

CAMBIOS ONTOGÉNICOS DE LOS RECEPTORES A ATP X₄ EN EL INTESTINO DE RATA

Valle Moreno L.; García Alcocer M.G.

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Autónoma de Querétaro

RESUMEN

El ATP es un neurotransmisor del Sistema Nervioso Entérico, que ha sido asociado con el dolor provocado por desordenes intestinales y la activación de receptores a ATP presentes en el intestino. El receptor P2X₄ es un subtipo de estos receptores que se ha visto involucrado con la apoptosis y dolor de inflamación, por lo que se pudieran considerar como buen blanco de acción para el desarrollo de medicamentos usados en trastornos gastrointestinales. El objetivo de este estudio fue demostrar los niveles de expresión del receptor P2X₄ en los segmentos proximal y distal de las vellosidades del intestino delgado de rata neonato y adulto. Se utilizaron técnicas de histoquímica para hacer cortes finos de los tejidos y se prosiguió a hacer un ensayo inmunológico utilizando anticuerpos primarios contra el receptor P2X₄, además de un anticuerpo secundario y un complejo PAP que da la señal visible. Se demostró una mayor presencia del receptor P2X₄ en el intestino de rata neonato que en adulto, además de que se expresó el receptor P2X₄ en diferentes zonas de las vellosidades como en los enterocitos, canal linfático y tejido conectivo, según el segmento de intestino analizado y la edad de la rata, lo que nos sugiere que los receptores P2X se van expresando a diferentes etapas del desarrollo del animal y en diferentes zonas según la acción que ejerzan, pudiendo estar involucrados en distintos mecanismos de acción como la secreción de enzimas en los enterocitos o en defensa celular en los linfocitos.

INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que el ATP es un neurotransmisor excitatorio, a pesar de que esté involucrado en varios procesos intracelulares como el ciclo de Krebs. El ATP ejerce su acción activando varios subtipos de receptores purinérgicos P₂ (Ralevic y Burnstock, 1998), en los que se encuentran los P₂Y que son receptores acoplados a proteínas G, y los P₂X que están asociados a canales iónicos produciendo una respuesta rápida excitatoria. Se ha visto que los receptores P₂X se encuentran en las terminaciones nerviosas del tracto gastrointestinal y en células epiteliales de la mucosa, simulando reflejos motores y transmitiendo señales nociceptivas como el dolor, por esto se ha incrementado el interés por investigar más sobre estos receptores (Burnstock, 2008). Entre los receptores P₂X hay 7 subtipos, de los cuales 3 han sido muy estudiados (P₂X_{1,2,3}). Recientemente se ha encontrado que el P₂X₄ está implicado en procesos de apoptosis (Solini y col, 2007) y de inflamación (Tsuda y col, 2009) que pudieran estar relacionadas con algunos padecimientos intestinales, sin embargo poco se sabe sobre la presencia de P₂X₄ en el tracto gastrointestinal y como varía su expresión con la edad. Por esta razón es importante generar mayor conocimiento acerca del receptor P₂X₄ para poder comprender mejor su relación con el sistema nervioso entérico y así poder diseñar nuevos fármacos que actúen sobre receptores purinérgicos, para tratamientos de padecimientos intestinales.

METODOLOGÍA

Se extrajeron las porciones proximales y distales de intestino delgado de ratas neonato y adultas. Los tejidos se limpiaron y cortaron longitudinalmente, posteriormente se fijaron con P-formaldehído al 4% y se mantuvieron en buffer con sacarosa al 30%. Se colocaron los tejidos en *tissue tek* y se prosiguió a hacer cortes finos (12 µm) de las vellosidades del intestino, esto gracias a un criostato marca Leica. Los cortes de tejidos se adhirieron a laminillas y los pasos consecuentes de la inmunohistoquímica se explican en la figura siguiente.

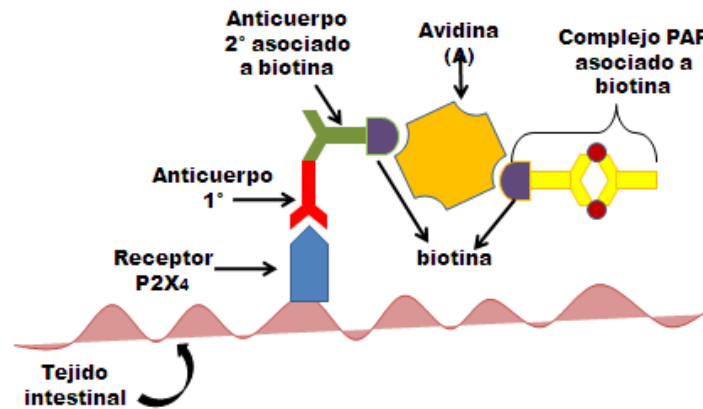


Figura 1. Método de inmunoperoxidasa.

Se añadió un primer anticuerpo que se une al epítipo del receptor específico P2X₄. Se adicionó un segundo anticuerpo asociado a biotina, posteriormente avidina y se complementó agregando un complejo PAP que oxida a la DAB dando una coloración café detectable en el microscopio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el segmento proximal de las ratas neonato se localizó la señal en los enterocitos que conforman las vellosidades del intestino con una señal medianamente intensa, en cambio en el segmento distal se encontró la señal intensa en el canal linfático de las mismas. En cuanto a la señal observada en los adultos se localizó en la lámina propia de las vellosidades que consiste en tejido conectivo entre la capa de enterocitos y la linfa, tanto en la porción proximal como la distal del intestino, con una intensidad débil de la señal.

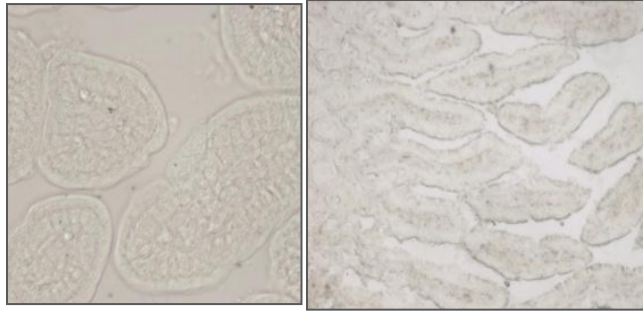


Figura2. Blancos de las vellosidades intestinales

En las imágenes se muestran las vellosidades intestinales de rata neonato (a la izquierda) y de adulto (a la derecha), donde no se les añadió el primer anticuerpo por lo que se consideran los blancos.

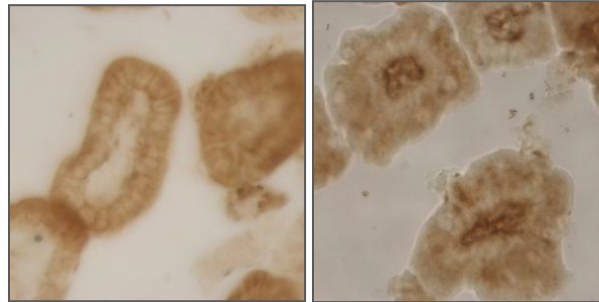


Figura3. Vellosidades intestinales de rata neonata

Se muestran las vellosidades del intestino delgado de rata neonato (40X) en las que hubo una señal intensa; a la izquierda se encuentra la porción proximal en donde se observa marca del receptor $P2X_4$ en las células exteriores que son los enterocitos; a la derecha se encuentran las vellosidades de la parte distal del intestino y donde la marca ahora se encuentra en el centro de las vellosidades que representa el canal linfático.

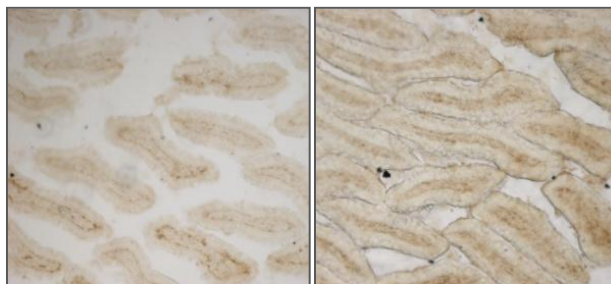


Figura 4. Vellosidades intestinales de rata adulta

Se muestran las vellosidades del intestino delgado de rata adulto (10X), donde se observa la señal del receptor $P2X_4$ en una sección intermedia de las vellosidades, que corresponde a tejido conectivo;

las vellosidades de la izquierda corresponden a la parte proximal y las de la derecha a la parte distal.

CONCLUSIONES

Al ser mayor la expresión del receptor purinérgico P2X₄ en intestino de ratas neonato que en ratas adultos, nos indica que posiblemente esté involucrado en tanto en la función del intestino en recién nacidos como en las patologías que estos presentan. A partir de esta información obtenida se pudieran realizar más estudios relacionados a fármacos agonistas o antagonistas de receptores P2X₄ para explorar los cambios fisiológicos al activar o inactivar estos receptores.

La marca del receptor expresada en los enterocitos podría indicar la participación de los receptores en la secreción de enzimas digestivas del alimento sintetizadas en estas células, en cuanto a la señal observada en la linfa se pudiera deber a su asociación con el sistema inmune, que concuerda con estudios que reportan la presencia de P2X₄ en macrófagos (Sim y col, 2007).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Burnstock, G. The journey to establish purinergic signalling in the gut. Neurogastroenterol Motil. Vol. 20: (Suppl. 1), 8–19, **2008**.

Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol Rev 50:413–492, **1998**

Solini, A., Santini, E., Chimeti, D., *et al.* Multiple P2X receptors are involved in the modulation of apoptosis in human mesangial cells. Am J Physiol Renal Physiol. Vol. 292: F1537-F1547, **2007**.

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

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