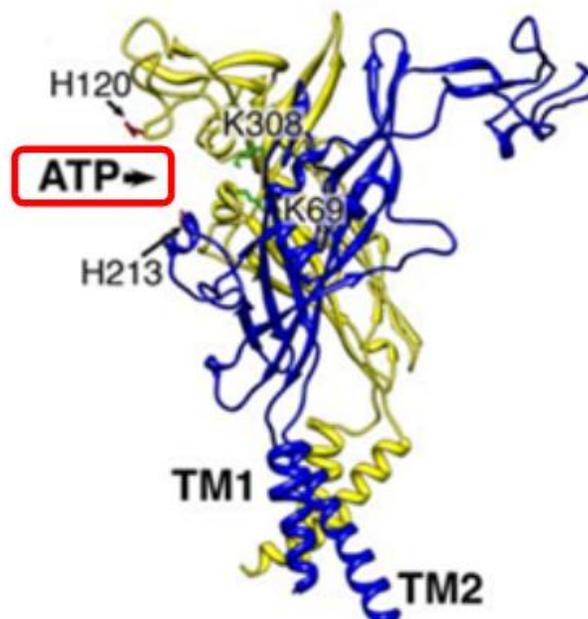


Figura 21. Estructura de las subunidades del receptor P2X₂ representando el sitio de unión para el ATP (Browne y col. 2010).

Los receptores P2X no exponen ninguna de las secuencias conservadas de nucleótidos que caracteriza al sitio de unión en un gran número de proteínas intracelulares tal como las cinasas. Por el contrario, en una comparación con las secuencias que están distantemente relacionadas a través de la filogenia (por ejemplo, las algas, las amebas del mohó, coanoflagelados) pero que son conocidos para formar canales funcionales muestran que relativamente pocos de los 280 residuos de los dominios extracelulares están muy conservados en todos los receptores. La estructura del modelo sitúa a la mayoría de estos residuos conservados dentro o adyacentes a la cavidad formada entre la región del cuerpo de dos subunidades (figura 22) (Browne y col. 2010).

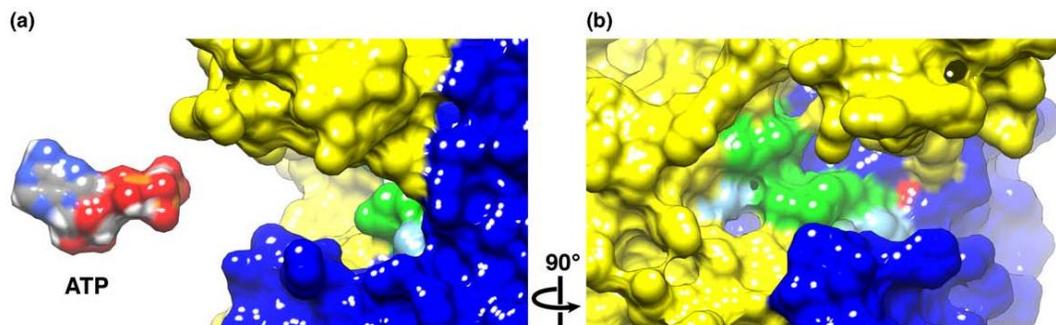


Figura 22. Modelo espacial del sitio de unión al ATP. (a) y (b) modelos espaciales a 90° observando el sitio de unión para el ATP formado entre las subunidad adyacentes (mostradas en azul y amarillo) (Browne y col., 2010).

De los siete subtipos del receptor P2X, únicamente P2X₆ es incapaz para formar receptores homómeros funcionales, y estos son retenidos dentro del RE. Los subtipos P2X₂ y P2X₄ pueden formar heterodímeros, produciendo receptores con propiedades diferentes a los receptores progenitores. Por ejemplo, la permeabilidad del calcio en el heterómero P2X_{2/6} es significativamente grande que el monómero de P2X₂. Esto podría tener consecuencias importantes en la transmisión sináptica, debido a estas dos subunidades coinciden pre- y postsinápticamente en su distribución. De hecho, las subunidades P2X₂, P2X₄ y P2X₆ se han reportado por ser coexpresadas en varias áreas del SNC. Fuera del SNC, P2X₆ se expresa con P2X₄ en las células del endotelio vascular y en las células epiteliales en riñón (Ormond y col., 2006).

El receptor P2X₄ se ha identificado como un miembro distinto de la familia de los receptores P2X, cuando se demostró que un único producto génico era suficiente para formar canales iónicos con distintas propiedades físicas y farmacológicas. Este tipo de receptor también forma heterómeros funcionales con las subunidades P2X₁ y P2X₆, y que también puede interactuar con P2X₇ (Stojilkovic y col., 2010). El receptor P2X₄ se encuentra ampliamente distribuido en el SNC y ha sido reportado como el más importante de los receptores para el ATP liberado en la sinapsis en el SNC (Khakh y col., 2001).

García-Alcocer y col. (2012) estudiaron la distribución de los receptores P2X₄ y P2X₆ en las regiones proximal y distal del intestino delgado de las ratas recién nacidas y adultas utilizando la técnica de diaminobencidina, reportando que se encontraron presentes en células epiteliales y de los vasos capilares. En ambas regiones proximal y distal de ratas recién nacidas, observaron señal del receptor P2X₄ en las células epiteliales, mientras que P2X₆ estaba presente en los vasos capilares en la región proximal y en menor medida en la región distal. En ambas regiones del intestino adulto, se observó inmunotinción de los receptores P2X₄ y P2X₆ en los vasos capilares.

En 1966, Graham y Karnovsky fueron los primeros en emplear la diaminobencidina para demostrar la actividad de la peroxidasa del rábano, inyectada al ratón, durante su absorción en los túbulos proximales del riñón de este roedor. Posteriormente se empezó a utilizar para el revelado de la actividad peroxidasa de la enzima utilizada como marcador directo. Sin embargo, en 1968, Griswold realizó unos estudios sobre su carcinogenicidad por lo que se ha impulsado a buscar otras alternativas (Montero, 1998).

La inmunohistoquímica (IHQ) es un método para la localización específica de antígenos en tejidos o células basado en el reconocimiento de un anticuerpo. Alberts Coons desarrollo por primera vez la técnica de inmunofluorescencia en 1941 para detectar ciertos antígenos presentes en un tejido congelado (Dabbs, 2013). El uso de anticuerpos para localizar estructuras en cultivos células y en secciones de tejido es un

método muy utilizado y altamente productivo en la investigación biomédica para la identificación de proteínas y otras macromoléculas (Burry, 2011). La base de la IHC es simple y comprende tres disciplinas científicas; inmunología, histología y química. El concepto fundamental detrás de la IHC es la demostración de antígenos (Ag) dentro de las secciones del tejido por medio de anticuerpos específicos (Ac). Una vez que el complejo antígeno-anticuerpo (Ag–Ac) está formado, se realiza una reacción histoquímica de color visible por microscopía de luz o fluorocromos con luz ultravioleta. Aunque conceptualmente es simple, la metodología de la IHC se ha vuelto más compleja a medida que se establezcan metas más estrictas de sensibilidad y especificidad (Ramos-Vara 2005).

2. HIPÓTESIS

La distribución de los receptores P2X₄ en las regiones proximal y distal del intestino de rata cambian durante el desarrollo.

3. OBJETIVOS

3.1. General

Comparar la expresión de los receptores P2X₄ durante la ontogenia de intestino de rata mediante inmunofluorescencia.

3.2. Específicos

- Determinar la marca inmunofluorescente de los receptores P2X₄ en intestino proximal de ratas neonatas.
- Estudiar la marca inmunofluorescente de los receptores P2X₄ en intestino distal de ratas neonatas.
- Conocer la marca inmunofluorescente de los receptores P2X₄ en intestino proximal en ratas adultas.
- Determinar la marca inmunofluorescente de los receptores P2X₄ en intestino distal de ratas adultas.
- Comparar la marca inmunofluorescente de los receptores P2X₄ en las distintas regiones del intestino y en las diferentes edades,

4. METODOLOGÍA

4.1. Materiales y reactivos

4.1.1. Animales

Se usaron tres ratas adultas (90 días) y tres ratas neonatas (recién nacidas, P0) *Sprague Dawley* las cuales se mantuvieron a una temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con ciclos de luz-oscuridad de 12h y con libre acceso a agua y alimento.

4.1.2. Reactivos

- Solución buffer de sales de fosfatos (PBS) 1X
- Solución de paraformaldehído (PFA) al 4%
- Sacarosa al 30% en PBS 1X
- Solución buffer de fosfato con tritón X-100 (PBT) al 0.5%
- Adhesivo para tejidos tissue-tek
- Anticuerpo primario contra P2X₄ de conejo (Invitrogen)
- Anticuerpo secundario anticonejo, Alexa 568 (Invitrogen)

4.1.3. Materiales

- Estuche de disección
- Cajas petri
- Tubos eppendorf de 2 mL
- Tubos falcón de 15 mL
- Cajas de refrigeración 4°C (Cryo-Safe™)
- Refractarios de vidrio con tapa
- Vasos de precipitados
- Laminillas y Cubreobjetos

4.1.4. Equipos

- Estereoscopio (ZEISS, SstemiDV4)
- Crióstato (Leica CM 1850)
- Microscopio de fluorescencia (ZEISS) acoplado a una cámara digital AxioCam MRC (ZEISS)
- Plato caliente con agitación
- Balanza analítica
- Refrigerador (4°C), congelador (-20°C) y ultracongelador (-70°C).

4.2. Métodos

4.2.1. Extracción y manipulación de tejidos

El día de nacimiento de las ratas se consideró como P0, éstas fueron decapitadas a través de disección, y se extrajo la porción proximal y distal del intestino delgado. Para las ratas adultas se anestesiaron con 40 mg/Kg de pentobarbital sódico vía intraperitoneal, posteriormente se abrió la cavidad abdominal y se removió el intestino delgado, tomando un corte de la parte plegada al estómago (proximal) y otra de la parte más alejada antes de llegar al colon (parte distal), los cortes se pasaron a una caja petri con PBS 1X.

Los cortes se limpiaron de cualquier residuo de alimento que pudieran tener los intestinos, se abrieron longitudinalmente con ayuda de un bisturí y observando en el estereoscopio. Posteriormente se realizaron cortes de 1 a 1.5 cm y se colocaron en una solución de paraformaldehído al 4% a 4°C, se refrigeraron a 4°C y se dejaron en esta solución fijadora por tres horas. Una vez transcurrido el tiempo de fijación se enjuagaron en PBS 1X, se pasaron los tejidos a una solución de sacarosa al 30% en PBS 1x y se llevaron a refrigeración por 30 minutos. Posteriormente se montaron los tejidos en cajas de papel aluminio con *tissue-tek*, y se congelaron a -70°C. Por último se realizaron los cortes longitudinales de 12 μ m de espesor de los tejidos utilizando el

criostato Leica, los cuales fueron colocados en portaobjetos con 4 cortes en cada laminilla, los cuales se guardaron a -20°C hasta su uso.

4.2.2. Inmunohistoquímica para los receptores purinérgicos P2X₄

Para la inmunohistoquímica (IHQ) se preparó una cámara húmeda, la cual consistió en colocar un papel absorbente dentro de un refractario de vidrio con tapa, se atomizó suficiente agua destilada para impregnar el papel, sin que se presentara un exceso de agua. Las laminillas se colocaron con los tejidos de manera separada. El primer paso fue realizar 3 lavados con PBS 1X de 10 minutos cada uno. Posteriormente se adicionaron 300 µL de la solución bloqueadora, la cual contiene BSA al 3%, poli-L-lisina (2mg/mL) en PBT al 0.5%, se dejó incubar por 30min a temperatura ambiente, cuidando de cerrar perfectamente la cámara. Una vez terminado este tiempo, se volvieron a realizar 3 lavados con PBT al 0.5% de 10 minutos cada uno. Se agregó a cada laminilla 300 µL de una dilución 1:50 de anticuerpo primario P2X₄ de conejo en PBT al 0.5%. La laminilla “blanco” sólo se le adicionó 300 µL de PBT al 0.5%. La cámara húmeda se dejó incubar a 4°C durante toda la noche.

Una vez que transcurrió esta incubación, se realizaron 3 lavados con PBT de 10 minutos cada uno. A todas las laminillas (muestras y blanco) se les adicionó 300 µL de una dilución 1:2000 del anticuerpo secundario anticonejo (Alexa 568) con PBT, se dejó incubar por 2 horas en la oscuridad. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBT al 0.5%. Cada laminilla se secó en la parte posterior al tejido, con papel absorbente para eliminar el exceso de PBT, se les adicionó una gota de glicerol y se les colocó el cubreobjetos. Todas las laminillas fueron protegidas de la luz, en su manipulación.

Una vez que se fijaron las laminillas se observaron al microscopio de fluorescencia con objetivos de 10X y 100X, donde se analizaron los resultados que fueron documentados con microfotografías.

5. RESULTADOS

La estandarización de la técnica de inmunohistoquímica fue realizado en estudios previos (Padilla, 2011) en el cual se tiene que el tiempo adecuado es de 6 horas en *p*-formaldehído al 4%, debido a que el tiempo de fijación es una de las etapas más importantes en el proceso de la preparación del tejido ya que permite preservarlo evitando la autólisis y ataque bacteriano, evitando también el cambio de forma y volumen. Al parecer los fijadores tienen la propiedad de formar puentes entrecruzados entre las proteínas para formar un gel y con ello mantener la estructura en su relación y posición originales (Aguilar, 2003).

Una vez que se tuvieron los cortes de los tejidos montados en los cubreobjetos se observaron a través del microscopio óptico con la finalidad de comprobar que las vellosidades del intestino delgado en las diferentes regiones estuvieran intactas y así determinar si las características morfológicas de los tejidos han sido dañadas durante este proceso. Los cortes siempre se mantuvieron en hielo cuando se estaban analizando para evitar que se descongelaran antes de ser tratados.

Con el propósito de determinar la presencia de marca inespecífica debido a que el anticuerpo secundario pueda unirse a un antígeno que no corresponda al receptor P2X₄ en el tejido, se realizó un control blanco el cual se manipuló de la misma manera que las muestras sólo que no se le adicionó el anticuerpo primario contra el receptor P2X₄. En la figura 23 y figura 24 se muestran los controles blanco en las diferentes regiones del intestino de rata neonata y adulta, respectivamente, donde se observa que no presentan marca inespecífica.

La laminilla de control negativo también se manipuló de la misma manera que las muestras con la diferencia de que no se le adicionó ninguno de los anticuerpos utilizados. Este control negativo nos indica si existen sustancias autofluorescentes en tejido que pudieran dar un falso positivo en la marca inmunoreactiva de las muestras. En la figura 25 corresponde al control negativo de ratas neonatas (región distal y

proximal) y la figura 26 al control negativo de las ratas adultas (región distal y proximal) en donde se observa que no están presentes sustancias autofluorescentes.

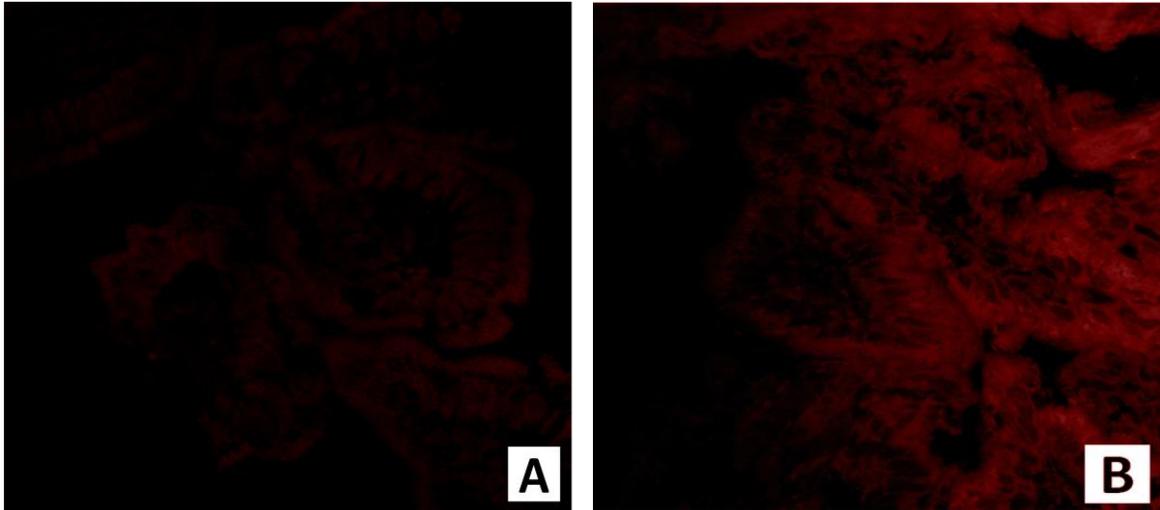


Figura 23. Microfotografías de laminillas control blanco de las vellosidades de intestino de rata neonata utilizando el anticuerpo secundario Alexa 568. Las vellosidades corresponden a la región proximal (A) y la región distal (B) del intestino delgado. No se observa marca inmunoreactiva inespecífica. Aumento: 100X.

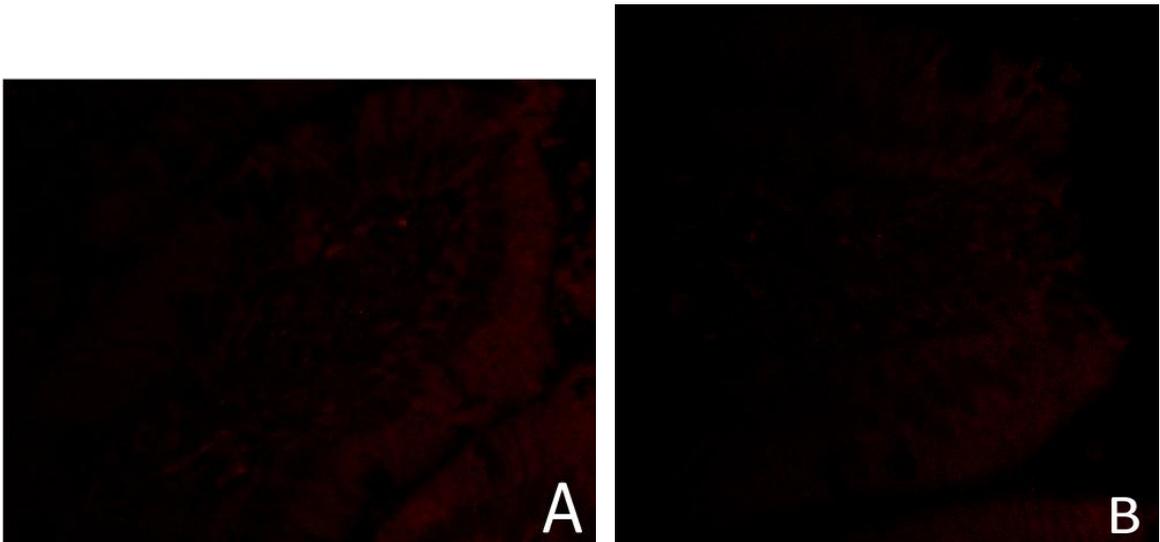


Figura 24. Microfotografías de laminillas control blanco de las vellosidades de intestino de rata adulta utilizando el anticuerpo secundario Alexa 568. Las vellosidades corresponden a la región proximal (A) y la región distal (B) del intestino delgado. No se observa marca inmunoreactiva inespecífica Aumento: 100X.

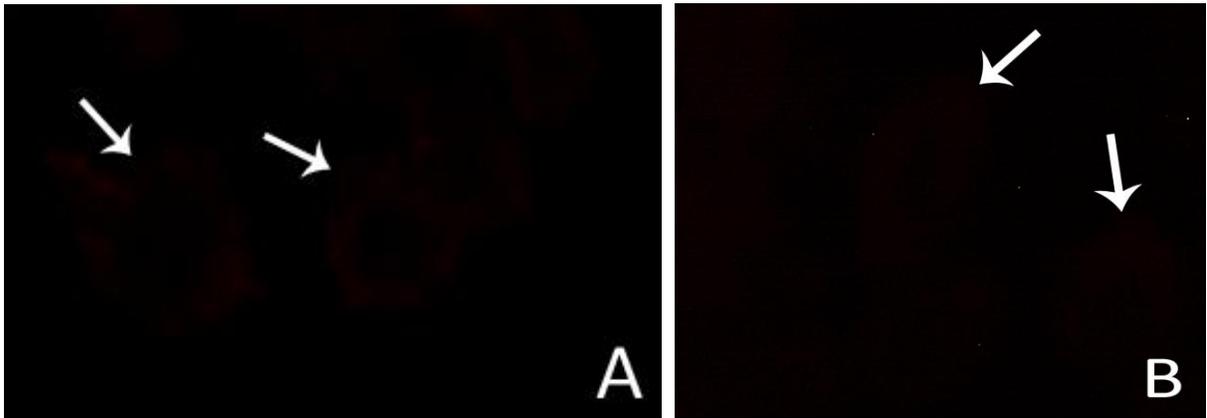


Figura 25. Microfotografía de la laminilla control negativo sin ningún anticuerpo utilizado en el tejido del intestino delgado en ratas neonatas, en donde se observa que no se presenta autofluorescencia en el tejido. Las flechas blancas muestran el borde de la vellosidad de la región proximal (A) y la región distal (B). No se observa marca autofluorescente. Aumento: 100X.

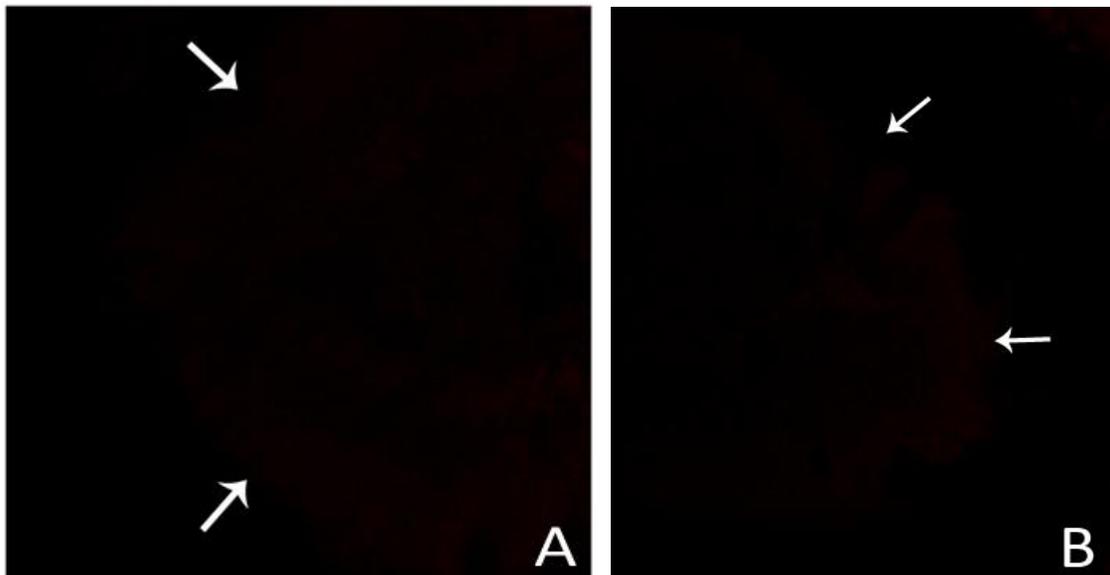


Figura 26. Microfotografía de la laminilla control negativo sin ningún anticuerpo utilizado en el tejido del intestino delgado en ratas adultas, en donde se observa que no se presenta autofluorescencia en el tejido. Las flechas blancas muestran el borde de la vellosidad de la región proximal (A) y de la región distal (B). No se observa marca autofluorescente. Aumento: 100X.

En todas las muestras de las laminillas de los tejidos en las diferentes regiones del intestino que fueron empleadas como muestras llevaron el mismo tratamiento, siendo que para el anticuerpo primario contra el receptor P2X₄ se utilizó una dilución de 1:50 y para el anticuerpo secundario (Alexa 568) se utilizó una dilución de 1:2000. Para ambas diluciones se prepararon en una solución buffer de fosfatos con tritón X-100 al 0.5% (PBT 0.5%).

En los cortes de la región proximal del intestino delgado en ratas neonatas, P0 proximal, se puede observar que no se presenta marca inmunoreactiva del receptor P2X₄ (figura 27), mientras que en la región distal en las ratas neonatas, P0 distal, la marca inmunoreactiva se observa en la región de las células epiteliales intestinales (figura 28).



Figura 27. Microfotografía de las vellosidades en región proximal del intestino delgado de ratas neonatas, P0 proximal, utilizando el anticuerpo secundario Alexa 568. Se puede observar que no se presenta marca inmunoreactiva hacia el receptor P2X₄. Aumento: 100x.

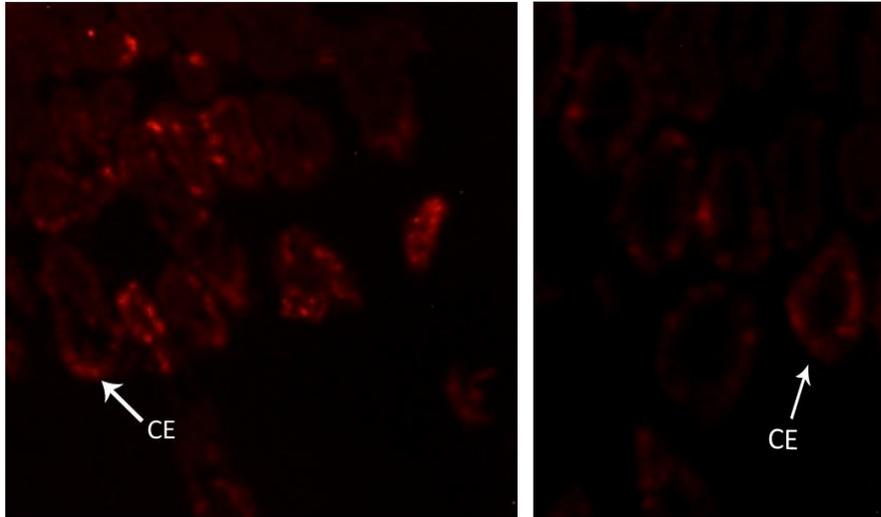


Figura 28. Microfotografía de las vellosidades en la región distal del intestino delgado de ratas neonatas, P0 distal, utilizando el anticuerpo secundario Alexa 568. Se puede observar que la marca inmunoreactiva hacia el receptor P2X₄ se presenta en la región de las células epiteliales intestinales (CE) que se encuentran en el borde de las vellosidades. Aumento: 40x.

En cuanto a la distribución de los receptores P2X₄ en las laminillas de la región proximal del intestino delgado en rata adulta, Ad proximal, se observa que la marca inmunoreactiva se encuentra presente en los vasos capilares de las vellosidades (figura 29). De igual manera se observa que la marca inmunoreactiva en las laminillas de la región distal, Ad distal, también está presente en la región de los vasos capilares (figura 30).

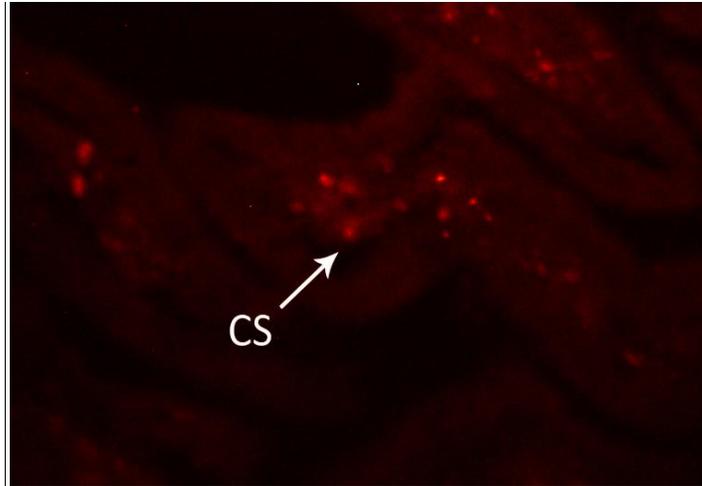


Figura 29. Microfotografía de las vellosidades de la región proximal del intestino delgado de ratas adultas, Ad proximal, utilizando el anticuerpo secundario Alexa 568. Se puede observar que la marca inmunoreactiva hacia el receptor P2X₄ se presenta en la región de los capilares sanguíneos (CS) que se encuentran en la parte media de la vellosidad. Aumento: 100x.

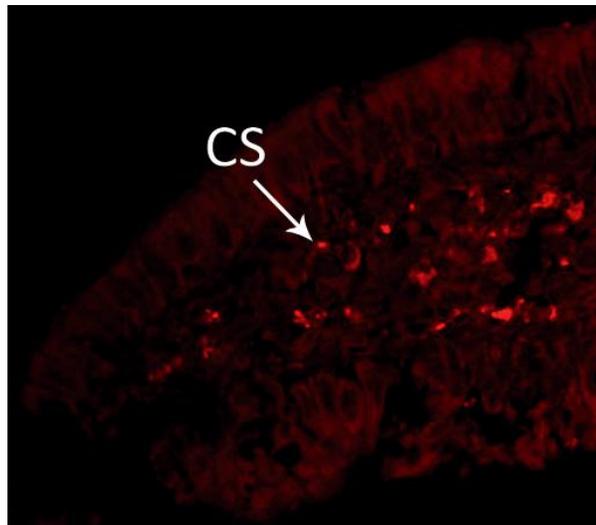


Figura 30. Microfotografía de la vellosidad en la región distal del intestino delgado de ratas adultas, Ad distal, utilizando el anticuerpo secundario Alexa 568. Se puede observar que la marca inmunoreactiva hacia el receptor P2X₄ se presenta en la región de los capilares sanguíneos (CS) que se encuentran en la parte media de la vellosidad. Aumento: 100x.

6. DISCUSIÓN

La técnica de inmunohistoquímica se basa en el uso de anticuerpos marcados con reactivos específicos para la localización precisa de componentes de tejido (antígenos) *in situ* por lo cual se decidió utilizar esta técnica para realizar el estudio de la distribución de los receptores P2X₄ durante la ontogenia de intestino de rata. Entre las condiciones especiales para la inmunohistoquímica se encuentra la presentación del antígeno en el tejido, la tinción específica y sensible en ausencia de tinción no-específica y anticuerpos bien caracterizados.

La manera de que una reacción inmunohistoquímica pueda ser observada con un microscopio es por medio de una marca visible. Los compuestos fluorescentes requieren la excitación con luz a una longitud de onda específica para hacerlos emitir luz visible. La fluorescencia proporciona una marca visible con un contraste excelente cuando se observa contra un fondo oscuro (no fluorescente). La técnica de inmunohistoquímica indirecta, que es la que se llevo a cabo para el análisis de las muestras, se lleva a cabo empleando dos capas, la primera capa es el anticuerpo primario desarrollado contra el antígeno de interés, que para este estudio es el receptor P2X₄, y la segunda capa consiste en un anticuerpo secundario marcado, el cual es desarrollado contra inmunoglobulinas de la especie donde se obtiene el primer anticuerpo (Aguilar, 2003).

Los resultados obtenidos de varios estudios realizados sobre los diferentes tipos de receptores P2X han confirmado que juegan un importante papel en numerosos procesos fisiológicos y que su expresión puede ser alterada por diversas condiciones, por lo cual se comparó la marca inmunoreactiva de los receptores P2X₄ a diferentes edades del intestino delgado de las ratas para ver si su distribución es afectada durante la ontogenia. Las muestras de intestino delgado en las regiones proximal y distal se obtuvieron de ratas neonatas las cuales fueron sacrificadas con menos de las 8h de nacimiento, y de ratas adultas fueron sacrificadas después de los 90 días de nacimiento.

La marca inmunofluorescente del intestino distal de las ratas neonatas se observa en la región de las células epiteliales intestinales, siendo consistente con los resultados reportados por García-Alcocer y col. (2012), por lo que se podría suponer que el receptor purinérgico P2X₄ se encuentra relacionado con el desarrollo (proliferación y diferenciación) de estas células presentes en las vellosidades. Yamamoto y col. (2000) demostraron que el receptor P2X₄ se expresa principalmente en células endoteliales vasculares y es el mayor contribuyente de la entrada de flujo de Ca²⁺ en este tipo de células. Entre las principales funciones que desempeña el Ca²⁺ dentro del organismo es la regulación de la actividad normal de enzimas, en el mantenimiento de la permeabilidad normal de las membranas celulares (Horrobin, 1976), en la liberación de neurotransmisores, iniciación de la contracción muscular, función estructural en huesos y dientes, función enzimática como cofactor en los factores de coagulación, y función de señalización como mensajero secundario intracelular (Swaminathan, 2011).

Los nucleótidos de purina extracelular, como el ATP, desempeñan un papel importante como moléculas de señalización en las complejas interacciones entre las neuronas y los músculos que regulan los movimientos intestinales (motilidad) (Bornstein, 2007). El ATP se sintetiza principalmente a través de la fosforilación oxidativa mitocondrial, sin embargo, una parte se recoge y se almacena en vesículas sinápticas. A través de la actividad neuronal fisiológica es liberado en el espacio extracelular (Sperlagh y col., 2012). El control básico de la motilidad intestinal depende de la actividad de las neuronas del Sistema Nervioso Entérico (SNE) (Bornstein, 2007). Aunque el SNE puede funcionar independientemente del SNC, este último tiene un papel importante en la coordinación de la actividad de los intestinos a través de la división simpática y parasimpática (Burnstock, 2008).

Muchas de las vías de señalización que controlan el metabolismo celular, la supervivencia y la diferenciación son activados por la elevación de la concentración de Ca²⁺ intracelular, niveles que aumentan después de la activación de los receptores purinérgicos. Entre las diferentes vías de coordinación de señalización intracelular, el más prominente es la señalización de calcio intracelular, el control de diversos procesos

celulares incluyendo la proliferación, motilidad, la apoptosis y la diferenciación. La activación de canales ionotrópicos, como es el receptor P2X₄, desencadena el aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular provocados por el flujo de calcio extracelular. Esta concentración de iones Ca²⁺ transitorios induce la proliferación y diferenciación de la célula (figura 31) (Glaser y col., 2013).

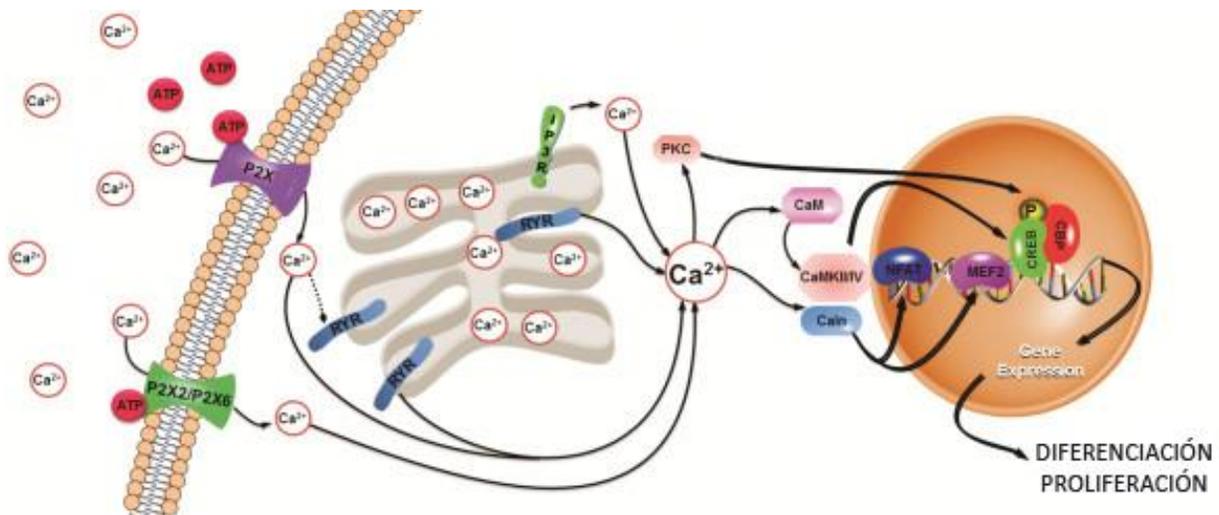


Figura 31. Transducción de señal mediada por el receptor P2X, dando como resultado el aumento de [Ca²⁺]_i que provoca la diferenciación y proliferación (modificado de Glaser, 2013).

Coutinho-Silva y col. (2001) estudiaron la expresión de los siete subtipos de los receptores P2X en el páncreas durante el desarrollo de la rata, encontrando que el receptor P2X₄ se expresa en pequeñas cantidades en los islotes de las ratas neonatas y va aumentando durante la transición del recién nacido hasta la vejez. Al no observarse marca inmunofluorescente en el intestino proximal de las ratas neonatas, en este estudio, indicaría que el receptor se expresa en cantidades mínimas por lo que la marca inmunoreactiva no es detectable a través del microscopio. Gröschel y col. (1999) sugiere que los receptores P2X₄ pueden estar implicados en los procesos de maduración en las células caliciformes. La expresión de estas cantidades mínimas del receptor P2X₄ podría estar relacionado a que las células caliciformes aumentan en cantidad desde la porción proximal (duodeno) hasta la porción distal (íleon) (Ross y Pawlina, 2007), por lo que afecta en la marca inmunofluorescente del receptor P2X₄.

La marca inmunofluorescente del receptor P2X₄ en la región proximal y distal en el intestino de rata adulta se presenta en los vasos capilares de las vellosidades, donde se observa que en la región proximal es más fuerte que en la región distal. Khakh y col. (2001) realizaron una revisión sobre las propiedades de los receptores P2X, en donde mencionan el porcentaje de identidad que existe entre los subtipos de esta familia, en donde el receptor P2X₄ presenta un porcentaje de identidad del 46.6% con P2X₁, 39.2% con P2X₂ y 40.5% con P2X₃. Gröschel y col. (1999) reportaron que el receptor P2X₁ se expresa en el plexo capilar de la vellosidad en el duodeno de rata, pero que no se extiende a la región de las criptas, sugiriendo que están involucrados en la absorción y el transporte de metabolitos. Por lo tanto, con los resultados de este trabajo se puede proponer que el receptor P2X₄ en la región proximal y distal del intestino delgado en ratas adultas, también juega un papel importante en la absorción y transporte de metabolitos, tomando en cuenta el porcentaje de identidad que tiene con el receptor P2X₁.

Comparando la marca inmunoreactiva entre las ratas neonatas y las ratas adultas, se observa, tanto en la región proximal como en la distal, que el receptor P2X₄ se expresa en mayor cantidad en la edad adulta. La mucosa intestinal es una estructura dinámica que sufre cambios bioquímicos, estructurales y morfológicos a lo largo del desarrollo. Las células de absorción en el intestino delgado tienen la capacidad de adaptar su estructura y función en respuesta de los cambios debido al contenido de nutrientes (Jarocka-Cyrta y col., 1998). Durante el desarrollo del tracto gastrointestinal sufre cambios notables en muchas propiedades fisiológicas y anatómicas. El notable grado de coordinación entre el desarrollo de las funciones gastrointestinales sugiere que los procesos pueden ser señalizados por algunos factores, tales como el destete, la ingesta de nutrientes y hormonas (Perin y Thomson, 1998).

El destete es el proceso gradual de la sustitución de la alimentación con leche materna a una mayor gama de nutrientes ingeridos. Se ha visto que en ratas de laboratorio y en lactantes humanos existe una asociación del destete con el crecimiento epitelial en las

vellosidades y en las criptas. Tayoda y col. (1986) reportaron que los receptores P2X₅, involucrados en el crecimiento y maduración de las células caliciformes, están relacionados con factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidérmico. En los estudios realizados por Stoddart y Widdowson (1976) demostraron que la leche materna contiene un factor de crecimiento que estimula el crecimiento intestinal después del nacimiento. En los lactantes humanos, la longitud y la proliferación de las criptas es de 31% y 68% mayores, respectivamente, a los valores para los adultos (Cummins y Thompson, 2002).

Padilla (2011) estudió los cambios ontogénicos del receptor purinérgico P2X₆ en el intestino de rata, en donde propone que las diferencias encontradas en la expresión de este receptor se pueden deber a una formación de empalmes heteroméricos con otros receptores purinérgicos presentes en el tejido. Khakh y col. (2001) mencionan que las subunidades P2X₄ forman un receptor heteromérico con las subunidades P2X₆ cuando se coexpresan en los oocitos de *Xenopus* y en células HEK293, en donde las combinaciones heteroméricas de P2X_{4/6} se consideran formas predominantes en comparación a su receptor nativo (Burnstock y Verkhratsky, 2012). Yu y col. (2010) reportaron que los receptores P2X₆ tienden a formar empalmes heteroméricos con los receptores P2X₂ y P2X₄ en las neuronas sensoriales y en los macrófagos en el tracto gastrointestinal de rata, respectivamente, por lo que probablemente estén implicados en la regulación de las funciones fisiológicas. Nieto-Pescador y col. (2013) encontraron que el receptor P2X₄ se encuentra en combinación con el receptor P2X₅ en las neuronas del plexo mientérico en el yeyuno de ratones, pero no encontraron señal de que se formaran receptores heteroméricos con los receptores P2X₂ y P2X₇.

Por lo tanto, podría indicar que el cambio de la alimentación de la leche materna a una dieta más alta nutrientes influye en la expresión de los receptores P2X₄, dando como resultado que a edades tempranas se encuentre este receptor en las células epiteliales y en adultos se presente en los vasos capilares.

7. CONCLUSIONES

- La expresión los receptores P2X₄ aumenta durante la ontogenia del intestino delgado de rata.
- En el intestino de las ratas neonatas la marca inmunoreactiva se presenta en las células epiteliales y en adultos se presenta en los capilares sanguíneos de las vellosidades.
- En el intestino de las ratas neonatas la marca inmunoreactiva se presenta en mayor grado en la región distal y en menor grado en la región proximal.
- En el intestino de las ratas adultas se presenta una mayor marca inmunoreactiva en la región proximal y en menor grado en la región distal.

8. REFERENCIAS

Alberts B. Biología celular. Segunda edición. México: Editorial Médica Panamericana, **2006**: 538.

Aguilar L. Adaptación de un método de inmunohistoquímica para el estudio de la expresión neonatal de C-FOS inducida por la distensión gástrica en el tallo cerebral de ratas. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título Licenciado Químico Farmacéutico Biólogo, **2003**: 3.

Anderson R., Bergner A., Taniguchi M., Fujisawa H., Forrai A., Robb L., Young H. Effects of different regions of the developing gut on the migration of enteric neural crest-derived cells: A role for Sema3A, but not Sema3F. *Developmental Biology*. **2007**; 305: 287– 299.

Andreu P., Colnot S., Godard C., Gad S., Chafey P., Niwa-Kawakita M., Laurent P., Kahn A., Robine R., Perret C., Romagnolo B. Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine. *Development and disease*. **2005**; 132: 1443– 1451.

Bornstein J. Purinergic mechanism in the control of gastrointestinal motility. *Purinergic Signalling*. **2007**; 4: 197– 212.

Browne L., Jiang L., North R. New structure enlivens interest in P2X receptors. *Pharmacological Sciences*. **2010**; 31: 229– 237.

Burnstock G. P2X receptors in sensory neurons. *British Journal Anaesthesia*. **2000**; 84: 476- 488.

Burnstock G. The journey to establish purinergic signalling in the gut. *Neurogastroenterology Motility*. **2008**; 20: 8– 19.

Burnstock G., Verkhratsky A. *Purinergic Signalling and the Nervous System*. London. Springer Editorial, **2012**: 165.

Burnstock G., Williams M. P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. **2000**; 295: 862– 869.

Burry R. Controls of histochemistry and cytochemistry. *Journal Histochemistry Citochemistry*. **2011**; 59: 6– 12.

Bustamante E. El sistema nervioso. Primera edición. Colombia: Editorial Antioquia, **2007**: 109– 112.

Coutinho-Silva R., Parsons M., Robson T. Burnstock G. Changes in expression of P2 receptors in rat and mouse pancreas during development and ageing. *Cell Tissue Research.* **2001**; 306: 373– 383.

Coutinho-Silva R., Stah L., Cheung K., Enes N., De Oliveira C., Ojcius D., Burnstock G. P2X and P2Y purinergic receptors on human intestinal epithelial carcinoma cells: effects of extracellular nucleotides on apoptosis and cell proliferation. *American Journal of Physiology.* **2004**; 288: G1024– G1035.

Cummins A., Thompson F. Effect of breast milk and weaning on epithelial growth of the small intestine in humans. *Gut.* **2002**; 51: 748– 754.

Curtis H., Schnek. *Biología.* Séptima edición. Chile: Editorial Médica Panamericana, **2008**: 614, 616.

Dabbs D. Fourth edition. *Diagnostic Immunohistochemistry: theranostic and genomic applications.* United States of America: Elseviere, **2013**: 1.

De la Torre R. Estudio de la regulación de la expresión de genes en células epiteliales intestinales en respuesta a los fenómenos de diferenciación y apoptosis [monografía de internet]. Granada. Editorial de la Universidad de Granada, **2006** [consultado 2014 marzo 09]. Disponible en: <http://0-hera.ugr.es.adrastea.ugr.es/tesisugr/15887601.pdf>.

De Santa Barbara P., Van Den Brink G., Roberts R. Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cellular and Molecular Life Science.* **2003**; 60: 1322– 1332.

Drozdowski L., Clandinin T., Thomson A. Ontogeny, growth and development of the small intestine: Understanding pediatric gastroenterology. *World Jouney of Gastroenterology.* **2010**; 16: 787– 799.

Dunel-Erb S. Chevalier C., Laurent P., Bach A., Decrock F., Maho Y. Restoration of the jejunal mucosa in rats refed after prolonged fasting. *Comparative Biochemistry and Physiology.* **2001**; 129: 933– 947.

Eynard A., Valentich M., Rovasio R. *Histología y Embriología del Ser Humano.* 4a. edición. Argentina: Editorial Médica- Panamericana, **2008**: 427, 430.

Fernández P. *Farmacología Básica y Clínica.* Decimoctava edición. Buenos aires: Editorial Médica Panamericana, **2008**: 209.

- Fox S.** Fisiología humana. Décima edición. China: McGraw Hill, **2008**: 162– 164, 243.
- Gal B., López M., Martín A., Prieto J.** Bases de la fisiología. 2a. edición. España: Editorial Tébar, **2007**: 269.
- Galindo F., Flores A.** De la energética a la neurotransmisión: el adenosín trifosfato y sus receptores. Revista Neurológica México. **2006**; 43: 667– 677.
- García A.** Cuantificación de la expresión génica del receptor de serotonina 5-HT_{5A} en intestino distal y proximal de rata en distintas etapas de desarrollo. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Licenciado en Biotecnología, **2011**: 3.
- García-Alcocer G., Padilla K., Rodríguez A., Miledi R., Berumen LC.** Distribution of the purinergic receptors P2X₄ and P2X₆ during rat gut development. Neuroscience Letters. **2012**; 509: 92– 95.
- Gerbe F., Legraverend C., Jay P.** The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. Cellular and Molecular Life Sciences. **2012**; 69: 2907– 2017.
- Gessi S. Varani K., Merighi S., Ongini E., Borea P.** A_{2A} adenosine receptors in human peripheral blood cells. British Journal of Pharmacology, **2000**; 129: 2– 11.
- Glaser T., Resende R., Ulrich H.** Implications of purinergic receptor-mediated intracellular calcium transients in neural differentiation. Cell Communication and Signaling, **2013**; 11: 12– 31.
- Glass R., Loesch A., Burnstock G.** P2X₄ and P2X₆ receptors associate with VE-cadherin in human endotelial cells. Cellular and Molecular Life Science, **2002**; 59: 870– 880.
- Gröschel U., Bardini M., Robson T., Burnstock G.** P2X receptor in the rat duodenal villus. Cell tissue Res, **1999**; 297: 111– 117.
- Guimarães L., Farias D., Muchagata R., de Magalhães M., Campello C., Rocha T., Vasconcelos I., Carvalho A., Mulinari F., Grossi-de-Sa M.** Short-Term Evaluation in Growing Rats of Diet Containing Bacillus thuringiensis Cry1Ia12 Entomotoxin: Nutritional Responses and Some Safety Aspects. J Biomed Biotechnol. [serie en internet]. **2010**. [Consultado en 2013, Mayo 06]; 2010(1): [Aprox. 3pp]. Disponible en <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2010/630267/>
- Henderson L.** Variation in MSRA Modifies Risk of Neonatal Intestinal Obstruction in Cystic Fibrosis. Plos Genet. [Serie en internet]. **2012**. [Consultado en 2013, Mayo 06]

8(3): [aprox. 10pp]. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3305406/>

Hill R., Wyse G. Fisiología animal. Primera edición. España: Editorial Medica Prx4 receptor in nervios enteric intestine, **2006**: 30, 315.

Horrobin D. Fisiología y bioquímica médica. Primera edición. España: Salvat editores, **1976**: 266.

Jarocka-Cyrta E., Perin N., Keelan M., Wierzbicki E., Wierzbicki T., Clandinin T., Thomson B. Early dietary experience influences ontogeny of intestine in response to dietary lipid changes in later life. American Physiological Society, **1998**; 275: G250–G258.

Kawate T., Carlisle J., Birdsong W., Gouaux E. Crystal structure of the ATP-gated P2X₄ ion channel in the closed state. Nature, **2009**; 460: 592– 598.

Khakh B., Burnstock G., Kennedy C., King B., North A., Séguéla P., Voigt M., Humphrey H. International Union of Pharmacology. XXIV. Current Status of the Nomenclature and Properties of P2X receptors and their subunits. Pharmacol Rev. **2001**; 53: 107– 118.

Kiernan J. El sistema nervioso humano. Séptima edición. México: McGraw Hill, **2000**: 389– 390.

Koeppen B., Stanton. Fisiología. Sexta edición. España: Editorial Elsevier, **2009**: 57, 61.

Mach J., Hsieh D., Grubbs N., Chervonsky A. Development of intestinal M cells. Immunological reviews. **2005**; 206: 177– 189.

Mendoza N. Farmacología médica. Primera edición. México: Editorial Médica-Panamericana, **2008**: 64– 66.

Montero C. Manual teórico práctico de técnicas inmunohistoquímicas. Primera edición. México: Editorial Universidad Autónoma de San Luis Potosí, **1998**: 39.

Nieto-Pescador M. Guerrero-Alba R., Valdez-Morales E., Espinosa-Luna R., Jiménez-Vargas N., Liñan-Rico A., Ramos-Lomas T., Díaz-Hernández V., Montañó L., Barajas-López C. P2X₄ subunits are part of P2X native channels in murine myenteric neurons. European Journal of Pharmacology, **2013**; 709: 92– 102.

Noah T., Donahue B., Shroyer N. Intestinal development and differentiation. *Experimental cell Research*. **2011**; 15: 2702– 2710.

North A. Molecular Physiology of P2X receptors. *Physiology Reviews*. **2002**.; 82: 1013– 1067.

Ormond S., Barrera N., Qureshi O., Henderson R., Edwardson J., Murrell-Lagnado R. An Uncharged Region within the N Terminus of the P2X₆ Receptor Inhibits Its Assembly and Exit from the Endoplasmic Reticulum. *Molecular Pharmacology*, **2006**; 69: 1692– 1700.

Padilla K. Distribución de los receptores P2X₆ durante el desarrollo del intestino de rata. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Ingeniero Químico en Alimentos, **2011**: 37.

Perin N., Thomson A. Ontogeny of the small intestine. *Gene Ontology*, **1998**; 35: 190– 197.

Petrushenko Y. P2X receptors: peculiarities of de structure and modulation of the functions. *Neurophysiology*, **2012**; 44: 163– 173.

Ralevic V., Burnstock G. Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacological Reviews*, **1998**; 50: 415– 92.

Ramos-Vara J. Technical Aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, **2005**; 42: 405– 426.

Rong W., Keating C., Sun B., Dong L., Grundy D. Purinergic contribution to small intestinal afferent hypersensitivity in a murine model of postinfectious bowel disease. *Neurogastroenterology*, **2009**; 21: 665– 672.

Ross M., Pawlina W. *Histología: texto y atlas a color con biología celular y molecular*. Quinta edición. Argentina: Editorial Médica-Panamericana, **2007**: 565, 579– 588.

Sanderson I., Walker W. *Development of the gastrointestinal tract*. Sixth edition. Canada, B.C. Decker Inc., **1999**: 1, 25.

Sasselli V., Pachnis V., Burns A. The enteric nervous system. *Development Biology*, **2012**; 366: 64– 73.

Scodelaro P., Katz S., Boland R. Interaction of purinergic receptors with GPCRs, ion channels, tyrosine kinase y steroid hormone receptors orchestrates cell function. *Purinergic Signalling*, **2011**; 8:91– 103.

Segarra E. Fisiología de los aparatos y sistemas. [Monografía en internet] Ecuador, **2006**. [Consultado 2013 mayo 06]. Disponible en <http://books.google.com.mx/books?id=4wWXYa1ubAC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>

Shigematsu Y., Shimoda Y., Kaneda M. Distribution of immunoreactivity for P2X₃, P2X₅, and P2X₆- purinoceptors in mouse retina. *Journal of Molecular Histology*, **2007**; 38: 369– 371.

Silbernagl S., Despopoulos A. Fisiología. Séptima edición. España: Editorial Medica Panamericana, **2009**: 78.

Silverthorn U., Silverthorn A. Fisiología humana. Cuarta edición. Argentina: Editorial Medica Panamericana, **2008**: 306, 377, 689.

Sokolović M., Wehkamp D., Sokolović A., Vermeulen J., Gilhuijs-Pederson L., Van Haaften R., Nikolsky Y., Evelo C., van Kampen A., Hakvoort T., Lamers W. Fasting induces a biphasic adaptive metabolic response in murine small intestine. *BMC Genomics*. **2007**; 8: 360– 361.

Sperligh B., Csolle C., Ando R., Goloncser F., Kittel A., Baranyi M. The role purinergic signaling in depressive disorders. *Neuropsychopharmacologia Hungarica*. **2012**; 14: 231– 238.

Stoddart R., Widdowson E. Changes in the organs of pigs in response to feeding for the first 24 h after birth. III. Fluorescence histochemistry of the carbohydrates of the intestine. *Biology of the Neonate*. **1976**; 29: 18– 27.

Stojilkovic S., Yan Z., Obsil T., Zemkova H. Structural Insights into the Function of P2X₄: An ATP Gated Cation Channel of Neuroendocrine Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, **2010**; 30:1251– 1258.

Suckow M., Weisbroth S., Flanklin C. The laboratory rat. Second edition. USA: British Library, **2005**: 103– 105.

Swaminathan R. Handbook of Clinical Biochemistry. Second edition. Singapore: World Scientific Publishing, **2011**: 158.

Taleisnik S. Receptores celulares y la transducción de señales. Primera edición. Argentina: Editorial Encuentro, **2006**: 2– 3.

- Tan S.**, Hooi S. Syncollin is diferentially expressed in rat proximal small intestine and regulated by feeding behavior. *American Journal of Physiology*, **2000**; 278: G308–G320.
- Tortora G.**, Derrickson B. *Principios de anatomía y fisiología*. Decimoprimer edición. España, Editorial Medica Panamericana, **2006**: 407– 411, 520, 528.
- Turner H.**, Turner J. Good fences make good neighbors. *Gut Microbes*, **2010**; 1: 22–29.
- Vigueras R.**, Rojas-Castalleda J., Hernández R., Reyes G., Alvarez C. Histological characteristics of the intestinal mucosa of the rat during the first year of life. *Laboratory animals*. **1999**; 33, 293– 400.
- Wang L.**, Jian L., Qing L., Zhang J., Duan X. Morphological changes of cell proliferation and apoptosis in rat jejunal mucosa at different ages. *World Journal Gastroenterology*, **2003**; 9: 2060– 2064.
- Wang L.**, Liu J., Wice B. Individual subtypes of enteroendocrine cells in the mouse small intestine exhibit unique patterns of inositol 1,4,5 trisphosphate receptor expression. *Journal Histochemistry Cytochemistry*, **2004**; 52: 53– 63.
- Welsch U.** *Histología*. Segunda edición. España: Editorial Médica Panamericana, **2009**: 358.
- Yamamoto K.**, Korenaga R., Kamiya A., Qi Z., Sokabe M., Ando J. P2X4 receptors mediate ATP-induced calcium influx in human vascular endothelial cells. *American Journal of Physiology*. **2000**; 279: H285– H282.
- Yu Q.**, Zhao Z., Sun J., Guo W., Fu J., Burnstock G., He C., Xiang Z. Expression of P2X6 receptors in the enteric nervous system of the rat gastrointestinal tract. *Histochemistry and Cell Biology*, **2010**; 122: 177– 188.