

DISTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2X₆ DURANTE EL DESARROLLO DEL INTESTINO DE RATA

Padilla Olvera K.M.; Escobar Cabrera, J.; García Alcocer M.G.

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Querétaro

RESUMEN

Los receptores purinérgicos son macromoléculas que responden al ATP extracelular, el cual juega un papel importante como un neurotransmisor del sistema nervioso. Se investigó la distribución de los receptores purinérgicos P2X₆ durante el desarrollo del intestino delgado de rata mediante métodos de inmunohistoquímica. Para esto se sacrificaron 2 ratas adultas y las crías de una de ellas (recién nacidas). Se disecaron los intestinos dividiendo las fracciones en proximal y distal en las dos edades; después se lavaron los tejidos y se fijaron en paraformaldehído al 4%, a continuación se colocaron en una solución de sacarosa al 30%, posteriormente se montaron los tejidos en *tissue-tek* y se congelaron a 70°C. Los encéfalos congelados fueron sometidos a criocortes de 12 μm y se colocaron en las laminillas para llevar a cabo la inmunohistoquímica, en la que se usó un anticuerpo primario específico para P2X₆ y como secundario un anticuerpo de cabra anticonejo asociado a biotina (para amplificación) y anticuerpo de cabra anticonejo con peroxidasa (sin amplificar). Se reveló las laminillas con DAB (diaminobenzidina) para posteriormente analizarlas al microscopio. Los resultados indicaron que: 1) los receptores purinérgicos P2X₆ se encuentran diferencialmente distribuidos durante el desarrollo del intestino delgado de rata 2) la distribución de estos receptores cambia en el intestino de rata neonata dependiendo la sección (proximal o distal), 3) La señal inmunorreactiva en las muestras sin amplificar fue similar a las amplificadas.

INTRODUCCIÓN

Los receptores son estructuras macromoleculares que se encuentran en las membranas celulares, en el citoplasma y en el núcleo. Tienen dos funciones esenciales: reconocer al ligando y propagar el mensaje (Taleisnik, 2006). Los receptores son llamados según el ligando que actúa sobre ellos, (Redolar, 2010). Los receptores purinérgicos P2X responden al ATP extracelular (abriendo los canales iónicos), el cual actúa como un neurotransmisor desde las terminales presinápticos, causando una rápida excitación postsináptica, tanto en neuronas como en el músculo liso (Da Silva y col, 2007). La función purinérgica juega un papel importante en las actividades del intestino y es por esto que los receptores P2X han sido propuestos como blancos potenciales para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales. La acción de agonistas que actúan sobre los receptores P2X en las neuronas entéricas intrínsecas, pueden incrementar tanto la propulsión como la secreción gastrointestinal y estas podrían ser las drogas que serían usadas para el tratamiento contra la constipación, mientras que los antagonistas de P2X podrían ser usados para el tratamiento contra la diarrea (Burnstock, 2008).

Los receptores P2X se subdividen en 7 subtipos P2X₁-P2X₇ tienen propiedades características con respecto a sus respuestas a agonistas (α - β -meATP), antagonistas (suramin) y la velocidad desensibilizante del receptor (Barrera, 2007). El subtipo P2X₆ está involucrado en la regulación

fisiológica de las neuronas entéricas del sistema nervioso enteral (Yu y col, 2010), el cual controla la secreción y motilidad gastrointestinal además de estar involucrado en la sensación visceral (Raffa, 2008).

EXPERIMENTAL

Se usaron dos ratas adultas y las crías de una de ellas, las cuales se anestesiaron con 40mg/kg de pentobarbital sódico. Una vez anestesiadas, se llevó a cabo la disección de las diferentes regiones del intestino tanto en las ratas adultas como en las neonatas y se colocaron en una solución de PBS, posteriormente se abrieron las secciones bajo el estereomicroscopio y se fijaron los tejidos con paraformaldehído (PFA) al 4% por 12 horas y los tejidos se crioprotegieron en una solución sacarosa al 30% y se congelaron a -70° .

Las fracciones de intestino se criocortaron a 12 micras y se llevaron a cabo lavados y bloqueo con peróxido de hidrógeno, posteriormente se aplicó el anticuerpo primario P2X₆ y se incubó toda la noche en cámara húmeda. Al día siguiente se aplicó el anticuerpo secundario y en su caso la amplificación para posteriormente ser revelados con diaminobenzidina.

Una vez reveladas las laminillas se lavaron en PBS 1x, se fijaron con glicerol, se analizaron en un microscopio óptico y se tomaron las microfotografías para documentar.

RESULTADOS

En las siguientes figuras se observan cortes transversales de las vellosidades de la mucosa del intestino delgado, tanto para adultos (proximal y distal) como para neonatos (proximal y distal).

En la figura 1, se observan los blancos tanto para la inmunohistoquímica de los tejidos de ratas adultas, como para las neonatas, es interesante notar la diferente morfología del tejido, mientras que para los adultos es alargado, para las neonatas se observa en forma circular. En la Figura 2 A) Y B) se muestra que en el intestino adulto proximal y distal hay señal inmunorreactiva. En los resultados de la figura 3 se aprecia A) en intestino de rata proximal hay una señal fuerte en los vasos capilares y D) en el intestino de rata neonata distal, se observa señal débil en los enterocitos. Por último en la figura 4 se presentan los resultados de la inmunohistoquímica de la sección proximal de rata neonata con amplificación y sin amplificación, donde se puede notar que en ambos métodos se expresa este receptor, pero lo hace con mayor intensidad en el método con amplificación.

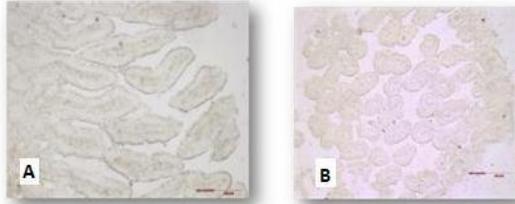


FIGURA 1. Blancos. A) Intestino de rata adulta, B) Intestino de rata neonata. En ninguno se observa inmunorreactividad. (barra 100 micrometros).

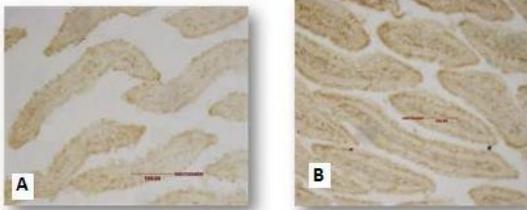


FIGURA 2. Tejido de ratas adultas. A) Proximal, B) Distal. (barra 100 micrometros).

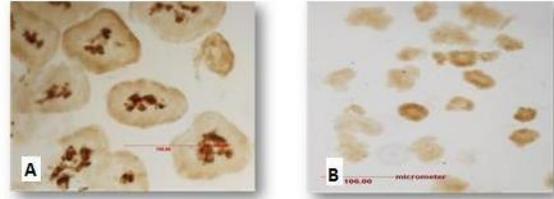
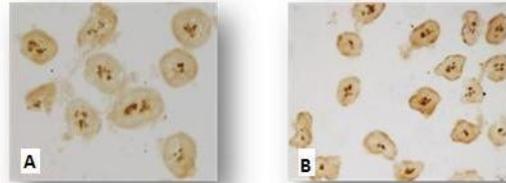


FIGURA 3. Tejido de ratas neonatas. A) Proximal, B) Distal. (barra 100 micrometros).



FUGURA 4. Métodos de inmunohistoquímica. A) Sin amplificación utilizando como anticuerpo (GAR-HRP), B) Con amplificación usando el anticuerpo (GAR-B). En ambos se notó expresión del receptor P2X6.

DISCUSION

La expresión con mayor intensidad de este receptor se obtuvo en la región proximal de las ratas neonatas, expresándose en los vasos capilares de las vellosidades de la mucosa del intestino.

Estos resultados son consistentes con los obtenidos en el estudio donde demostrado la expresión de receptores purinérgicos P2X₆ en el plexo mientérico en el tracto gastrointestinal de rata adulta (Yu,2010), en el músculo liso de la vejiga (Lee y col., 2000) así como en el de la tiroides de rata (Glass y Burnstock, 2001), en células corticales de la retina de rata (Suzuki, 2008), también en el hipocampo de rata (Chu, 2003); todos estos trabajos han propuesto la función de estos receptores como reguladores fisiológicos.

En cuanto a las diferencias encontradas entre la expresión de este receptor en ratas neonatas con ratas adultas, se puede atribuir al papel regulador que desempeña este receptor durante el desarrollo, se ha estudiado la función de los receptores P2X₆ durante la ontogenia del cerebro de ratón y durante la diferenciación neuronal *in vitro* (Da Silva y col en el 2007), una variante de empalme del receptor P2X₆ que está presente durante la diferenciación neuronal pero es menos predominante en el cerebro de ratón adulto, lo cual podría funcionar como un mecanismo de regulación post-transcripcional durante la diferenciación neuronal *in vitro* y en el desarrollo posnatal del cerebro de ratón. En cambio Korzina y col. 2010, no encontraron cambios significativos en la expresión de los purinoreceptores P2X₆ en las neuronas de ganglio estrellado durante la ontogénesis de rata.

CONCLUSIONES

Los resultados que se obtuvieron indican que los receptores purinérgicos P2X₆ se encuentran diferencialmente distribuidos durante el desarrollo del intestino delgado de rata, esto indica diferentes funciones de estos receptores durante el desarrollo del intestino, así como una mayor función en la región proximal de las ratas neonatas.

BIBLIOGRAFÍA

Barrera, N.P., Henderson, R.M., Murrel-Lagnado, R.D., Edwardson, J.M. "The Stoichiometry of P2X_{2/6} Receptor Heteromers Depends on Relative Subunit Expression Levels". Biophysical Journal. Vol. 93:505-512, **2007**.

Burnstock. "The journey to establish purigenic signalling in the gut". Neurogastroenterol Motil. Vol. 20:8-19, **2008**.

Chu, Y., Mouat, M.F., Coffield, J.A., Orlando, R., Grider, A. "Expression of P2X₆, a purigenic receptor subunit, is affected by dietary zinc deficiency in rat hippocampus". Biol Trace Elem Res. Vol. 91:77-87, **2003**.

Da Silva, R., Resende, R.R., Ulrich, H. "Alternative splicing of P2X₆ receptors in developing mouse brain and during in vitro neuronal differentiation". Experimental Physiology. Vol. 92:139-145, **2007**.

Glass, R., Burnstock, G. "Immunohistochemical identification of cells expressing ATP-gated cation channels (P2X receptors) in the adult rat thyroid". J. Anat. Vol. 198:569-579, **2001**.

Korzina, M.B., Emanuilov, A.I., Novakovskaya, S.A., Archakova, L.I., Maslyukov, P.M."Development of Rat Stellate Ganglion Neurons Containing Membrane-Bound Muscarinic Receptors and Purinoreceptors". Neuroscience and Behavioral Physiology. Vol. 40:90-95, **2010**.

Lee, H., Bardini, M., Burnstock, G., "Distribution of P2X receptors in the urinary bladder and ureter of the rat". Journal of Urology. Vol. 163:2002-007, **2002**.

Raffa, R. Farmacología ilustrada. 1ra. Ed., Elsevier, España: 170-171, **2008**.

Redolar, R. D. Fundamentos de Psicobiología. 1ra.Ed., UOC,España: paginas187,270, **2010**.

Suzuki-Kerr, H., Vlajkovic, S., Donaldson P.J., Lim, J. "Molecular identification and localization of P2X receptors in the rat lens". Exp Eye Research. Vol. 86:844-855, **2008**.

Taleisnik, S. Receptores celulares y la transducción de señales. Temas de Biología Celular. 1ra. Ed., Brujas, Argentina:1-2,6, **2006**.

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". Histochem Cell Biol. Vol 133:177-188, **2010**.