

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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**LAS SUBUNIDADES DEL RECEPTOR P2X4  
FORMAN PARTE DE LOS CANALES P2X NATIVOS  
EN LAS NEURONAS MIENTÉRICAS DEL RATÓN**

Tesis que presenta

**María Guadalupe Nieto Pescador**

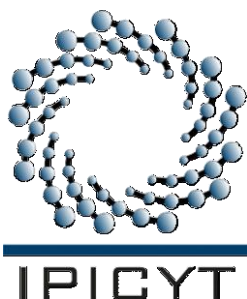
Para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias en Biología Molecular**

Director de la Tesis:

**Dr. Carlos Barajas López**

San Luis Potosí, S.L.P., a 14 de marzo del 2013



## CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS

La tesis “**Las subunidades del receptor P2X4 forma parte de los canales P2X nativos en las neuronas mientéricas del ratón**” presentada para obtener el grado de Doctor en Biología Molecular fue elaborada por **María Guadalupe Nieto Pescador** y aprobada el **14 de marzo del 2013** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

---

Dr. Carlos Barajas López  
(Director de Tesis)

---

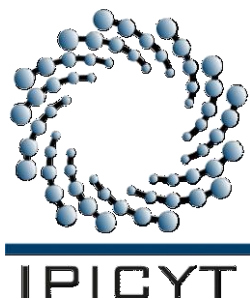
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont  
(Asesor de Tesis)

---

Dra. Diana Patricia Portales Pérez  
(Asesor de Tesis)

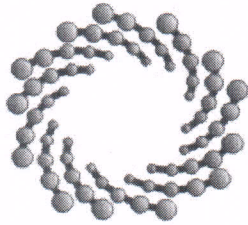
---

Dr. Antonio De León Rodríguez  
(Asesor de Tesis)



## **CRÉDITOS INSTITUCIONALES**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Neurobiología de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT-211457 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



**IPICYT**

# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 054 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 14 días del mes de marzo del año 2013, se reunió a las 15:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Alejandro De Las Peñas Nava</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Diana Patricia Portales Pérez</b>	<b>Secretario</b>	<b>UASLP</b>
<b>Dr. Carlos Barajas López</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Sergio Zarazúa Guzmán</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>UASLP</b>

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

**DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**María Guadalupe Nieto Pescador**

sobre la Tesis intitulada:

*Las subunidades del receptor P2X4 forman parte de los canales P2X nativos en las neuronas mientéricas del ratón*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Carlos Barajas López**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 16:40 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 14 días del mes de marzo de 2013.

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado



## DEDICATORIA

Éste trabajo de tesis lo dedico a Dios, por haberme dado la vida y ayudarme a lograr todo lo que me he propuesto.

A mi esposo César Quiñones, por su amor y compañía constante. Por brindarme ánimo, consuelo, y cuidados en los tiempos difíciles.

A mi hija María Inés, que me da tantas alegrías y me hace esforzarme para ser mejor.

A mis padres, por su ejemplo, enseñanzas, y consejos de vida que me ayudan a salir adelante de las dificultades y me han hecho ser lo que ahora soy.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CONACYT por haberme otorgado la beca que me permitió llevar a cabo mis estudios sin dificultades económicas.

Al IPICYT por haberme proporcionado los recursos necesarios para llevar a cabo mi trabajo y terminar mi formación académica.

A Andrómeda Liñan Rico y a Néstor Jiménez Vargas por su asesoría y apoyo en el trabajo del laboratorio.

A Rosa Espinosa Luna por su apoyo técnico para la adquisición de los materiales y reactivos, para la extracción de órganos, y la preparación de los cultivos celulares que se utilizaron en los experimentos de éste trabajo de tesis.

## CONTENIDO

PORTADA.....	i
CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS.....	ii
CRÉDITOS INSTITUCIONALES.....	iii
ACTA DE EXAMEN.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	ix
ABREVIACIONES.....	xi
GLOSARIO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
RESUMEN.....	xvi
I. ANTECEDENTES GENERALES.....	1
1.1 Sistema Nervioso Entérico.....	1
1.2 Señalización Purinérgica.....	5
1.3 Receptores P2X.....	6
II. INTRODUCCIÓN.....	15
2.1 El Receptor P2X4.....	15
2.2 Receptores P2X en el Sistema Nervioso Entérico.....	16
III. JUSTIFICACIÓN.....	19
IV HIPÓTESIS.....	20
V. OBJETIVO GENERAL.....	20
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
7.1 Cultivos primarios de neuronas mientéricas.....	21
7.2 Registros de patch clamp.....	22
7.3 Amplificación por RT-PCR a partir del yeyuno.....	24
7.4 Western blot de yeyuno.....	25
7.5 Inmunohistoquímica para el receptor P2X4 en cultivo de neuronas mientéricas.....	26

7.6 RT-PCR en célula única.....	27
7.7 Reactivos y soluciones.....	29
7.8 Análisis de los datos.....	30
VIII. RESULTADOS.....	31
8.1 Dependencia de la concentración y el voltaje que presentan las corrientes inducidas por ATP ( $I_{ATP}$ ).....	31
8.2 Efectos del $\alpha,\beta$ -metileno ATP y el BzATP sobre los canales P2X nativos.....	33
8.3 Efectos moduladores de la ivermectina y el $Zn^{2+}$ sobre la $I_{ATP}$ .....	35
8.4 Efectos del PPADS, la suramina y el KN-62 sobre los canales P2X nativos.....	39
8.5 El mRNA del receptor P2X4 está presente en el intestino delgado del ratón.....	42
8.6 La proteína del receptor P2X4 está presente en el intestino delgado del ratón.....	42
8.7 La mayoría de las neuronas mientéricas en cultivo presentan inmunoreactividad para el receptor P2X4.....	43
8.8 El mRNA del receptor P2X4 se encuentra en la mayoría de las neuronas mientéricas.....	45
8.9 Las neuronas mientéricas expresan mRNA del receptor P2X5 en aproximadamente un cuarto de su población.....	45
IV. DISCUSIÓN.....	48
V. APÉNDICE A.....	56
VI. FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	69
VII. REFERENCIAS.....	72



## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

<b>Cuadro I.</b> Algunas propiedades farmacológicas y fisiológicas de los receptores P2X.....	14
<b>Cuadro II.</b> Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR del intestino y PCR en célula única.....	29
<b>Cuadro III.</b> Comparación de las propiedades de los receptores P2X nativos del plexo mientérico con aquéllas de los receptores P2X2, P2X4 y P2X7 homoméricos.....	52
<b>Cuadro IV.</b> Variantes de <i>splicing</i> alternativo del receptor P2X4 del ratón.....	60
<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de un corte transversal del intestino delgado que muestra la localización del plexo mientérico y submucoso.....	2
<b>Figura 2.</b> Subunidades de los receptores P2X, alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los receptores P2X de la rata.....	8
<b>Figura 3.</b> Topología y aminoácidos clave de una subunidad de P2X.....	10
<b>Figura 4.</b> Estructura molecular de los receptores P2X en base al modelo de listones obtenido de la cristalización del receptor P2X4 del <i>Pez cebra</i> .....	11
<b>Figura 5.</b> Registros de corriente característicos de los receptores P2X homoméricos.....	12
<b>Figura 6.</b> Las corrientes inducidas por diferentes concentraciones de ATP parecen estar mediadas por canales con propiedades similares.....	32
<b>Figura 7.</b> El $\alpha,\beta$ -metileno ATP no activa los canales P2X nativos de las neuronas mientéricas.....	34
<b>Figura 8.</b> La Ivermectina potencia las corrientes inducidas por ATP en las neuronas mientéricas del ratón.....	37
<b>Figura 9.</b> El Zinc potencia las corrientes inducidas por ATP en las neuronas mientéricas del ratón.....	38
<b>Figura 10.</b> El PPADS es más potente que la suramina sobre los receptores P2X nativos en las neuronas mientéricas.....	41
<b>Figura 11.</b> El mRNA y la proteína del receptor P2X4 se expresan en el intestino delgado del ratón.....	44
<b>Figura 12.</b> El mRNA del receptor P2X4 se expresa en mayor número que el del receptor P2X5.....	47

**Figura 13.** Tipos de splicing alternativo.....58

**Figura 14.** Arreglo esquemático de las variantes del receptor P2X4 encontradas en el intestino delgado del ratón.....65

## ABREVIACIONES

<b>ATP</b>	trifosfato de adenosina
<b>ATP-<math>\gamma</math>-S</b>	Sal de adenosina 5'-(3-tiotrifosfato) tetralitio
<b>Å</b>	Ångström
<b><math>\alpha,\beta</math>-meATP</b>	$\alpha,\beta$ -metileno ATP
<b>BzATP</b>	Sal de 2'(3')-O-(4-Benzoilbenzoil)adenosina 5'-trifosfato trietilamonio
<b>Cdna</b>	DNA de cadena complementaria
<b>CTP</b>	Codón de terminación prematuro
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentración que produce el 50% del efecto máximo del agonista
<b>I<sub>ATP</sub></b>	Corriente(s) inducidas por ATP
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración que produce el 50% del efecto máximo inhibitorio
<b>KN-62</b>	1-[N,O-bis(5-isoquinolinasulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4- fenilpiperazina
<b>Mrna</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>Mv</b>	Milivolts
<b>Na</b>	Nanoampers
<b>nt</b>	Nucleótidos
<b>M</b>	Megaohms
<b>NCBI</b>	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PPADS</b>	Acido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfonico
<b>PPT</b>	Sitio rico en pirimidinas
<b>RT-PCR</b>	Reacción de transcripción reversa y amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa
<b>SEM</b>	Media del error estándar
<b>ss</b>	Sitio de splicing

**TNP-ATP** Sal de 2',3'-O-(2,4,6-Trinitrofenil) adenosina 5'-trifosfato monolitio trisodio

## GLOSARIO

**Agonista:** sustancia que es capaz de unirse a un receptor celular y provocar una respuesta en la célula con el fin de estimular una función, ya sea específica o adversa, en el caso de reacciones que no se quieren observar.

**Antagonista:** sustancia que al unirse a un receptor celular no provoca una respuesta biológica, pero bloquea o detiene respuestas mediadas por agonistas.

**Coefficiente de Hill:** indica cuántas de las zonas de unión de sustrato o agonista de una enzima o receptor afectan a la afinidad de la unión del sustrato o agonista en el resto de las zonas de unión. El coeficiente de Hill puede tomar valores mayores o menores que 1:

- $n < 1$ : indica cooperatividad negativa.
- $n > 1$ : indica cooperatividad positiva.

**Configuración de célula completa:** configuración de la técnica de patch clamp en la que se incrementa la succión se rompe la membrana lo que brinda acceso del electrodo al ambiente intracelular por un periodo de tiempo corto el ambiente intracelular es diluido por los contenidos de la pipeta.

**EC<sub>50</sub>:** es la concentración de un fármaco que induce el 50% del efecto máximo excitatorio.

**Fijación de voltaje:** variante de la técnica de patch clamp que implica fijar y mantener de forma constante el potencial de membrana en una célula en registro.

**Ganglio nervioso:** formación nodular que hay en el trayecto de los nervios, formados por la acumulación de cuerpos neuronales.

**Genes ortólogos:** los que son semejantes por pertenecer a dos especies que tienen un antepasado común.

**Genes parálogos:** aquellos que se encuentran en el mismo organismo, y cuya semejanza revela que uno procede de la duplicación del otro.

**IC<sub>50</sub>:** es la concentración de un fármaco que induce el 50% del efecto máximo inhibitorio.

**Inmunoreactividad:** capacidad de reaccionar con un anticuerpo dado.

**Nucleótidos:** moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de un monosacárido de cinco carbonos (pentosa), una base nitrogenada y un grupo fosfato.

**Plexo:** estructura nerviosa formada por nervios y ganglios.

**Técnicas de patch clamp:** son técnicas de fijación de membranas que se utilizan en el laboratorio y permiten el estudio individual o múltiple de canales iónicos. Usa un micropipeta de vidrio con un diámetro suave y una abertura de aproximadamente 1µm. La pipeta se llena con una solución que depende del estudio específico o la técnica de patch clamp usada. Un electrodo de metal en contacto con esta solución conduce cambios eléctricos a un amplificador de voltaje. Este está presionado contra la membrana celular y se aplica succión para absorber la membrana dentro de la pipeta con el electrodo para formar un sello eléctricamente apretado de “giga-ohm”. En el patch clamp un solo electrodo se usa para fijar el voltaje o la corriente a un nivel constante mientras que se graban los cambios en la corriente o el voltaje respectivamente, debidos a la entrada o salida de corriente.

## **ABSTRACT**

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

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

**Keywords:** enteric nervous system, myenteric neurons, mouse, purinoceptors, P2X receptors, P2X4 receptors, suramin, PPADS, ivermectin, zinc, single cell PCR.

## RESUMEN

### **La subunidad P2X4 forma parte de los canales nativos P2X en las neuronas mientéricas del ratón.**

El objetivo del presente estudio fue investigar si los receptores P2X4 se expresan en las neuronas mientéricas del ratón y si estos contribuyen a la formación de canales funcionales en la membrana de estas neuronas mediante técnicas moleculares y electrofisiológicas. La técnica electrofisiológica de *whole-cell* se utilizó para registrar las corrientes inducidas al aplicar ATP ( $I_{ATP}$ ) en las neuronas mientéricas. Comparados con los canales P2X4 recombinantes (reportados por otros autores en estudios previos), los canales P2X mientéricos nativos tienen una sensibilidad al ATP ( $EC_{50}=102 \mu M$ ) y al  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (ningún efecto a 30 o 100  $\mu M$ ) relativamente baja. El BzATP fue un agonista débil de los receptores P2X nativos. KN-62 no tuvo efecto sobre éstos canales, mientras que el PPADS ( $IC_{50}=0.54 \mu M$ ) y la suramina ( $IC_{50}=134 \mu M$ ) fueron antagonistas más potentes que sobre los canales P2X4 homoméricos. Las  $I_{ATP}$  fueron potenciadas por la ivermectina (efecto que es específico sobre los receptores P2X4) y el zinc. Análisis por *Western blot* y RT-PCR mostró la presencia de la proteína de la subunidad P2X4 y el correspondiente transcrito de mRNA en el intestino delgado. Se encontró inmunoreactividad para el receptor P2X4 en la mayoría de las neuronas mientéricas en cultivo. La técnica de *RT-PCR* en célula única mostró la presencia de mRNA del receptor en el 90% de las neuronas mientéricas. Nuestros resultados muestran que el receptor P2X4 se expresa en la mayoría de las neuronas mientéricas, contribuye a las corrientes de membrana inducidas por ATP, y debido a que la mayoría de las propiedades observadas en dichas neuronas no corresponden a las de los canales P2X4 homoméricos, se propone que están formando canales heteroméricos. Los receptores P2X4 tienen una amplia distribución dentro del plexo mientérico y se esperaría que jueguen un papel importante en la vía de señalización intracelular.

**Palabras clave:** sistema nervioso entérico, neuronas mientéricas, ratón, receptores P2X, receptores P2X4, suramina, PPADS, ivermectina, Zinc, PCR en célula única.

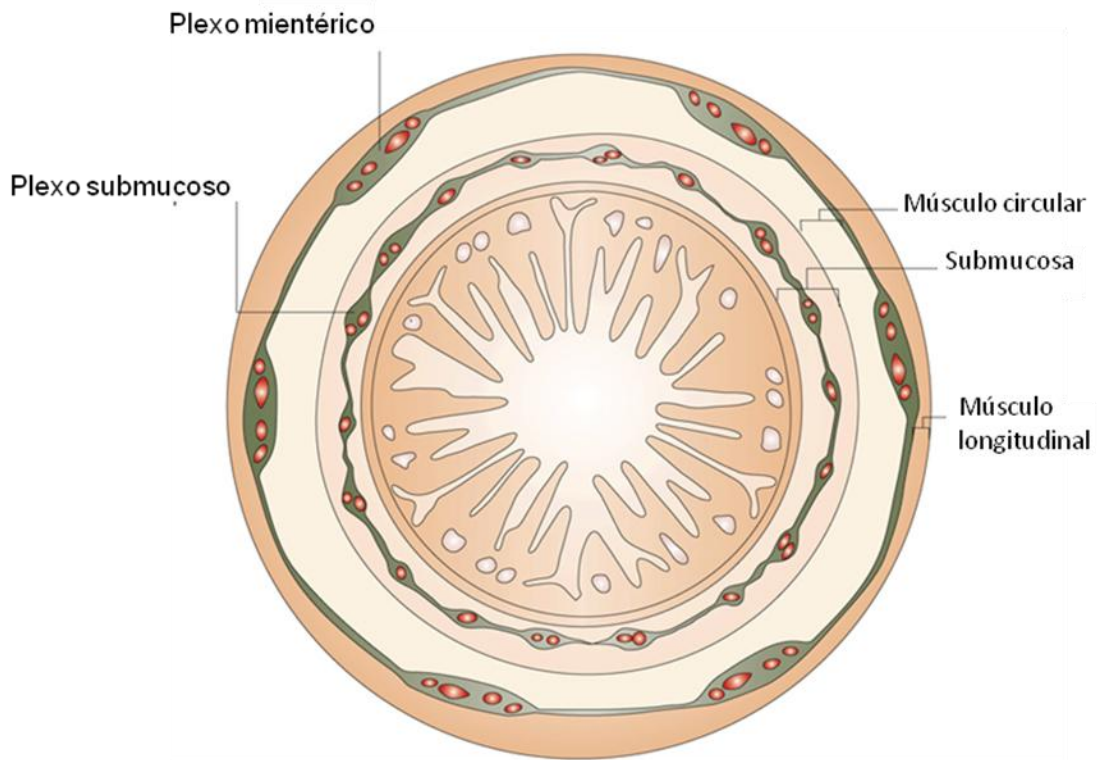


## **I. ANTECEDENTES GENERALES**

### *Sistema Nervioso Entérico*

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

El sistema nervioso entérico (SNE) forma parte del sistema nervioso autónomo, se encarga de controlar directamente el aparato digestivo aunque también se comunica de forma bidireccional con el sistema nervioso central (Brookes, 2001). El SNE consiste de dos plexos ganglionares: el plexo mientérico y el plexo submucoso. El plexo mientérico controla la motilidad (Kunze and Furness, 1999) y se encuentra entre las capas musculares externas longitudinal y circular del intestino (Fig. 1). Se extiende a lo largo del tracto digestivo desde el esófago hasta el recto. El plexo submucoso se encuentra entre la capa mucosa y músculo circular del intestino (Fig. 1). Está distribuido solamente en el intestino delgado y grueso (Furness and Costa, 1980). Controla las funciones secretoras y absorbentes del epitelio gastrointestinal, el flujo sanguíneo local y la respuesta neuroinmune (Galligan, 2002). Ambos plexos contienen neuronas sensoriales, interneuronas y neuronas motoras interconectadas por sinapsis químicas que forman una red de circuito neuronal.



**Figura 1. Representación esquemática de un corte transversal del intestino delgado que muestra la localización del plexo mientérico y submucoso.** De adentro hacia fuera se observa la luz del intestino, la vellosidad intestinal, la mucosa, y submucosa en donde se encuentra embebido el plexo submucoso; el músculo circular sobre el cual descansa el plexo mientérico y por último el músculo longitudinal. Fuente: *Nature Reviews Neuroscience* 8, 466-479, Junio 2007.

Las neuronas mientéricas se clasifican por su función, forma, patrón de proyección, comportamiento electrofisiológico y neurotransmisores que liberan (Costa et al., 1996; Furness, 2000). De forma general en cuanto a la función principal que realizan, las neuronas se clasifican en neuronas sensoriales, interneuronas y neuronas motoras.

*Neuronas sensoriales.* Son las neuronas entéricas sensibles a estímulos químicos o mecánicos del tracto gastrointestinal cuyo cuerpo neuronal está en el plexo mientérico y submucoso. A estas neuronas se les conoce como neuronas intrínsecas aferentes primarias, y son aparte de las neuronas extrínsecas aferentes primarias cuyo cuerpo neuronal está en el ganglio nodoso o en el ganglio de la raíz dorsal (Furness et al., 1998). Muchas neuronas sensoriales entéricas tienen características electrofisiológicas del tipo de neuronas "AH" (por sus sigas en inglés de: *after hyperpolarization*), que por su comportamiento electrofisiológico se definen por presentar una hiperpolarización inmediatamente después del potencial de acción, la cual dura más de un segundo (Furness et al., 1998; Hirst et al., 1974; Mao et al., 2006). La mayoría de las neuronas sensoriales tienen cuerpo suave y son multipolares con proyecciones que corren hacia el epitelio mucoso entre el plexo mientérico y submucoso, hacia ellas mismas y cerca del ganglio (Furness et al., 1998; Pompolo and Furness, 1988). Éstas forman sinapsis con otros tipos neuronales. Sin embargo, hasta la fecha no existe evidencia de que las neuronas sensoriales entéricas liberen ATP como neurotransmisor.

*Interneuronas.* Otro tipo de neuronas que se encuentra en el SNE son las interneuronas, las cuales se encuentran principalmente en el plexo mientérico donde generalmente existe un subtipo (dos subtipos en el colon) con proyección ascendente, y al menos tres subtipos de interneuronas con proyección descendente. Existe también un número de neuronas intestino fúgales que mandan proyecciones al ganglio prevertebral (Castelucci et al., 2002).

Todas las interneuronas tienen un solo axón, pero presentan diversidad de dendritas con diferente morfología. Electrofisiológicamente las interneuronas se caracterizan como neuronas del tipo “S”, que son neuronas en las que un solo estímulo eléctrico aplicado a una conexión interganglionar produce potenciales postsinápticos excitatorios rápidos (Bornstein et al., 1994; Hirst et al., 1974). Éstas pueden diferir en su nivel de excitabilidad y su habilidad para disparar potenciales de acción de forma repetitiva (Bornstein et al., 1994; Kunze and Furness, 1999; Smith et al., 1999). Al menos un tipo de interneurona descendente utiliza el ATP como neurotransmisor o coneurotransmisor durante reflejos locales en el plexo mientérico (Bian and Bertrand, 2000; Bornstein, 2006). En el plexo submucoso las interneuronas comprenden menos del 15% de la población total de neuronas y parece que no liberan ATP o adenosina como neurotransmisor.

*Neuronas motoras.* Las neuronas motoras se encuentran en el plexo mientérico y submucoso. Éstas tienen un solo axón y dendritas cortas de morfología de tipo Dogiel I. En el plexo mientérico hay cuatro clases funcionales de neuronas motoras que inervan hacia las capas de músculo liso del intestino (Brookes, 2001; Furness and

Sanger, 2002): neuronas motoras inhibitorias o excitatorias que inervan hacia las capas del músculo liso circular como hacia las del músculo longitudinal. Todas las neuronas motoras tienen propiedades de neurona tipo “S”, y como las interneuronas, pueden diferir en sus niveles de excitabilidad (Bornstein et al., 1994). Las neuronas motoras inhibitorias que van hacia el músculo liso del intestino usan el ATP como co-neurotransmisor (Costa et al., 1996; Furness and Sanger, 2002). Por su parte en el plexo submucoso hay dos tipos de neuronas secretomotoras excitatorias que van al epitelio y al menos un tipo de neurona vasodilatadora que va a las arteriolas del plexo submucoso. Las neuronas vasodilatadoras/secretomotoras no colinérgicas suman el 45% de las neuronas submucosas, y pueden utilizar ATP como co-neurotransmisor (Hu et al., 2003; Monro et al., 2004). Las neuronas que utilizan ATP o adenosina como transmisores son llamadas purinérgicas y la señalización en la que participan se conoce de la misma manera.

### *1.2 Señalización purinérgica*

Las purinas adenosina y ATP son reconocidas como neurotransmisores o neuromoduladores en el sistema nervioso central e.g. (Edwards et al., 1992), el sistema nervioso periférico e.g (Evans et al., 1992; Silinsky et al., 1992) y el SNE (Costa et al., 1996; Galligan, 2002). Los receptores que activan son conocidos como receptores purinérgicos P1 y P2, activados por adenosina y ATP respectivamente.

La adenosina actúa a través de receptores acoplados a proteínas G. El ATP actúa tanto sobre los receptores/canal iónicos P2X (Khakh et al., 2001; North, 2002), como sobre los receptores P2Y acoplados a proteínas G (Abbracchio et al., 2006; von

KÃ¼gelgen and Wetter, 2000). La adenosina es liberada de las células como consecuencia del estrés metabólico o como un producto de la degradación del ATP liberado (ref). Por el contrario, el ATP es primeramente liberado por fuentes neuronales como neurotransmisor, aunque existe evidencia de la liberación de ATP por células no neuronales en el músculo en acción (Abbracchio et al., 2006).

### *Receptores P2X*

Los receptores P2X son canales catiónicos que se abren en respuesta a la unión de ATP extracelular (Roberts et al., 2006). Tienen el sitio de unión a su ligando o agonista, y el poro o canal iónico, como parte de un mismo complejo multimérico. Como estos complejos receptor/canal iónico no requieren la generación de segundos mensajeros intracelulares para transmitir la señal primaria (como sucede con los receptores acoplados a proteínas G), la latencia de respuesta (<ms) y la duración (<100 ms) son muy cortas.

Se conocen siete genes para siete subunidades de receptores P2X (P2X<sub>1</sub> a P2X<sub>7</sub> (North, 2002)). Los genes varían considerablemente en tamaño (e.g., P2X<sub>2</sub>: 3 Kb, P2X<sub>7</sub>: 45 Kb, ambos de la rata). En los vertebrados, todos los genes ortólogos de las subunidades P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>7</sub> están localizados muy cercanos entre sí en el mismo cromosoma. P2X<sub>1</sub> y P2X<sub>5</sub> también se encuentran localizados en el mismo cromosoma, y el resto de los genes están situados en cromosomas diferentes. Los genes parálogos de subunidades P2X comparten la misma organización génica que consiste en 11 a 13 exones en sus variantes largas o completas y poseen secuencias bien conservadas de los límites exón/intrón (Fig. 2). Se conocen varias secuencias completas de receptores

P2X en vertebrados no mamíferos y en algunos organismos invertebrados como *Dictyostelium*, algas verdes, y *Schistosoma mansoni* también se ha descrito este tipo de receptores (Agboh et al., 2004; Fountain et al., 2008; Fountain et al., 2007; North, 2002).

		Exon 2	
P2X1	MARRLODELSA-FFFEYDTPRMVLVRNKKVGVIFRLIQLVVLYVIGWVVFYKRYOTSS		59
P2X2	MVRRRLARGCWS-AFWDYETPKVIVVRNRLGFVHRMVQLLILLYFVWYVFIKSYQDSE		59
P2X3	-----MNCIS-DFFTYETTKSVVVKSWTIGIINRAVQLLIISYFVGWVFLHERAYQVRD		53
P2X4	MAGCCSVLG-S-FLFEYDTPRIVLIRSRKVLGMNRAVQLLILAYVIGWVVFVWEKGYQETD		58
P2X5	MGQAAWKGFV-LSLFDYKTKAFVVAKSXKVGLLYRVLQLIILLYLLIWWFLIKSYQDID		59
P2X6	MASAVAAALVSWGFLDYKTEKYVMTRNCVVGISQRLLQLGVVVYVIGWALLAKKGYQEWD		60
P2X7	MPACCSWN----DVFOYETNKVTRIQSVNYGTIKWILHMTVFSYVS-FALMSDKLYQRE		55
		Exon 3	
P2X1	D-LSSSVVRLKGLAVT--QLQGLG-PQ----VWDVADYVFFAHGDSFVVMTNFIVTPQ		111
P2X2	TGPESIIITKVKGITMS-----EDK-----VWDVEEYVKKPEGGSVVSIITRIEVTPS		107
P2X3	TAIESSVVTKVKGFGRY-----ANR-----VMDVSDYVTPPQGTSVFVITTKMIVTEN		101
P2X4	S-VVSSVTTKAKGVAVT--NTSQLG-FR----IWDVADYVIPAQEENSLFIMTNMIVTVN		110
P2X5	TSLQASAVVTKVKGVAYTNTTMLGER-----LWDVADFVIPSQGENVFFVVTNLIVTPN		112
P2X6	MDPQISVITKLVKGVSVTQVKELEKR-----LWDVADFVIRPSQGENVFFLVVTFNPLVTPA		113
P2X7	P-LISSVHTKVKGVAEVTENVTEGGVTKLVHGFIDTADYTLPLQG-NSFFVMTNLYLKSEG		113
		Exon 4	
P2X1	QTQGHCAENPE-GG-ICODISGCTPGKAERKAQGIKRTGNCVP-FNGTVK-TCEIFGWCFV	Exon 5	167
P2X2	QTLGTGCPESMRVHSSTCHSDDDCIAGQLDMQNGIIRTGHCVPYYHGDSK-TCEVSAWCFV		166
P2X3	QMCGFCPENEEKYR--CVSDSQC--GPERFPGGGILTGRCVN-YSSVLR-TCEIQGWCFV		155
P2X4	QTQSTCPEIPDKTS-ICNSDADCTPGSVDTHSSGVATGRCVP-FNESVK-TCEVVAWCFV		167
P2X5	QRQIGCAERREGIPDGECSEDDDCHAGESVAVGHGLKTRGCLR-VGNSTRGTCEIFAWCFV		171
P2X6	QVQGRCEPEHPSVPLANCAWDEDCPEGEMGTYSHGIRKIGQCVA-FNGTHR-TCEIWSWCFV		171
P2X7	QEQLKCPPEYPSRGK-QCHSDGGCIKGMWDQSKGIQTGRGIP-YDQKRK-TCEIFAWCPA		170
		Exon 6	
P2X1	EVDDKIPSPALLREANFTLPIKNSISPRFKVNRRLVVEEVNGTYMKKCLYHKIQAHPLC	Exon 7	227
P2X2	EDG-TSDNHFLGKMAPNFTILIKNSIHYPKFKFSKGNIASQKSD-YLKHCTFDQSDDPYC		224
P2X3	EVD-TVEMPIM-MEAENFTIFIKNSIRPLFNFEKGNLLPNLTDKDIKRCRFHPEKAPFC		209
P2X4	ENDVGVPTPAFLKAAENFTLLVKNNIWYKFNFSKRNILPNITTSYLKSCIYNAQTDPPFC		227
P2X5	ETK-SMPTDPLLKDAESFTISIKNFIKPFKFNFSKANVLETDNKHFLKTCHEFSSTN-LYC		229
P2X6	ESS-AVPRKPLLAQAKNFTLFIKNTVTFNKFNFSRTNALDWDNTYFKCYCLYDSLSSPYC		230
P2X7	EEGKEAPRPALLRSAENFTVLIKNIDFPGHNYTTRNILPGMNIS----CTFHKTWNPOC		226
		Exon 8	
P2X1	PVFNLGYVVRESQDFRSLAEKGGVVGITIDWKCDDLDDWHVRHCKPIYQFHGL---YGEKN		284
P2X2	PIFRLGFIVEKAGENFTELAHKGGVIGVIINWNCDDLSESECNPKYSPFRRLD--PKYDP		282
P2X3	PILRVGDVVKFAQDFAKLARTGGVVGIGIKIGWVCDLDAWDOCIPKYSFTRLDGVSEKSS		269
P2X4	PIFRLGTIVGDAGHSFOEMAVEGGIMGIIQIKWDCNLDRAASLCLPRYSFRRLDTRDLEHN		287
P2X5	PIFRLGSIVRWAGADFQDIALKGGVIGIYIEWDCCDLDAASKCNPHYIFNRLDNKHTHS-		288
P2X6	PVFRIGDLVAMTGGDFEDIALGGAVGINIHWDCNLDTKGSDCSPQVYSF-QLQE-----		283
P2X7	PIFRLGDIFQEIENETEVAVQGGIMGIEIYIWDCCNLDSSWHRCKPKYSFRRLDDEKYTNS		286
		Exon 9	
P2X1	LSPGFNFRFARHFVQ-NGTNRRLFRKVFGIHFDILVHGKAGKFDIIPMTTIGSGIGIFG	Exon 10	343
P2X2	ASSGYNFRFAKYKINGTTTTRTLIRAYGIRIDVIVHGQAGKFSLIPTIINLATALTSIG		342
P2X3	VSPGYNFRFAKYKMEGSEYRLLKAFGIRFDVIVYGNAGKFNIIPTIISVVAAFTSVG		329
P2X4	VSPGYNFRFAKYRDLAGKEQRTLTAKYGIRFDIIVFGKAGKFDIIPMTINVGSGLALLG		347
P2X5	ISSGYNFRFARYYRDPNGVEFRDLMKAYGIRFDVIVNGKAGKFSIIPTVINIGSGLALMG		348
P2X6	--RSGYNFRTANYWAAASGVESRSLKLYGIRFDIIVLTGQAGKFFALIPTAITVGTGAALWG		341
P2X7	LFPGYNFRYAKYKE-NGMEKRTLLKAFVRFDILVFGTGGKFDIIVLVVYIGSTLSYFG		345
		Exon 11	
P2X1	VATVLCDDLHLLH-----ILPKRHYYKQKFKYAEDMGPGEHDPV		384
P2X2	VGSFLCDWILLT-----FMNKNKLYSHKFKFDKVRTPKHPSSRWVPTL		384
P2X3	VGTVLCDIILLN-----FLKGADEYKARKFEEVTETTLKGTASTNPV		371
P2X4	VATVLCDDVIVLY-----CMKKKYYRDKKYYKVEDYEQGLSGEMNQ		389
P2X5	AGAFFCDLVLIY-----LIRKSEYVRDKKFEKVRGQKEDANVEVEAN		390
P2X6	MVTFLCDLHLLY-----VDREAGFYWRTKYEEARAPKATTNSA	379	
P2X7	LATVCDLIINTYASTCCRSRVYPSCKCCEPCAVNEYVYRKKCEPIVEPKPTLKYVSFVD		405
P2X1	ATSSLTGLQENMRTS 399		
P2X2	ALVLGQIPPPSHYSQDQPPSPSGEGPTLGEAELPLAVQSPRPCSISALTEQVVDTLG		444
P2X3	FASDQATVEKQSTDSGAYSIGH 393		
P2X5	EMEQERPEDEPLERVQDEQSQELAQSGRKQNSNCQVLEPARFGLRENAIVNVKQSQIL		450
P2X7	EPHIWMVDQQLLKGSLQDVKGQEVPRPQTFLELSRLSLSLHSSPPIPGQPEMQLLQIE		465
P2X2	QHMQRPPVPEPSQDSTSTDPKGLAQL 472		
P2X5	HPVKT 455		
P2X7	AVPRSRDSDWCQCGNCLPSQLPENRRALEELCRRKPGQCITTELSFKIVLSREALQL		525
P2X7	LLLYQEPLLALEGEAINSKLRHCAYRSYATWRFVSDMADFAILPSCCRWKIRKEFPKTQ		585
P2X7	GQYSGFKYPY 595		

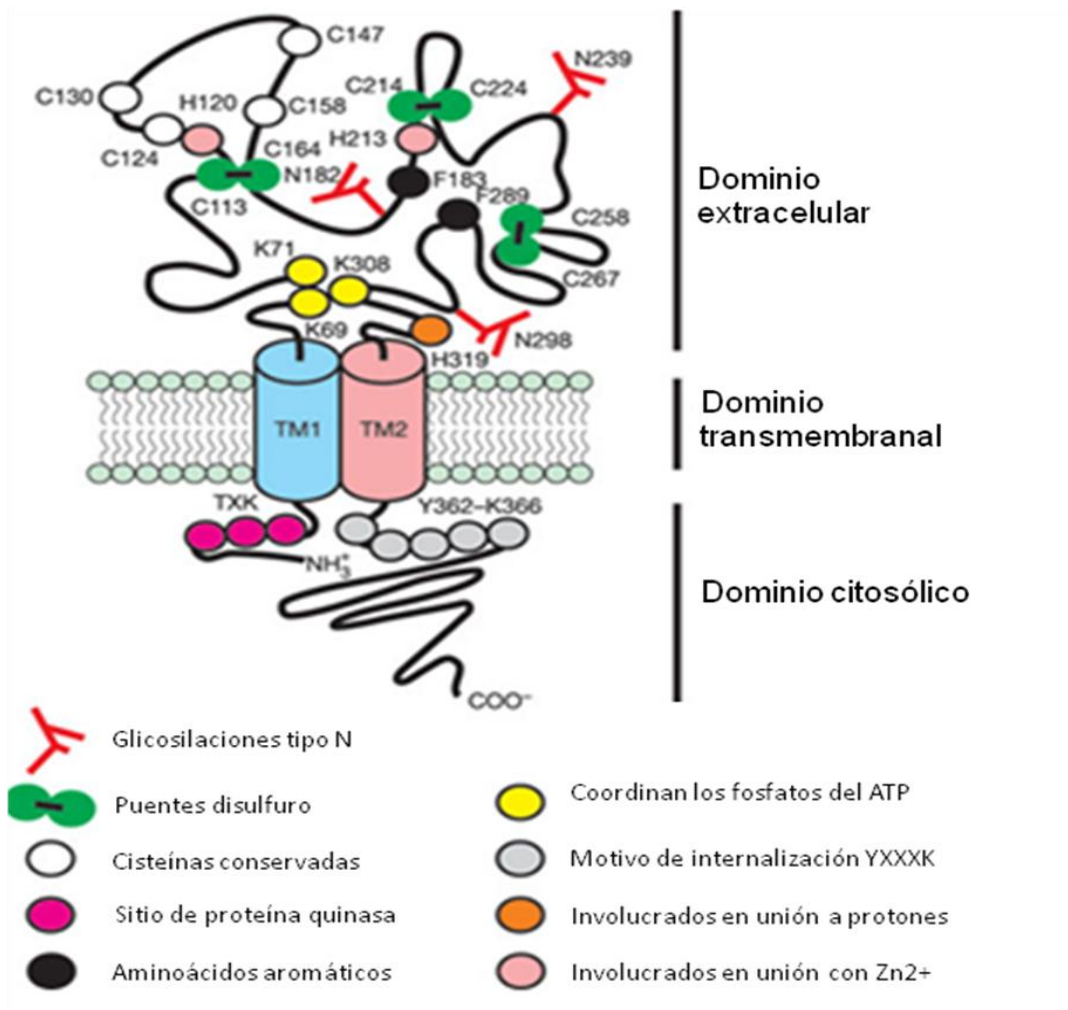
**Figura 2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los receptores P2X de la rata.** Los aminoácidos conservados se muestran en cajas, las cisteínas conservadas están sombreadas y las dos regiones transmembranales hidrofóbicas se encuentran indicados con una línea sobre ellos. También se indica el inicio de cada exón. Las secuencias y la estructura genómica se obtuvo de las secuencias con número de acceso: P47824 (P2X1), 2020424A (P2X2), CAA62594 (P2X3), CAA61037 (P2X4), CAA63052 (P2X5), CAA63053 (P2X6), y CAA65131 (P2X7).



Las proteínas de las subunidades P2X tienen diferente tamaño que varía en el rango de 388 (P2X4) a 595 (P2X7) aminoácidos, número de aminoácidos correspondientes a la rata. Cada subunidad tiene dos regiones hidrofóbicas (TM1 y TM2) que se extienden aproximadamente del residuo 30 al 50 y del 330 al 353 (números correspondientes al P2X2 de rata) (ref). Evidencia experimental y estructural ha mostrado que el TM1 es responsable del “*gating*” o apertura del canal y el TM2 forma el poro por donde pasan los iones. Dichas regiones hidrofóbicas están separadas por la parte más grande del polipéptido (~280 aminoácidos) conocida como asa extracelular, la cual está involucrada en la unión con el ATP. Los extremos NH<sub>2</sub> y COOH de la proteína son intracelulares y el carboxilo es la región que más difiere entre genes parálogos. Sin embargo, una secuencia dentro de la región C-terminal, YXXXX (donde X es cualquier aminoácido) se conserva entre los receptores P2X y está involucrada con la retención en la membrana celular (Khakh and North, 2006) (Fig. 3). Considerando la región de la proteína que incluye los dos dominios transmembranales y el dominio extracelular (aminoácidos 30-353 del P2X2 de la rata), las subunidades P2X son 40 a 55% idénticas, de éstas la P2X4 es la más parecida con respecto a las demás y la P2X7 la más diferente.

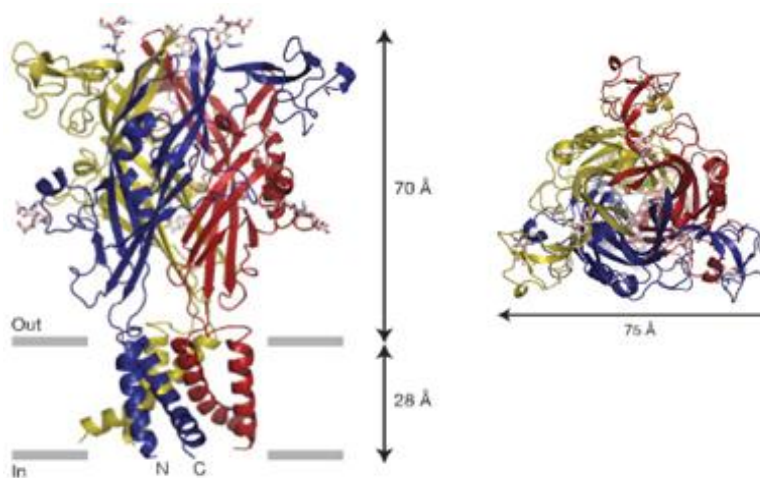
Diez cisteínas conservadas entre las diferentes subunidades se encuentran en el asa extracelular, éstas forman puentes de disulfuro que contribuyen a la estructura terciaria de la proteína, y los residuos consenso (Asn-X-Ser/Thr) también presentes en ésta región, contribuyen a las glicosilaciones tipo N de dichos receptores (Fig. 3). Los grupos terminales amino y carboxilo presentan motivos o aminoácidos involucrados en otras funciones, tales como: endocitosis del canal, cambios de permeabilidad, unión a

lipopolisacáridos e interacción con otras proteínas (Khakh and North, 2006; Murrell-Lagnado and Qureshi, 2008).



**Figura 3. Topología y aminoácidos clave de una subunidad de P2X.** Caricatura que muestra los dos dominios transmembranales (TM1 y TM2), el asa extracelular, el grupo amino y carboxilo terminal ambos intracelulares. En círculos de diferentes colores se muestran los residuos clave involucrados en diferentes procesos de la fisiología del canal. Los números corresponden al P2X2 de rata. Figura tomada de: (Khakh and North, 2006).

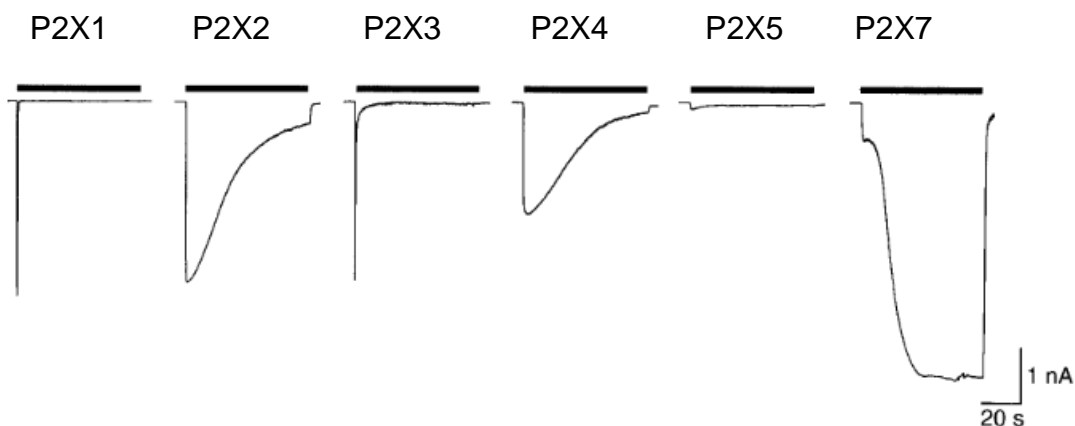
Como se había propuesto por trabajos previos la estructura molecular de los receptores P2X, de acuerdo al modelo obtenido por cristalografía de rayos x de la estructura del receptor P2X4 del *Pez cebra*, es de un trímero que consiste de una o más subunidades diferentes (Kawate et al., 2009; Torres et al., 1999). Los receptores P2X muestran una topología como la mencionada en páginas anteriores (Khakh and North, 2006; North, 2002; Roberts et al., 2006), y que Kawate *et al.* (2009) describe de la siguiente manera: cada subunidad sale de la membrana plasmática como un “delfín del agua” con su “cola” sumergida dentro de la bicapa lipídica. El ectodominio se proyecta 70 Å sobre la membrana y existen tres vestíbulos en el centro del ectodominio. El ATP y sus análogos parecen unirse también a un sitio no canónico a ~45 Å del canal iónico en el dominio extracelular.



**Figura 4. Estructura molecular de los receptores P2X en base al modelo de listones obtenido de la cristalización del receptor P2X4 del *Pez cebra*.** Resolución de 3.5 Å que muestra que el receptor es un trímero y que el cuerpo de las tres subunidades interactúa entre sí formando una cavidad central vertical. Figura tomada de: (Kawate et al., 2009).

Los receptores P2X al estar compuestos por la misma o por diferentes subunidades homómeros o heterómeros respectivamente, tienen propiedades biofísicas y

farmacológicas específicas que difieren entre especies (Bo et al., 1995; Brake et al., 1994; Chen et al., 1995; Surprenant et al., 1995; Valera et al., 1994). Cada receptor P2X tiene una sensibilidad al ATP, comportamiento biofísico: activación, desensibilización, desactivación, y farmacología que lo caracteriza. Por ejemplo, los receptores homoméricos P2X1 al P2X4 y el P2X7 al ser activados por ATP responden con corrientes robustas y un tiempo de activación rápido, mientras que el P2X5 casi no responde. La desensibilización (declive de la corriente en presencia continua del agonista) es muy rápida en los receptores P2X1 y P2X3, mientras que P2X2 y P2X4 tienen una desensibilización más lenta y el P2X7 no se desensibiliza (Fig. 5).



**Figura 5. Registros de corriente característicos de los receptores P2X homoméricos.** Registros de *patch clamp* en célula completa de las corrientes inducidas por ATP 30  $\mu$ M, excepto 1 Mm para P2X7, en células HEK293 transfectadas con las subunidades P2X de la rata (P2X6 no responde al ATP por sí solo). Todos excepto el P2X5 responden eficazmente a la aplicación de ATP, P2X1 y P2X3 tienen una desensibilización rápida, P2X2 y P2X4 tienen una desensibilización lenta y el P2X7 no presenta desensibilización.

Todas las subunidades P2X pueden formar receptores homoméricos con excepción de la P2X6, la cual requiere ensamblarse con otras subunidades para formar

un canal funcional, y en teoría todas las subunidades pueden formar receptores heteroméricos a excepción de la P2X7 que sólo puede formar receptores homoméricos, (Antonio et al., ; Coddou et al., 2011; North, 2002). Existe evidencia bioquímica y funcional de la formación de receptores heteroméricos entre subunidades: P2X1/P2X4 (Nicke et al., 2005), P2X2/P2X3 (Radford et al., 1997; Torres et al., 1999), P2X1/P2X5 (Le et al., 1999), P2X2/P2X6 (King et al., 2000), y P2X4/P2X6 (Lê et al., 1998). Tanto receptores homoméricos como heteroméricos son activados por ATP con una  $EC_{50}$  en un rango de 1 a 100  $\mu$ M con excepción del P2X7 que es más bien activado por concentraciones de ATP en el rango de Mm. Algunos agonistas de los receptores P2X son: el  $\alpha,\beta$ -metileno ATP, el BzATP, el ATP- $\gamma$ -S y los antagonistas: TNP-ATP, suramina y PPADS, sin embargo, la mayoría de ellos son inespecíficos. Además, los receptores P2X pueden ser modulados por otras sustancias como cationes divalentes ( $Zn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ), Ph del medio y algunos fármacos (Cuadro I) (Roberts et al., 2006).

**Cuadro I.** Algunas propiedades farmacológicas y fisiológicas de los receptores P2X.

	ATP EC <sub>50</sub> μM	Sensibilidad al α,β-me ATP	Caída de corriente	Efecto de alto Ca <sup>2+</sup>	Efecto del Ph	Efecto del Zinc (10 μM)
P2X <sub>1</sub>	1	Si	Rápida	Sin efecto	Sin efecto	Disminución
P2X <sub>2</sub>	10	No	Lenta	Disminución	Disminución	Aumento
P2X <sub>3</sub>	1	Si	Rápida	Sin efecto	Sin efecto	Aumento
P2X <sub>4</sub>	7	No	Lenta	-	Sin efecto	Aumento
P2X <sub>5</sub>	0.5	No	Lenta	Disminución	Sin efecto	Aumento
P2X <sub>6</sub>	0.5	Si	Lenta	-	-	-
P2X <sub>7</sub>	>100	No	Lenta	Disminución	-	Disminución
P2X <sub>1/2</sub>	0.6	Si	Rápida/Lenta	-	Aumento	-
P2X <sub>1/4</sub>	-	Si	Lenta	-	-	-
P2X <sub>1/5</sub>	~5	Si	Rápida/Lenta	Sin efecto	Disminución	-
P2X <sub>2/3</sub>	1	Si	Lenta	Disminución	Disminución	Aumento
P2X <sub>2/6</sub>	32	No	Lenta	-	Disminución	Aumento
P2X <sub>4/6</sub>	6	Si	Lenta	-	-	Aumento

(-) Condiciones no estudiadas para ese receptor

Fuente: (Roberts et al., 2006)

## II. INTRODUCCIÓN

### 2.1. El Receptor P2X4

El receptor P2X4 pertenece a la familia de receptores P2X, Se expresa tanto en el sistema nervioso periférico como en el sistema nervioso central (Buell et al., 1996; Roberts et al., 2006; Seguela et al., 1996; Sim et al., 2007; Stojilkovic et al., 2010; Yamamoto et al., 2000). En éste último se expresa ampliamente tanto en la espina dorsal como en el cerebro, particularmente en las sinapsis glutamatérgicas (Rubio and Soto, 2001; Seguela et al., 1996; Soto et al., 1996), sin embargo, su papel fisiológico aún no es claro.

Se ha encontrado que el receptor P2X4 participa en el desarrollo de inflamación mediada por liberación de prostaglandina E2 en el sistema inmune (Ulmann et al., 2008), en la regulación de la función del endotelio vascular del sistema circulatorio (Yamamoto et al., 2006), en la alodinia observada durante procesos inflamatorios, y en el desarrollo de dolor neuropático vía la activación de microglía de la espina dorsal (Guo et al., 2005; Inoue et al., 2004; Tsuda et al., 2009; Tsuda et al., 2003; Ulmann et al., 2008).

De sus propiedades biofísicas se conoce su sensibilidad al ATP que es intermedia ( $EC_{50} = 7 \mu M$ ) con respecto a los demás P2X, su desensibilización lenta que es controlada por la región C-terminal del receptor, en específico por el aminoácido aminado Lys373 y el aromático Y ó F 374 (Fountain and North, 2006). Además presenta propiedades farmacológicas distintivas como baja sensibilidad ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ) (Buell et al., 1996; Soto et al., 1996) o modulación positiva de las corrientes inducidas

por ATP (Bo et al., 1995; Townsend-Nicholson et al., 1999) con el antagonista purinérgico suramina. En el ratón (Norenberg et al.), es el único de los receptores P2X que es modulado positivamente por el fármaco antiparasitario ivermectina como se ha determinado en sistemas de expresión heteróloga (Coddou et al., 2011; Khakh et al., 1999; Priel and Silberberg, 2004; Sim et al., 2006). También se ha reportado que el  $Zn^{2+}$  modula positivamente a los receptores P2X4, sin embargo, éste efecto no es específico debido a que causa un efecto similar sobre los receptores P2X2, P2X3 y P2X5 (Coddou et al., 2011). Y es el único de los receptores P2X que se internaliza constitutivamente por un mecanismo de endocitosis dependiente del complejo AP2/clatrina (ref).

## *2.2. Receptores P2X en el sistema nervioso entérico*

Como se menciona anteriormente de acuerdo al tejido donde se expresan, la activación de los receptores P2X está relacionada con diferentes procesos. En el plexo mientérico la aplicación de ATP de forma exógena tanto en neuronas S como AH, produce potenciales excitatorios rápidos y lentos (Galligan and Bertrand, 1994). Sin embargo, la mayor parte de la señalización purinérgica en el SNE está mediada por corrientes postsinápticas excitatorias rápidas y estas por receptores P2X (Barajas-Lopez and Huizinga, 1996; Robertson and Edwards, 1998; Zhou and Galligan, 1996).

Específicamente en las neuronas mientéricas del intestino delgado del ratón se ha descrito que los receptores P2X2, que se encuentran ampliamente distribuidos en este plexo mientérico y están directamente implicados en la neurotransmisión excitatoria rápida (Ren et al., 2003). Por otro lado la presencia de receptores P2X7



funcionales en las neuronas mientéricas del cobayo (Valdez-Morales et al., 2011) y en el tracto gastrointestinal del ratón (Gulbransen et al., 2012) concuerda con la abundante inmunoreactividad reportada para este receptor en el cobayo y otros roedores ((Hu et al., 2001; Vanderwinden et al., 2003).. La inmunoreactividad reportada para el receptor P2X3 es más bien débil (Ruan and Burnstock, 2005), lo cual se relaciona con las corrientes tipo P2X3 registradas en menos del 10% de las neuronas mientéricas del ratón (Ren et al., 2003). También se ha descrito una extensa inmunoreactividad para el receptor P2X5 que parece estar localizada principalmente en las fibras nerviosas (Ruan and Burnstock, 2005), lo cual ha dificultado la cuantificación de la proporción de neuronas que contienen este receptor. Al parecer no existe inmunoreactividad para los receptores P2X1, P2X6 o P2X4, (Ruan and Burnstock, 2005). Sin embargo existen hallazgos controversiales al menos para el receptor P2X4 en el intestino de la rata utilizando anticuerpos contra diferentes epitopos. Se ha encontrado inmunoreactividad para el receptor P2X4 distribuida ampliamente dentro del plexo mientérico de la rata (Bo et al., 2003) pero un estudio mas reciente localiza la inmunoreactividad del receptor P2X4 en los macrófagos del intestino (Yu et al., 2010).

A pesar de que las propiedades farmacológicas de los receptores P2X nativos de las neuronas mientéricas del intestino delgado del ratón (Guerrero-Alba et al., 2010), tienen propiedades farmacológicas que difieren ampliamente con aquéllas reportadas para el receptor P2X4 recombinante (Jones et al., 2000; Townsend-Nicholson et al., 1999), es probable que este receptor se encuentre en las neuronas mientéricas debido a la amplia distribución que guarda en los diferentes órganos y tejidos (Bo et al., 2003; Surprenant and North, 2009). Probablemente se encuentra formando canales

heteroméricos con otros P2X, lo que cambia sus propiedades farmacológicas y electrofisiológicas originales.

## V.

## JUSTIFICACIÓN

Al receptor P2X4 se le ha atribuido participación en la regulación de la excitabilidad neuronal y sináptica, así como en procesos fisiológicos de importancia médica ó de interés farmacéutico como la regulación del endotelio vascular, la inflamación, y el dolor neuropático. No se ha reportado su presencia en el sistema nervioso entérico del ratón. Sin embargo, no existe evidencia sólida para descartarla. Investigar su presencia en el sistema nervioso entérico de un organismo modelo como el ratón, contribuye al conocimiento de los receptores P2X que están presentes en este tejido, y a su implicación en la señalización purinérgica tanto en procesos funcionales como patológicos.

## IV. HIPÓTESIS

El receptor P2X4 se expresa en las neuronas mientéricas del ratón.

## V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión del receptor P2X4 en las neuronas mientéricas del ratón, si contribuye en los canales P2X nativos, y si se co-expresa con el receptor P2X5.

## VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Identificar la presencia del mRNA y la proteína del receptor P2X4 en el intestino delgado del ratón por las técnicas de RT-PCR y Western blot.
- 2.- Investigar la presencia y distribución del mRNA del receptor P2X4 individualmente en las neuronas mientéricas del ratón, mediante la técnica de *RT-PCR* en célula única.
- 3.- Determinar la presencia de del receptor en las neuronas mientéricas por medio de la técnica de inmunocitoquímica.
- 4.- Determinar si el receptor P2X4 se encuentra en la membrana plasmática de las neuronas mientéricas del ratón contribuyendo a las corrientes inducidas por ATP ( $I_{ATP}$ ), mediante la técnica de patch-clamp en su configuración de célula completa,.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Cultivos primarios de neuronas mientéricas

Ratones C57BL/6J (19-25g) de ambos sexos fueron sacrificados por dislocación cervical. Inmediatamente después del sacrificio se removió un segmento de 10 a 15 cm del yeyuno y se colocó en solución modificada de Krebs gasificada con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> (en Mm: NaCl, 126; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; MgCl<sub>2</sub>, 1.2; CaCl<sub>2</sub>, 2.5; KCl, 5; NaHCO<sub>3</sub>, 25; glucosa, 11). En seguida la capa *muscularis* externa, conteniendo el plexo mientérico, fue retirada y utilizada para preparar los cultivos primarios. Las neuronas del plexo mientérico se disociaron mediante un tratamiento secuencial con dos soluciones enzimáticas como ha sido reportado por nuestro laboratorio (Barajas-Lopez and Huizinga, 1996). La primera contiene papaína (0.01 mg/ml; activada con 0.4 mg/ml de L-cisteína) y la segunda trypsin (1 mg/ml) y dispasa (4 mg/ml). Las enzimas fueron removidas con medio L15 y las neuronas dispersadas en solución de cultivo y colocadas sobre cubreobjetos redondos cubiertos con colágena extraída de la cola de rata. El medio de cultivo fue preparado con medio mínimo esencial 97.5% (V/V), suero fetal bovino 2.5% (v/v) y suplementado con glucosa 15 Mm, L-glutamina 2 Mm, antibióticos (penicilina 10 U/ml, estreptomomicina 10 µg/ml), y antimetabólicos (-β-D-citosina 10 µM, -β-D- arabinofuranosido, fluorodeoxyuridina 10 µM, y uridina 10 µM) para prevenir el crecimiento de células no neuronales.

## 7.2. Registros de patch clamp

Utilizando un amplificador tipo Axopatch 200B (*Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA*), se llevaron a cabo registros de corriente en célula completa de acuerdo a lo descrito previamente (Barajas-Lopez and Huizinga, 1996). Las corrientes fueron filtradas a 0.5 o 1 kHz y muestreadas a 1 o 2 kHz respectivamente. Los registros se realizaron a temperatura ambiente (22-24°C). Las pipetas de *patch clamp* con resistencias de 1 a 4 MΩ se montaron en un micromanipulador (Sutter, MP-851 Novato, CA, USA). Éstas resistencias de pequeña magnitud y una ligera succión dentro de la pipeta durante los registros de corriente, permitieron mantener una resistencia de bajo acceso (menor de 5 MΩ), lo que genera un error en el voltaje fijado de menos de 10 Mv para las corrientes menores de 2 nA, por lo tanto, no se requiere compensación para este factor. El potencial de membrana se mantuvo a -60 Mv durante los experimentos de fijación de voltaje y las corrientes de membrana se capturaron en el disco duro de una PC mediante el programa CLAMPEX 6 (*Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA*) y se analizaron utilizando el software AXOGRAPH 4.9 (*Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA*).

En algunos experimentos se utilizó un protocolo de rampas de voltaje el cual consistió en un paso constante precondicionado de voltaje desde -60 a +70 Mv por 400 ms (para inactivar corrientes transitorias), seguido de una rampa de voltaje de 1100 ms desde +70 a -110 Mv, ver *inset* de la figura de 1B. Las Corrientes de membrana generadas en respuesta a esta rampa de voltaje fueron registradas antes (control) y después en la presencia de ATP. Las corrientes obtenidas como control fueron sustraídas de aquéllas registradas en la presencia de ATP para obtener solamente las corrientes

inducidas por éste agonista. Las corrientes inducidas por ATP ( $I_{ATP}$ ) fueron después graficadas contra el potencial de membrana para construir la gráfica de relación corriente-voltaje mostrada en este estudio. En los experimentos de rampas de voltaje las corrientes fueron almacenadas en un disco duro de una PC utilizando CLAMPEX 6 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Además éstos experimentos se llevaron a cabo en la presencia de 30 Mm de tetraethyl amonio (TEA) y 30  $\mu$ M de  $Cd^{2+}$  para bloquear la mayoría de de las corrientes de calcio y potasio dependientes de voltaje.

Durante los experimentos electrofisiológicos la cámara de registro fue bañada continuamente con solución externa estándar a una velocidad de flujo de aproximadamente 2 ml/min. El intercambio rápido de la solución externa alrededor de las neuronas registradas se logró mediante el uso de un aparato de ocho tubos, en el cual cada tubo está conectado por una manguera a jeringas que contienen la solución control y las solución(es) experimental(es) dadas. El tubo que contiene la solución control se posiciona enfrente de la célula a registrar y la aplicación externa de las substancias se lleva a cabo moviendo de forma abrupta de un tubo a otro posicionándolos enfrente de la célula. Dicho aparato se montó sobre una mesa de registro y se movió mediante un micromanipulador de robot de agua (WR-88; *Narishigue Scientific Instrument Lab, Tokyo Japan*). Los efectos de las substancias fueron determinados mediante el regreso a la solución control, posicionando el tubo que la contiene enfrente de la célula. La solución externa fue aplicada por gravedad mediante una manguera, y el nivel de la jeringa se ajustó frecuentemente para minimizar cambios en la velocidad de flujo. La composición de la solución externa estándar fue: (en Mm): NaCl, 160;  $CaCl_2$ , 2; glucosa, 10; HEPES, 5 y CsCl, 3; el Ph se

ajustó a 7.3-7.4 con NaOH. La composición de la solución estándar que contenía la pipeta fue: (en Mm): CsCl, 150; EGTA, 10; HEPES, 5; NaCl, 10; ATPMg, 4.5 y GTPNa, 0.1; el Ph se ajustó a 7.3–7.4 con CsOH.

### *7.3. Amplificación por RT-PCR a partir del yeyuno*

El cerebro (control) y un segmento de 10 cm de yeyuno fueron removidos de ratones C57B/6JL inmediatamente después de sacrificarlos. Los tejidos se trituraron en un mortero con nitrógeno líquido y se aisló el RNA total utilizando el *kit* de extracción de *Ambion RNAqueous RNA isolation kit (Life Technologies, Texas, USA)* siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. En seguida 5 µg de RNA total se convirtió a a Cdna de cadena sencilla por la reacción de RT utilizando oligo (Dt)<sub>18</sub> y la enzima *SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies, Texas, USA)*. La reacción se llevó a cabo por una hora y media a 42 °C de acuerdo al protocolo indicado por el fabricante. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo con el par de oligonucleótidos P2X4-1S y P2X4-1AS (Ver secuencia en el Cuadro II), y la DNA polimerasa *Platinum Pfx (Life Technologies, Texas, USA)*. Los controles negativos de la reacción de RT se llevaron a cabo sin la enzima; no se obtuvieron amplificaciones falsas (datos no mostrados). El protocolo de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 3 min seguido de 38 ciclos de amplificación. Cada ciclo de amplificación consistió de las siguientes fases: i) desnaturalización a 94°C por 15 s, ii) alineamiento a 60°C por 20 s, iii) elongación a 68°C por 1.5 min, y iv) elongación final a 68°C por 5 min. Los controles negativos para las PCRs se llevaron a cabo sin DNA templado; no se obtuvieron amplificaciones falsas. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (1 µg/ml).



Las imágenes fueron digitalizadas utilizando el fotodocumentador de geles Gel-Doc 2000 (*Bio-Rad*). Los productos de PCR se clonaron en el vector de clonación *Pgem-T Easy* (*Promega, Wisconsin, USA*) y se secuenciaron. El análisis de las secuencias se realizó utilizando herramienta bioinformática, *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), y el programa *DNASTAR Lasergen* versión 7.1.

Los oligonucleótidos P2X4-1S y P2X4-1AS (Cuadro III) fueron diseñados para la amplificación específica del ORF completo de la secuencia de P2X4 de ratón, basándose en las regiones no traducibles 5' y 3' de la secuencia con número de acceso: NM\_011026.

#### 7.4. Western blot de yeyuno

El cerebro (control) y el yeyuno de ratones fueron removidos y colocados en tubos de vidrio de 5 ml conteniendo 2 ml de buffer de lisis de baja concentración salina: Tris-HCL, 50 Mm; NaCl, 10 Mm y Triton 1:100 v/v, y se trituraron mecánicamente con un pistilo estéril. En seguida fueron sonicados con el siguiente programa: 5 s *on* y 5 s *off*, descanso de un minuto y de nuevo otro minuto de 5 s *on* y 5 s *off* a una amplitud del 40%. Los tejidos homogenizados fueron luego centrifugados a 2500 g por 5 min para eliminar restos de tejido. Una vez centrifugados se cálculo la concentración de proteína por el método de Bradford.

De 2 a 5 µg de proteína de cerebro y yeyuno fueron separadas en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS) al 12% (w/v) y se corrieron a 120 V por 150 min y 4°C. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de

nitrocelulosa por 1 h a 400 Ma, y 4°C. Las membranas con las proteínas adheridas se bloquearon por 1 h con tris-solución salina y 8% de leche libre de grasa. En seguida se dejaron incubando toda la noche a 4°C con el anticuerpo policlonal primario de conejo, anti-P2X4 de humano dirigido contra los aminoácidos 1-40 del N-terminal (sc-28764, *Santa Cruz Biothecnology, Dallas, TX, USA*), a una dilución de 1:2200 v/v. Después se lavaron y se incubaron por 2.5 horas con el anticuerpo secundario de cabra anti inmunoglobulina G de conejo conjugado a per oxidasa de rábano (cat. No. 12-348, Millipore, CA, USA), a una dilución 1:3000 v/v. La inmunoreactividad fue revelada utilizando 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (*TMB*). Los pesos moleculares aparentes fueron asignados con el marcador de proteína (*Benchmark Prestained Protein Ladder; Invitrogen Co, CA, USA*).

#### *7.5. Inmunohistoquímica para el receptor P2X4 en cultivo de neuronas mientéricas*

Cultivos de neuronas mientéricas, después de 5 días de sembrados, fueron lavados y sumergidos en solución de fijación conteniendo paraformaldehído (3% v/v) y glutaraldehído (0.02% v/v en PBS), durante 15 min. Esta solución fue lavada y las células permeabilizadas con una solución de TritonX-100 (0.01% v/v en PBS) durante 15 min. El TritonX-100 fue lavado y en seguida las células fueron incubadas en solución de bloqueo universal (Dako Diagnostics Canada Inc., Cat # CD310081) durante 6 horas. La solución bloqueadora universal fue removida y luego se añadieron uno u otro anticuerpo primario en diluciones 1:200 o 1:500 respectivamente (en solución de suero bovino, albumina, 1% v/v) durante 8 horas. En seguida se lavaron los anticuerpos primarios y las células se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti inmunoglobulina G de conejo conjugado a per oxidasa de rábano (cat. No.

12-348, Millipore, CA, USA; diluído en 1:500 con la solución de albumina suero bovino). Se lavó el anticuerpo secundario y para visualizar la inmunoreactividad se añadió una solución de diaminobenzidina (DAB, 0.05 mg/ml de PBS 60% v/v mas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.01%) durante 25 min. Los cubreobjetos conteniendo las neuronas fueron en seguida lavadas y montadas con PPD-medio de montaje (90% glicerol en PBS) y se sellaron con esmalte de uñas. Los anticuerpos primarios policlonales fueron: sc-28764 (dirigido contra los aminoácidos 1-40 del N-terminal del receptor P2X4 de humano; Santa Cruz Biotechnology Inc.) y el orb 100036 (dirigido contra el receptor P2X4 de humano, Biobyte, Cambridge, Cambridgeshire, UK). Ambos anticuerpos utilizados fueron contra conejo. El Ph de las soluciones utilizadas fue ajustado a 7.5 y las neuronas fueron lavadas utilizando PBS a temperatura ambiente. En los controles negativos los anticuerpos primarios fueron omitidos (n=2), y no se obtuvo inmunoreactividad en ninguno de ellos.

#### 7.6 RT-PCR en célula única

Neuronas mientéricas de cultivos primarios de 3-7 días de edad fueron reconocidas sobre otros tipos celulares que pueden estar presentes en el cultivo en base a que las neuronas tienen largas neuritas que salen de ellas, y un cuerpo redondo, compacto y brillante de entre 15 a 25  $\mu$ M. Utilizando un equipo de *patch clamp* y pipetas de vidrio, se aspiraron neuronas únicas por medio de succión en una manguera conectada a una micropipeta de vidrio que contenía 6  $\mu$ l de amortiguador de reacción RT libre de Rnasa (inhibidor de Rnase, 20 U; oligo (Dt)<sub>18</sub>, 2.3  $\mu$ M; dNTPs, 150  $\mu$ M; Dtt 1.2 Mm; FS 5X RT Buffer, todo del kit *Superscript II First-Strand Synthesis System*; Life Technologies, Texas, USA). El contenido de la pipeta se deposito en el fondo de un tubo de PCR

conteniendo 12 µl del buffer RT antes mencionado y 0.5 µl de Triton 1% para permitir la solubilización de la membrana celular. La reacción fue incubada a 65°C por 2 min, luego añadida con 0.5 µl de transcriptasa reversa II, ejecutada a 37°C por 60 min, e inactivada por calor mediante su incubación a 70 °C por 10 min. Una vez obtenido el Cdna, se llevaron a cabo amplificaciones por PCRs anidados para P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>5</sub> utilizando diluciones 1:10 v/v del PCR anterior. Los oligonucleótidos utilizados se diseñaron en base a las secuencias del P2X<sub>4</sub> (Nmo11026) Yp2X<sub>5</sub> (033321), ambas disponibles en la base de datos del NCBI. Para conocer la secuencia de los oligonucleótidos y mas información sobre las reacciones de PCR, ver el Cuadro II. Los PCRs se llevaron a cabo con la DNA Polimerasa *Taq Platinum* (*Life Technologies, Texas, USA*). El protocolo de PCR utilizado empezó con una desnaturalización inicial a 94°C por 3 min seguida de 30 ciclos de amplificación, cada ciclo incluyó las siguientes fases: i) desnaturalización a 94 °C por 15 s, ii) alineamiento a 60 °C por 15 s, iii) elongación a 72°C por 1 min 30 s, por último después de los ciclos de amplificación, una fase de elongación a 72°C por 5 min. Los controles negativos para los PCRs se llevaron a cabo sin DNA templado; no se obtuvieron falsas amplificaciones. Por último los PCRs fueron

**Cuadro II.** Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR del intestino y PCR en célula única.

Transcript	PCRs	Alignment Temperature (°C)	Oligonucleotides
P2X4	1st	60	P2X4-1 S: 5'-TGGCAGCGACAAGGCGAC-3' P2X4-1 AS: 5'-GCCTGAGATGTGTACAATGAACC-3'
	2nd	60	P2X4-2 S: 5'-TTACGTCATTGGGTGGGTG-3' P2X4-2 AS: 5'-TCTCTTCTTCATGCAGTAGAGG-3'
	3rd	60	P2X4-3 S: 5'-GTCTGTCAAGACGTGTGAGGTGGC-3' P2X4-2 AS: as above
P2X5	1st	60	P2X5-1 S: 5'-AGAGTGCTCGGTTGGCTG-3' P2X5-1 AS: 5'-GGCCCAGACATCTTTGAATC-3'
	2nd	60	P2X5-2 S: 5'-AGGGCGGTGTGATAGGAAT-3' P2X5-1 AS: as above

### 7.7. Reactivos y soluciones

Para los cultivos primarios, el medio L15, el medio mínimo esencial, la solución de Hank, la penicilina-estreptomicina y la L-glutamina fueron comprados de GIBCO *Life Technologies* (Texas, USA), por su parte el suero fetal bovino fue de ATCC. Colagenasa y papaína fueron adquiridos de *Worthington* (New Jersey, USA), y la dispasa de *Roche Bioscience* (Indianapolis, USA). Para los registros de *patch clamp* las soluciones stock (0.01-0.1) fueron preparadas utilizando agua deionizada excepto para la ivermectina y el KN-62 (1-[N,O-Bis(5-isoquinolina sulfonil)bencil]-2-(4-fenylpiperazina)etil]-5-isoquinolina fonamida) las que fueron preparadas con dimetil sulfoxido (DMSO) como solvente. Las soluciones fueron mantenidas a 4°C, excepto las

de ATP, las cuales fueron preparadas antes de cada experimento. La concentración final deseada se obtuvo diluyendo las soluciones stock en solución externa antes de la aplicación. El resto de las sales y sustancias fueron todas adquiridas de Sigma-Aldrich (Toluca, México).

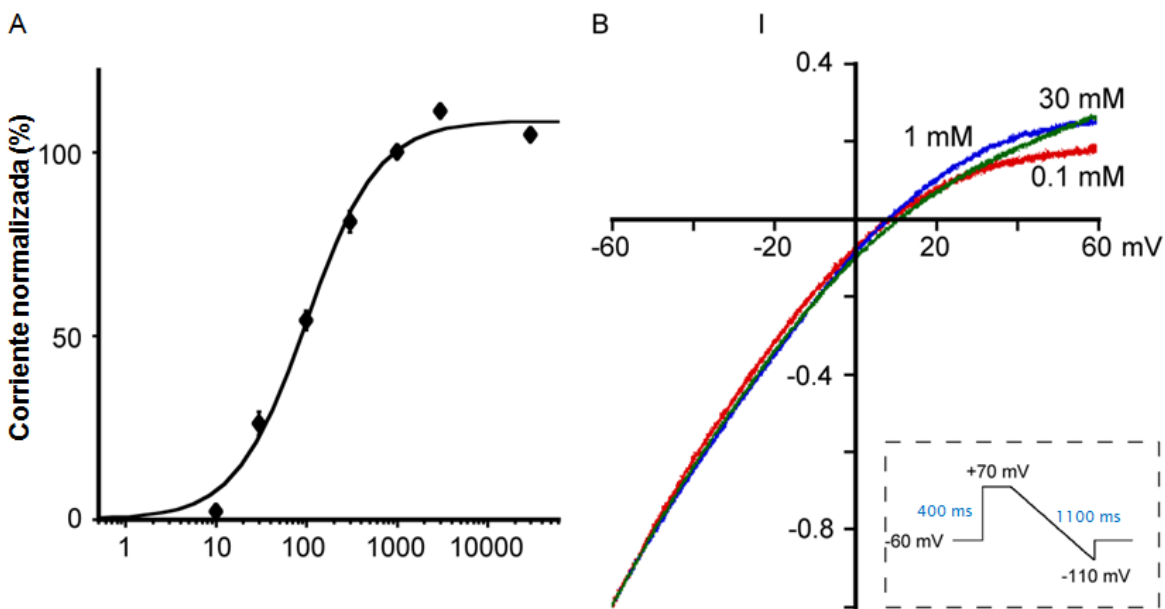
### 7.8. Análisis de los datos

Para normalizar las corrientes inducidas por ATP, las respuestas con 100 o 1000  $\mu\text{M}$  fueron consideradas como el 100% en cada célula. El efecto de la ivermectina fue probado contra concentraciones equipotentes de ATP que evocaron corrientes cercanas a la respuesta máxima (indicada en cada caso). Para determinar los valores de  $\text{IC}_{50}$ s o  $\text{EC}_{50}$ s, las curvas obtenidas de los datos graficados de concentración contra la respuesta fueron ajustadas a una función logística de tres parámetros (Kenakin, 1993). La prueba no pareada  $t$  de *Student* (después de la prueba de ANOVA) fue utilizada para evaluar las diferencias entre los valores promedio obtenidos de diferentes grupos de células. Los valores  $P$  de dos colas iguales o menores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (E.S.M.) El número de células utilizado en cada experimento se representa con una "n".

## VIII. RESULTADOS

### *8.1. Dependencia de la concentración y el voltaje que presentan las corrientes inducidas por ATP.*

Como ya se ha reportado por nuestro laboratorio (Guerrero-Alba et al., 2010), en experimentos de fijación de voltaje (potencial de membrana fijado a -60 Mv), la aplicación de ATP a concentraciones de 0.01 a 30 Mm induce una corriente entrante ( $I_{ATP}$ ) en 87 de 92 neuronas mientéricas probadas. Se observe una corriente pequeña con ATP 10  $\mu$ M, siempre menor del 5% (promedio  $2.6 \pm 1$ ;  $n=7$ ) de la respuesta obtenida con ATP 1 Mm. La amplitud del pico de la corriente fue completamente reproducible cuando el ATP se aplico en intervalos de 5 min. El efecto del ATP fue dependiente de la concentración y tuvo una  $EC_{50}$  de 102  $\mu$ M (Guerrero-Alba et al., 2010). Esta curva concentración-respuesta fue monofásica (Fig. 6A) y las relaciones corriente-voltaje en un amplio rango de concentraciones de ATP (0.1, 1 y 30 Mm) mostraron casi el mismo potencial de inversión, y rectificación entrante similar (Fig. 6B). Estas observaciones sugieren que las corrientes inducidas por ATP ( $I_{ATP}$ ) están mediadas por canales con sensibilidad al ATP y nivel de rectificación similar.



**Figura 6. Las corrientes inducidas por diferentes concentraciones de ATP parecen estar mediadas por canales con propiedades similares.** A. La curva concentración-respuesta de las neuronas mientéricas del ratón es monofásica. La amplitud del pico de la  $I_{ATP}$  (representada como porcentaje de la corriente inducida por 1 Mm) es graficada contra la concentración de ATP (0.01 a 30 Mm). Los símbolos y las líneas verticales asociadas representan las medias y la media del error estándar (M.E.S) respectivamente de 3 a 10 células. El ATP se aplicó de 5 a 10 s cada 5 min. Una curva sigmoide es el mejor ajuste obtenido con una función logística de tres parámetros (Kenakin, 1993). B. Las relaciones corriente-voltaje de los datos de la media de cuatro neuronas a diferentes concentraciones de ATP (0.1, 1 y 30 Mm). Se aplico ATP por ~2 s cada 5 min. Los valores de la  $I_{ATP}$  fueron normalizados con respecto a la amplitud de corriente observada a -60 Mv para cada neurona y para cada concentración. La  $I_{ATP}$  se registro usando una rampa de voltaje, como se observa en el cuadro delimitado con línea segmentada dentro de la Figura 6 B, y fue analizada como se ha descrito en la sección de los Métodos.

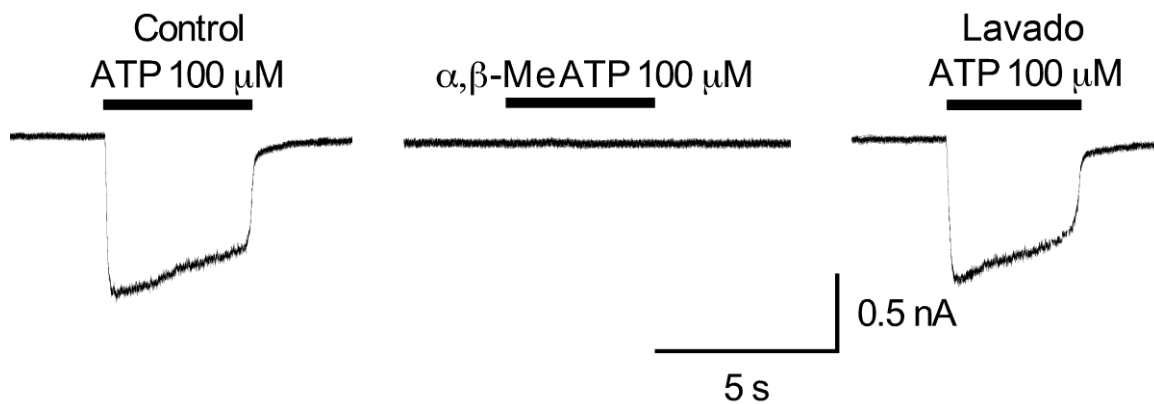


## 8.2. Efectos del $\alpha,\beta$ -metileno ATP y el BzATP sobre los canales P2X nativos.

Se sabe que el análogo sintético del ATP, el  $\alpha,\beta$ -metileno ATP, comúnmente usado para la caracterización farmacológica de receptores P2X, actúa como un agonista parcial sobre el receptor P2X4 recombinante del ratón, y una concentración de 30  $\mu\text{M}$  puede inducir el 25% de la corriente máxima observada cuando se aplica ATP (Jones et al., 2000).

Por ésta razón medimos el posible efecto de 30 y 100  $\mu\text{M}$  del  $\alpha,\beta$ -metileno ATP en 5 y 3 neuronas mientéricas respectivamente, neuronas que respondieron con corrientes robustas a la aplicación de la misma concentración de ATP (n=8). Sin embargo, no observamos corriente alguna con 30 ni 100  $\mu\text{M}$  del  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (Figura 7).

Estudios previos han reportado que el 3'-O-(4-benzoil) benzoil-ATP (BzATP), otro análogo sintético del ATP, induce un 13% y 65% de la  $I_{\text{ATP}}$  máxima a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  de BzATP, sobre el receptor P2X4 de la rata (Bowler et al., 2003) y el P2X2 (Evans et al., 1995), mientras que sobre el receptor P2X7 es un agonista más potente y efectivo que el ATP (Surprenant et al., 1996). En este trabajo una concentración de 100  $\mu\text{M}$  de BzATP indujo el  $15 \pm 2\%$  (n=5) de la corriente máxima obtenida con ATP (1 Mm; datos no mostrados).



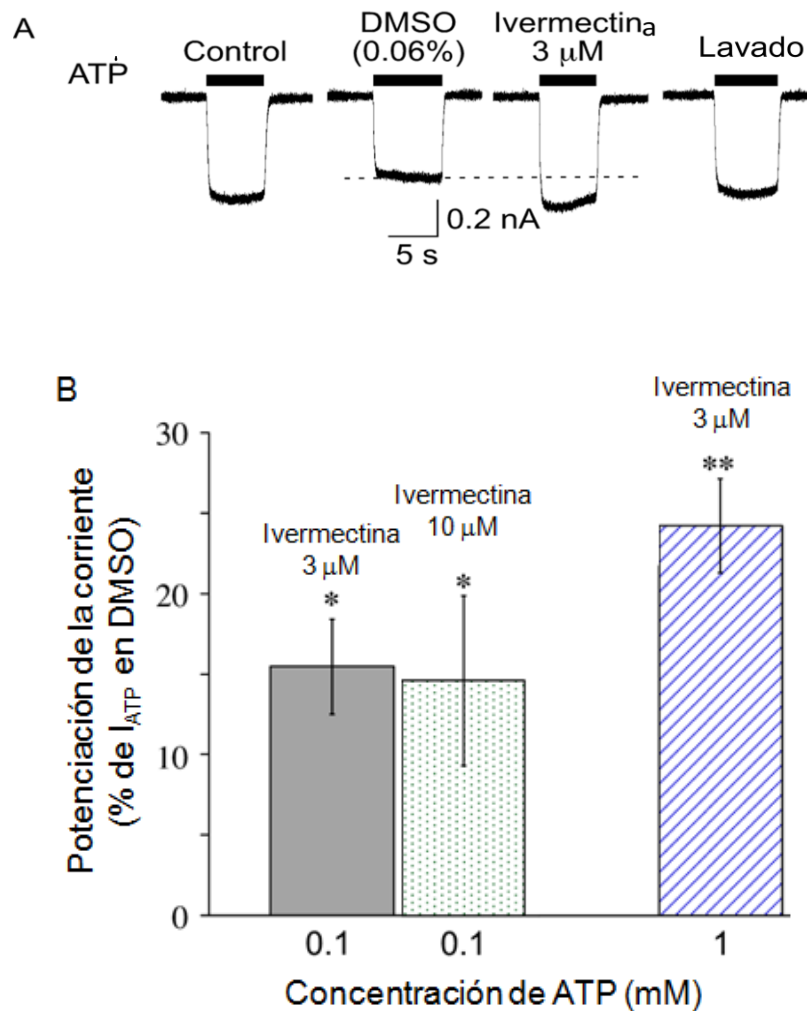
**Figura 7. El  $\alpha,\beta$ -metileno ATP no activa los canales P2X nativos en las neuronas mientéricas.** Todos los registros son de la misma célula. Las barras horizontales sobre los trazos de la corriente representan el tiempo de aplicación del agonista, aplicación que fue realizada cada 5 min. Las neuronas fueron fijadas a un voltaje de  $-60$  Mv. Experimento representativo de 8 realizados.

### 8.3. Efectos moduladores de la ivermectina y el $Zn^{2+}$ sobre la $I_{ATP}$ .

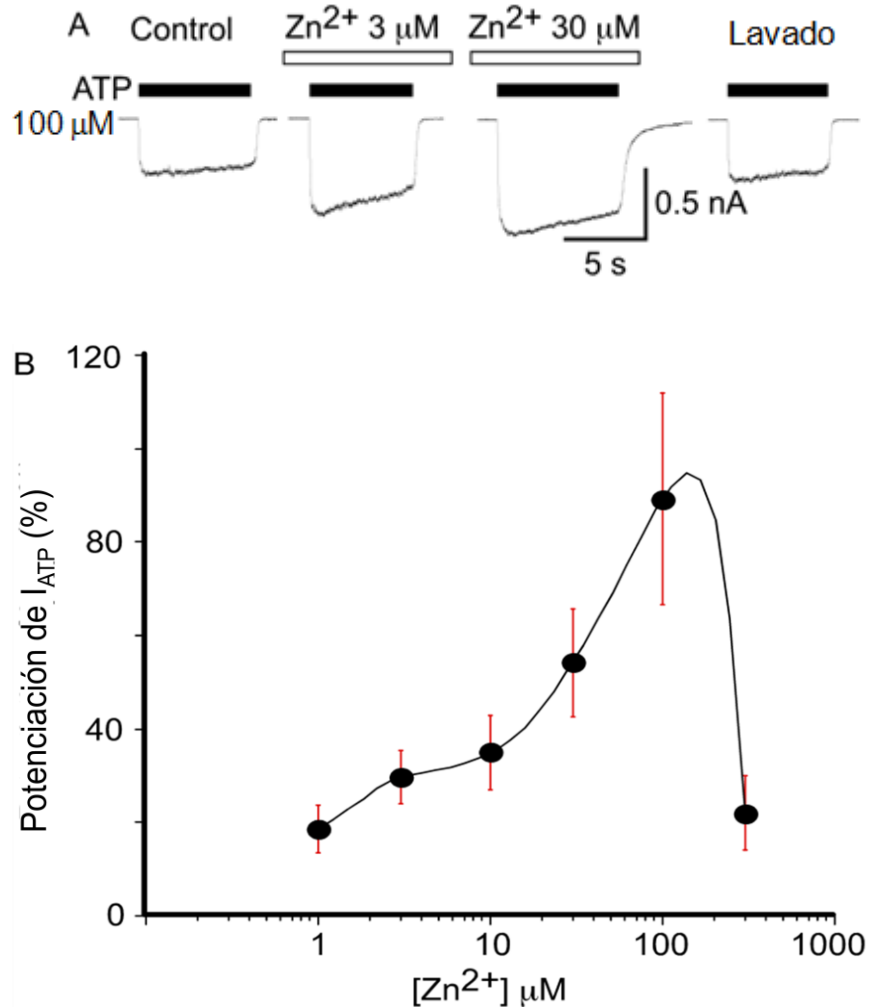
La ivermectina es un fármaco empleado con fines antiparasitarios en medicina veterinaria y humana principalmente como fármaco antifilárico. Está compuesta por la mezcla de dos lactonas macrocíclicas: ivermectina B1a y B1b, producidas por la actinobacteria *Streptomyces avermitilis* (Burkhart, 2000). Debido a que el receptor P2X4 es modulado positivamente por la ivermectina, potenciando los efectos del agonista sobre el receptor se utiliza frecuentemente en la investigación para identificar la presencia del receptor P2X4 o atribuirle su participación en alguna célula o tejido (Lalo et al., 2007; Qureshi et al., 2007; Sim et al., 2007; Toulmé et al., 2006).

En el presente trabajo utilizamos la ivermectina para investigar la posibilidad de la presencia del receptor P2X4 en la membrana de las neuronas mientéricas. Observamos potenciación de las corrientes inducidas por ATP 0.1 (n=6) o 1 Mm (n=5) con ivermectina 3 Mm. Los efectos fueron notorios cuando se compararon con los que produce el dimetil sulfoxido (DMSO), el solvente de la ivermectina; el DMSO por si solo (0.06%) tiene un efecto inhibitorio de aproximadamente 10% sobre la  $I_{ATP}$  de las corrientes control (Fig. 8A). Una concentración más alta de ivermectina (10  $\mu$ M) indujo una respuesta similar a la observada con 3  $\mu$ M, indicando el alcance del efecto máximo (Fig. 8B), hecho que ha sido reportado para el receptor P2X4 recombinante (Khakh et al., 1999). Los efectos de potenciación de la ivermectina se observaron 3 min después de aplicarla, y fueron revertidos 5 min después de haberla removido de la cámara de registro.

Además el catión divalente, zinc, un metal traza, también potenció de manera significativa las corrientes inducidas por ATP 100  $\mu\text{M}$  a concentraciones entre 1 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  (Figura 9). Sin embargo, la curva concentración-respuesta reveló un efecto complejo de al menos dos fases, la primera fase se observó entre 1 y 1000  $\mu\text{M}$ , y la segunda se caracterizó por una disminución drástica del efecto potenciador. Los efectos del zinc fueron observados pocos segundos (5-15 s) después de su aplicación, y fueron completamente revertidos después de 5 min de haberlo retirado. Previamente se han reportado efectos bifásicos del zinc sobre el receptor P2X4 recombinante (Coddou et al., 2011).



**Figura 8. La ivermectina potencio las corrientes inducidas por ATP ( $I_{ATP}$ ) en las neuronas mientéricas del ratón.** A, Corrientes registradas durante condiciones control, en presencia de ivermectina (disuelta en DMSO), y durante la presencia de DMSO únicamente. Las barras horizontales sobre los trazos de corriente representan el tiempo de aplicación del ATP (100  $\mu$ M), que se aplicó cada 5 min. El potencial de membrana de las neuronas fue fijado a un voltaje de  $-60$  mV. B, Las barras en la gráfica representan el promedio del cambio en la  $I_{ATP}$  inducido por ivermectina, y las líneas en su parte superior representan la media del error estándar M.E.S. Los cambios inducidos por ivermectina fueron estadísticamente diferentes de los valores control tomados en la presencia de 0.06% del solvente (DMSO).



**Figura 9. El zinc potencia las corrientes inducidas por ATP (IATP).** A, Corrientes registradas de la misma neurona durante condiciones control y en la presencia de dos concentraciones de Zn<sup>2+</sup>. Las barras horizontales sobre los trazos de corriente representan la aplicación de ATP 100 Mm, el cual se aplicó cada 5 min. El potencial de membrana se fijó a -60 mV. B, Gráfica que muestra la potenciación de la IATP inducida por diferentes concentraciones de Zn<sup>2+</sup>. Nótese la compleja curva concentración-respuesta obtenida, la cual presenta al menos dos fases claramente distinguibles. Los círculos y líneas asociadas representan el promedio de (n= 4-9 neuronas) y la M.E.S. respectivamente. La potenciación representa el aumento de la IATP como porcentaje del valor control.

#### 8.4. Efectos del PPADS, la suramina y el KN-62 sobre los canales P2X nativos.

Los fármacos sintéticos suramina y ácido pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfónico (PPADS) son conocidos como antagonistas purinérgicos ya que de manera general inhiben a los receptores P2 (Abbracchio et al., 2006; Khakh et al., 2001; Lambrecht et al., 1992).

Sin embargo, el receptor P2X4 recombinante ha mostrado ser relativamente resistente a dichos antagonistas: PPADS ( $IC_{50}=10.5 \mu\text{M}$ ), suramina ( $IC_{50}>300 \mu\text{M}$ ), e insensible al compuesto derivado de isoquinolina, KN-62 ( $3 \mu\text{M}$ ) (Jones et al., 2000). En este trabajo evaluamos la potencia de éstos antagonistas sobre las neuronas mientéricas del ratón para investigar la presencia de receptores P2X4 homoméricos (Figura 10).

PPADS a una concentración de 0.03-30 Mm inhibió las corrientes inducidas por ATP 1 Mm de manera dependiente de la concentración con una  $IC_{50}=0.54$ , y un coeficiente de Hill de 1.2 (Figura 9B). Este efecto fue dependiente del tiempo y requirió de 4 min para alcanzar su efecto máximo. Además los efectos del PPADS persistieron por largos periodos de tiempo (más de 20 min) y fue necesario cambiar el cubreobjetos (con las neuronas adheridas) para cada aplicación de PPADS.

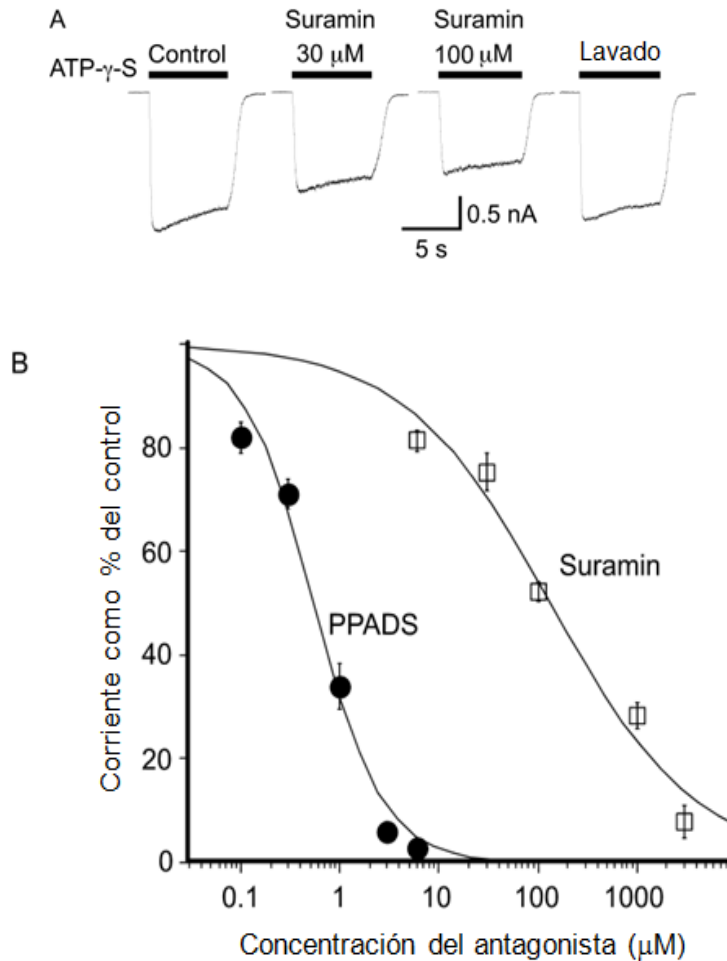
Ya se ha reportado que la suramina inhibe solamente el 76% de la  $I_{\text{ATP}}$  con una  $IC_{50}$  de  $50 \mu\text{M}$  en las neuronas mientéricas (Guerrero-Alba et al., 2010) siendo al menos seis veces más potente para inhibir la  $I_{\text{ATP}}$  que el efecto que tiene sobre los receptores P2X4 recombinantes del ratón (Jones et al., 2000). Es posible que la inhibición de la actividad ATPasa del suramin, efecto conocido de éste antagonista (Crack et al., 1994; Hourani and Chown, 1989), esté involucrada en la falta de la inhibición completa de la  $I_{\text{ATP}}$  en

las neuronas mientéricas, lo que disminuiría el valor de la  $IC_{50}$  mediante la disminución del efecto máximo de la suramina.

Para evitar que el efecto de las ectonucleotidasas esté involucrado en las acciones de la suramina, probamos sus efectos sobre las corrientes inducidas por el análogo sintético del ATP, sal de adenosina 5'-(3-tiotrifosfato) tetralitio (ATP- $\gamma$ -S), que es altamente resistente a las ectonucleotidasas (Cunha et al., 1998) y se comporta como un agonista completo de los receptores P2X del ratón (Guerrero-Alba et al., 2010). Así, la suramina inhibió las corrientes inducidas por ATP- $\gamma$ -S (1 Mm) de forma dependiente de la concentración (Fig. 9A y 9B) con una  $IC_{50}$  de 134  $\mu$ M y un coeficiente de Hill de 0.6. La inhibición observada con suramina 3 Mm (concentración máxima) fue del  $92\pm 3\%$ . Dichos efectos fueron totalmente revertidos después de lavar la suramina. Por lo tanto, la suramina es un antagonista más potente sobre los receptores P2X mientéricos del ratón que lo que es sobre los receptores P2X4 recombinantes (Jones et al., 2000), y descartamos que esta diferencia en la potencia del antagonismo se deba a la inhibición de las ectonucleotidasas.

Se sabe que el KN-62, potente inhibidor del receptor P2X7 del humano y del ratón no tiene efecto sobre los receptores P2X4 recombinantes del ratón (Jones et al., 2000). En este trabajo encontramos que el KN-62 no modificó la  $I_{ATP}$  inducida por 1Mm de ATP. En éstos experimentos la media de los valores de las  $I_{ATP}$  fue de  $-2775\pm 823$  y de  $-2729\pm 780$  Pa ( $n=5$ ) antes y después de la aplicación de una concentración de 3  $\mu$ M de KN-62 respectivamente (Figura no mostrada).





**Figura 10. El PPADS es más potente que la suramina sobre los receptores P2X nativos de las neuronas mientéricas.** A, La suramina inhibió las corrientes inducidas por ATP- $\gamma$ -S. Las barras sobre los trazos de corriente representan el tiempo de aplicación del ATP- $\gamma$ -S (1 Mm), aplicación realizada cada 5 min. El potencial de membrana de las neuronas se mantuvo a -60 Mv. B, Curvas concentración-respuesta del efecto inhibitorio del PPADS y la suramina sobre las corrientes inducidas por 1 Mm de ATP ó ATP- $\gamma$ -S, respectivamente. En la gráfica cada símbolo representa el valor promedio de tres a cinco experimentos, las líneas sobre dichos símbolos son la media del error estándar. Usando éstos valores promedio las IC<sub>50</sub>s estimadas fueron 0.54  $\mu$ M (PPADS) y 134  $\mu$ M (suramina), esto utilizando una función logística y asumiendo una inhibición máxima del 100%.

#### *8.5. El mRNA del receptor P2X4 está presente en el intestino delgado del ratón.*

Para investigar si el mRNA del receptor P2X4 se expresa en el SNE de ratón procedimos primeramente a evaluar su presencia en el intestino delgado. Llevamos a cabo reacciones de *RT-PCR* de tejido de yeyuno y cerebro (control positivo), con oligonucleótidos específicos para amplificar el marco de lectura completo de la secuencia del P2X4 del ratón. Con dichos oligonucleótidos nombrados P2X4-1S y P2X4-1AS (ver Cuadro II de los Métodos), obtuvimos un producto de PCR de aproximadamente 1.5 kilobases (kb) (Fig. 10A). La identidad de este cDNA de P2X4 amplificado fue confirmada por secuenciación resultando 99% idéntico a la secuencia canónica previamente reportada del P2X4 del ratón NM\_010026. La secuenciación también reveló que el motivo de aminoácidos de la cavidad de unión a la ivermectina esta conservado como el descrita para la rata, el cual comprende los aminoácidos: Q36, L40, V43, V47, V49, W50, V60, V61, N338, G342, L346, A349, I356, and V357 (Jelínková et al., 2008; Jelínková et al., 2006).

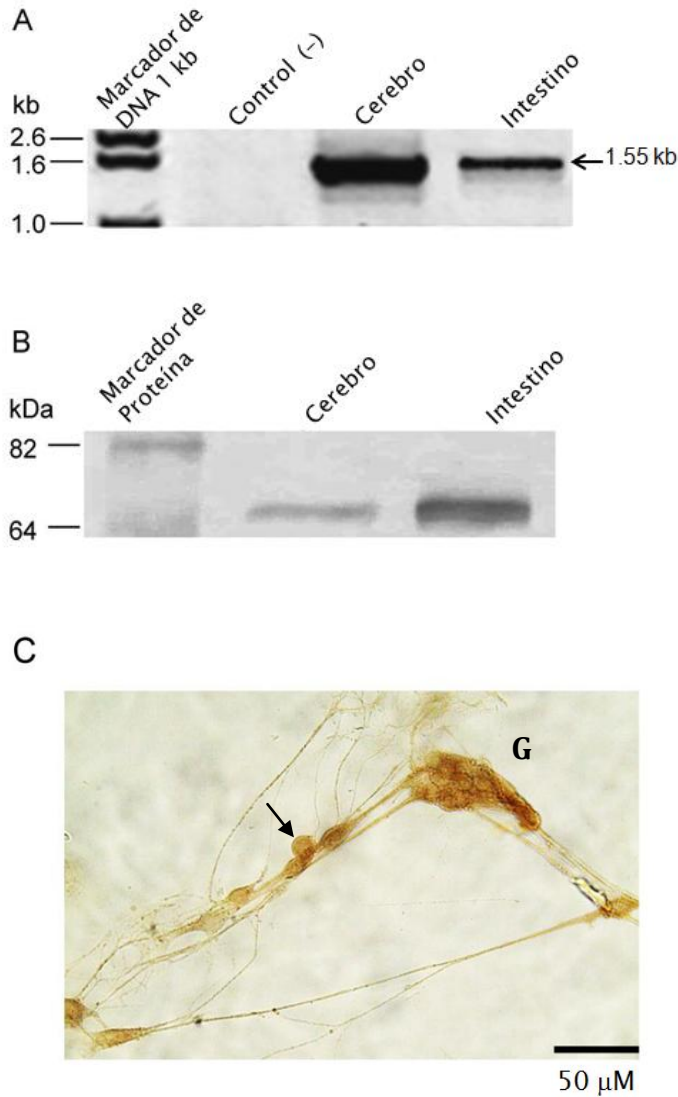
#### *8.6. La proteína del receptor P2X4 está presente en el intestino delgado del ratón.*

Las preparaciones de proteína obtenidas del cerebro (control positivo) y el yeyuno (ver métodos), fueron procesadas y evaluadas para la inmunoreactividad contra P2X4 con un anticuerpo dirigido contra la región N-terminal del receptor P2X4 del humano, mediante la técnica de *Western blot*. Observamos bandas de inmunoreactividad positiva aproximadamente a 70 kDa (n=3; Fig. 10B) como se esperaba para el receptor P2X4 (Oglesby et al., 1999). También llevamos a cabo dos controles diferentes, in un

set de western blots (n=2) el anticuerpo primario contra el receptor P2X4 fue omitido, y en otro set de experimentos (n=2) probamos la especificidad del anticuerpo y evaluamos su inmunoreactividad contra el receptor P2X2 (uno de los más abundantes en este tejido), para ellos utilizamos preparaciones de proteína de ovocitos de que fueron inyectados y expresaban receptores P2X2 del cobayo. No se encontró inmunoreactividad en éstos experimentos control (datos no mostrados).

### *8.7 La mayoría de las neuronas mientéricas en cultivo presentan inmunoreactividad para el receptor P2X4.*

En aparente contradicción a los efectos de la ivermectina sobre la  $I_{ATP}$  (descrita en este trabajo), se encuentra la ausencia de inmunoreactividad del receptor P2X4 en el plexo mientérico del ratón descrita por Ruan & Burnstock en el 2005. El anticuerpo que utilizaron en dicho trabajo está dirigido contra la región c-terminal del P2X4 de la rata (específicamente la región de aminoácidos 370-388), la cual tiene una identidad del 89% con respecto a la misma región del ratón. En este trabajo utilizamos dos anticuerpos primarios diferentes dirigidos contra la región N-terminal y contra la subunidad de P2X4, para investigar la posible inmunoreactividad de P24 en cultivo de neuronas mientéricas del ratón por medio de la técnica de inmunocitoquímica. Encontramos inmunoreactividad positiva en la mayoría de las neuronas en 4 experimentos diferentes llevados a cabo con cada anticuerpo como se puede observar en la Figura 10C. Para los experimentos control los anticuerpos primarios fueron omitidos y no obtuvimos inmunoreactividad en éstos (figura no mostrada).



**Figura 11. El Mrna y la 44anals44a del receptor P2X4 se expresan en el intestino delgado del ratón.** A, gel de electroforesis de agarosa para el Mrna de P2X4 amplificado por RT-PCR a partir de cerebro (control positivo) e intestino (yeyuno). Los controles negativos se llevaron a cabo sin Cdna templado. B, Western blot del cerebro (control positivo) y yeyuno. La banda se encuentra en aproximadamente 70 kDa como el tamaño esperado, no se obtuvieron falsos negativos. C, La mayoría de las neuronas mientéricas en cultivo muestran inmunoreactividad como se observa por la técnica de inmunocitoquímica revelada con diaminobencidina. La inmunoreactividad se observó tanto con el anticuerpo dirigido contra el N-terminal como con el dirigido contra toda la subunidad y ésta misma fue evitada cuando se omitieron dichos anticuerpos (datos no mostrados). Flecha: neuronas, G: grupo de neuronas.

*8.8. El mRNA del receptor P2X4 se encuentra en la mayoría de las neuronas mientéricas.*

En seguida investigamos la presencia del receptor P2X4 en las neuronas mientéricas mediante PCR en célula única. Para ello llevamos a cabo PCRs anidados en 50 neuronas individuales, utilizando los oligonucleótidos descritos en la sección de Materiales y Métodos (Cuadro II). Después de correr los productos de PCR en geles de electroforesis de agarosa, obtuvimos la banda del tamaño esperado (630 nt) en 45 de 50 células analizadas. En la figura 11 se muestra un ejemplo representativo (17 neuronas) del total de neuronas evaluadas. La proporción de neuronas que respondieron a ATP (95%) es casi el mismo que expresa Mrna del receptor P2X4 (90%).

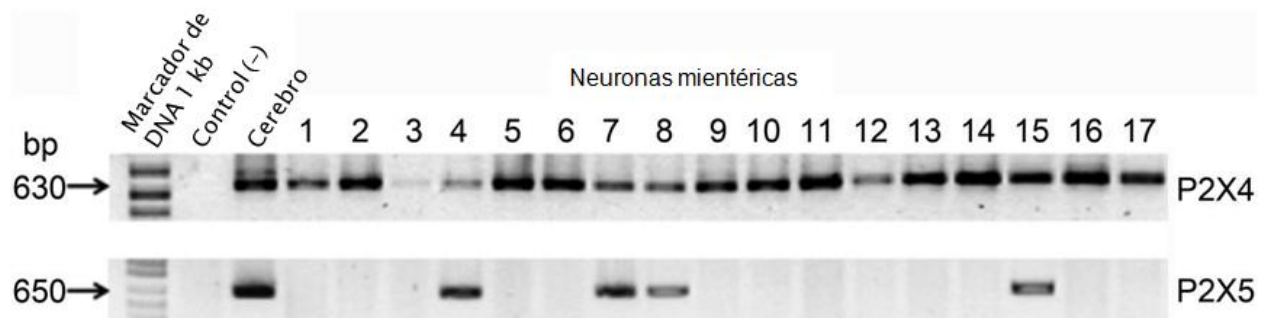
Los productos de PCR se secuenciaron y se confirmó por análisis bioinformático que estos productos tienen 99% de identidad nucleotídica con la secuencia del receptor P2X4 del ratón disponible en la base de datos del NCBI (NM\_011026).

*8.9. Las neuronas mientéricas expresan mRNA del receptor P2X5 en aproximadamente un cuarto de su población.*

También se ha reportado extensa inmunoreactividad para el receptor P2X5 en el plexo mientérico del ratón, sin embargo este está localizado principalmente en las fibras nerviosas (Ruan and Burnstock, 2005), lo que dificulta la determinación de la proporción de neuronas que expresan dicho receptor. Por esto investigamos cuantas neuronas coexpresan el receptor P2X4 y P2X5, para ellos llevamos a cabo reacciones

de RT-PCR anidadas de célula única en 22 neuronas mientéricas individuales utilizando los oligonucleótidos descritos en Materiales y Métodos (Cuadro II). Después de correr los productos de PCR en geles de electroforesis de agarosa obtuvimos una banda del tamaño esperado (650 nt) en 5 de 22 neuronas (23%), éstas 5 neuronas también amplificaron el receptor P2X4. En la figura 11 se muestran los geles de un mismo lote de neuronas (17) que se evaluaron para la presencia de mRNA del P2X4 y del P2X5 dividiendo el cDNA obtenido de una sola neuronas en dos volúmenes iguales para hacer las PCRs independientes.

Los productos de PCR fueron secuenciados y por análisis bioinformático se confirmó que tenían una identidad nucleotídica de 99% con la secuencia canónica del receptor P2X5 del ratón (NM\_033321).



**Figura 12. El Mrna del receptor se expresa en mayor número que el del receptor P2X5 en las neuronas mientéricas.** Geles de electroforesis de agarosa de las reacciones de amplificación por RT-PCR en célula única de 17 neuronas mientéricas diferentes (indicadas por los números sobre el gel superior), que fueron evaluadas para la presencia de Mrna de tanto de P2X4 como de P2X5. Todas las neuronas amplificaron al P2X4 mientras que sólo 4 de ellas amplificaron el P2X5. Los controles negativos se llevaron a cabo sin Cdna templado y se utilizó Cdna de cerebro como control positivo. El producto de PCR de 630 pb corresponde al Cdna de P2X4 (gel superior) y el de 650 pb corresponde al Cdna de p2X5 (gel inferior).

## IV. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que demuestra que el receptor P2X4 está presente y tiene una amplia distribución en las neuronas mientéricas del ratón. Además nuestros hallazgos muestran que contribuye a las corrientes activadas por ATP en estas neuronas. Ésta contribución podría darse a través de la formación de receptores heteroméricos de subunidades P2X4 con otras presentes en las neuronas, o a través de la interacción entre receptores homoméricos que mantienen interacciones complejas aún no descritas entre ellos o con otras proteínas incluyendo otros canales iónicos.

Al menos cinco subunidades P2X diferentes se expresan en las neuronas mientéricas del ratón. La presencia de la subunidad P2X2 está bien documentada (Ren et al., 2003; Ruan et al., 2004). El receptor P2X3 se observa en menos del 10% de éstas neuronas (Bian et al., 2003). Los mRNAs de los receptores P2X4 y P2X5 están presentes en 90% y 23% respectivamente (presente estudio), lo que concuerda con la presencia de éstos dos transcritos en cultivos enriquecidos de neuronas entéricas de la rata (Ohta et al., 2005). Ambos transcritos se traducen a proteína en las neuronas mientéricas como lo indica el efecto modulador positivo de la ivermectina sobre las corrientes inducidas por ATP y la inmunoreactividad de P2X4 encontrada (presente estudio) y la proteína del P2X5 por la inmunohistoquímica reportada por Ruan y Burnstock en el 2005. El receptor P2X7 también se expresa ampliamente en las neuronas mientéricas de la rata (Vanderwinden et al., 2003), el cobayo (Hu et al., 2001; Valdez-Morales et al., 2011), y el ratón (Gulbransen et al., 2012). Basados en nuestros datos se esperaría que el receptor P2X4 se coexpresara con el P2X2 y el P2X7 en al



menos el 90% de las neuronas que expresan cualquiera de los últimos dos. Además un cuarto de las neuronas mientéricas que tienen subunidades P2X4 también coexpresan subunidades P2X5 (presente estudio).

La evidencia mostrada aquí es aparentemente contradictoria con la ausencia de inmunoreactividad para el P2X4 previamente reportada por otro trabajo en el sistema nervioso entérico del ratón (Ruan and Burnstock, 2005), pero concuerda con la extensa inmunoreactividad reportada para este receptor en el tracto gastrointestinal de la rata (Bo et al., 2003). Es posible que el anticuerpo utilizado por Ruan y Burnstock (2005) no reconozca al receptor P2X4 del ratón. Dicho anticuerpo está dirigido contra el segmento de aminoácidos 370-388 localizado en la región C-terminal del receptor P2X4 de la rata, el cual tiene un 89% de compatibilidad con la región correspondiente al ratón, y el anticuerpo utilizado por Bo *et al.* (2003) esta dirigido contra la región extracelular del receptor. En adición a esta controversia un estudio más reciente (Yu et al., 2010), utilizando el anticuerpo contra el C-terminal reporta la falta de inmunoreactividad de P2X4 en las neuronas mientéricas de la rata pero inmunoreactividad para este receptor en en los macrófagos del intestino. Una posible explicación a esta discrepancia sería que en las neuronas mientéricas el segmento inmunoreactivo esté siendo “escondido” por interacciones con otras macromoléculas. La región C-terminal es esencial para interaccionar con otras moléculas y con otros receptores P2X y en este caso el C-terminal del receptor P2X4 está implicado en la unión con otras moléculas (*e.g.* cinasas, fosfoinositidos, proteínas de andamiaje) (Bernier et al., 2008; Fountain and North, 2006; Royle et al., 2002; Toulmé et al., 2006), y en la interacción con otros receptores (Antonio et al., 2011; Jo et al., 2011; Xia et al.,

2008), lo que podría impedir la unión del anticuerpo, dificultar la detección del receptor o dar falsos negativos.

En acuerdo con estas interpretaciones en este trabajo fuimos capaces de identificar la proteína del tamaño esperado en yeyuno de ratón por la técnica de western blot, e inmunoreactividad positiva para el P2X4 en las neuronas mientéricas por la técnica de inmunocitoquímica, utilizando un anticuerpo policlonal dirigido contra los primeros 40 aminoácidos de la región N-terminal del receptor P2X4 de humano (región que tiene una compatibilidad del 90% con el receptor del ratón) y uno contra la subunidad P2X4, anticuerpos contra regiones diferentes al C-terminal.

La proposición de que la subunidad P2X4 participa en la formación de canales funcionales en las neuronas mientéricas es soportada por el hecho de que la ivermectina potencio la  $I_{ATP}$ . Este fármaco ha sido probado ser específico sobre los receptores P2X4 dentro de la familia de receptores P2X (Coddou et al., 2011; Priel and Silberberg, 2004; Sim et al., 2006), hecho que sigue manteniéndose para el P2X4 del ratón, no para el de humano (Norenberg et al., 2012). Este efecto de la ivermectina es observado a concentraciones iguales o menores de 10  $\mu$ M y parece estar mediado por dos sitios diferentes que median tanto un aumento en el tiempo en que el canal está abierto o disminuyen el tiempo de desensibilización del canal (Priel and Silberberg, 2004). El ultimo efecto se esperaría a concentraciones que inducen desensibilizaciones largas y probablemente es responsable de la potenciación mayor inducida por ivermectina 3  $\mu$ M cuando se usó ATP 1 Mm en lugar de 0.1 Mm. En concordancia con el efecto de la ivermectina la secuenciación del cDNA del receptor P2X4 asilado del intestino reveló la presencia del motivo de aminoácidos que conforman la cavidad de

unión a la ivermectina (presente estudio), que ha sido reportada para el receptor P2X4 de la rata (Jelínková et al., 2008; Jelínková et al., 2006). El zinc tiene efectos moduladores bifásicos sobre los receptores P2X4 (ver (Coddou et al., 2011)). Sin embargo efectos similares del zinc se han descrito también sobre los receptores P2X2 (ver (Coddou et al., 2011)), subunidad que está ampliamente distribuida en las neuronas mientéricas del ratón (Ren et al., 2003; Ruan et al., 2004). Por lo tanto es posible que los efectos del zinc estén mediados por las subunidades P2X2 y P2X4. El KN-62, un antagonista de los receptores P2X7 no tuvo efecto sobre la  $I_{ATP}$  en las neuronas mientéricas del ratón, efecto que ha sido reportado para el receptor P2X4 recombinante del ratón (Jones et al., 2000), mientras que el BzATP, un agonista que es más efectivo sobre los receptores P2X7 (Surprenant et al., 1996) y P2X2 (Evans et al., 1995), indujo solamente una respuesta marginal en las neuronas mientéricas (Cuadro III). Esta respuesta al BzATP es similar a la reportada para los receptores P2X4 (Bowler et al., 2003).

**Cuadro III. Comparación de las propiedades de los receptores P2X nativos del plexo mientérico con aquéllas de los receptores P2X2, P2X4 y P2X7 homoméricos**

Agonist/Antagonists	Murine Myenteric P2X	Murine homomeric channels		
		P2X2	P2X4	P2X7
ATP (EC <sub>50</sub> μM)	102	10-13	2.3	417 to 936
BzATP	100 μM induced 15% of maximal I <sub>ATP</sub>	100 μM induced 65% of maximal I <sub>ATP</sub>	100 μM induced 13% of maximal I <sub>ATP</sub>	more effective and more potent than ATP*
ATP-γ-S	98	10*	-	-
α,β methylene ATP (EC <sub>50</sub> μM)	Inactive at 100 μM	>100*	30 μM induced 25% of maximal I <sub>ATP</sub>	>300*
Ivermectin	potentiates	inactive*	potentiates*	inactive
PPADS (IC <sub>50</sub> μM)	0.6	1 to 3*	10	9-40
Zinc (IC <sub>50</sub> μM)	(+)	(+)*	(+)*	(-)-80
Suramin (IC <sub>50</sub> μM)	50 to 134	10*	>300	>100*
KN-62 (IC <sub>50</sub> μM)	Inactive	-	inactive	0.18
Rectification	Strong	Strong	Little	Little
References	Present Study, (Guerrero-Alba et al., 2010)	(Evans et al., 1995; Koshimizu et al., 1998; Fujiwara Kubo, 2004)	(Jones et al., 2000)	(Surprenant et al., 1996; Chessell et al., 1998; Young et al., 2007; Donnelly-Roberts et al., 2009); Norenberg, 2012 #1723}

\*Datos obtenidos de receptores P2X4 de rata o humano (ver (Khakh et al., 2001; North, 2002; Coddou et al., 2011)).

(-) modulador negativo

(+/-) modulador bifásico

- Aun no determinado

Varias propiedades farmacológicas de los canales P2X nativos de las neuronas mientéricas del ratón indican que las subunidades P2X4 no se encuentran formando receptores homoméricos. De tal manera, los receptores P2X nativos (presente estudio; Guerrero-Alba, 2010 #14) tienen propiedades farmacológicas diferentes a las de los receptores P2X4 recombinantes (Jones et al., 2000; Townsend-Nicholson et al., 1999). Comparados los canales P2X4 homoméricos con los P2X nativos, éstos últimos son 40 veces menos sensibles al ATP, y 2/17 veces más sensibles a la suramina y al PPADS respectivamente (Cuadro III). Además, el  $\alpha,\beta$ -metileno ATP se comporta como un agonista parcial sobre los receptores homoméricos y una concentración de 30  $\mu\text{M}$  induce el 25% de la respuesta máxima del ATP (Jones et al., 2000), pero en este trabajo el  $\alpha,\beta$ -metileno ATP no activo los receptores P2X. Además, los receptores P2X4 homoméricos presentan poca rectificación y nosotros observamos una fuerte rectificación de la  $I_{\text{ATP}}$  en las neuronas (Jones et al., 2000). Por lo tanto es posible que las subunidades P2X4 de las neuronas mientéricas estén formando canales heteroméricos como se ha propuesto en muchos órganos de la rata (Bo et al., 2003), sin embargo revise la discusión a continuación.

Se ha reportado que la gran mayoría de las neuronas mientéricas expresan los receptores P2X2 y P2X7 (Galligan and Bertrand, 1994; Gulbransen et al., 2012; Ren et al., 2003; Ruan and Burnstock, 2005; Valdez-Morales et al., 2011; Vanderwinden et al., 2003). En este trabajo varias observaciones experimentales resumidas en el Cuadro III nos indican que tampoco estas subunidades forman canales homoméricos en estas neuronas. De esta manera, comparados con la  $I_{\text{ATP}}$  de las neuronas mientéricas, los canales P2X2 homoméricos son de 8-10 veces más sensibles al ATP y al ATP- $\gamma$ -S y de

5-13 veces más sensibles a la suramina. También el BzATP es más efectivo sobre los receptores P2X2 recombinantes. De forma similar, la presencia de receptores P2X7 homoméricos parece poco probable porque en contraste con la  $I_{ATP}$  de las neuronas mientéricas, los canales P2X7 recombinantes son activados a concentraciones mayores de 200  $\mu$ M, muestran menor rectificación (Surprenant et al., 1996; Valdez-Morales et al., 2011; Visentin et al., 1999), son menos sensibles al PPADS y la suramina, y el BzATP es un agonista más efectivo que el ATP sobre estos canales. También la forma monofásica de las curvas concentración-respuesta para el ATP, suramina, y PPADS sugieren que es poco probable que los canales P2X2, P2X4 y P2X7 sean homoméricos, por que éstos canales tienen diferentes sensibilidades a dichas sustancias. No encontramos evidencia de una segunda o tercera fase en la curva concentración-respuesta o cambios en la rectificación entrante cuando se usaron concentraciones altas de ATP. Éstas dos características han sido descritas para la  $I_{ATP}$  de las neuronas mientéricas del cobayo (Valdez-Morales et al., 2011) y células de microglia (Visentin et al., 1999) y se ha interpretado que se deben a la presencia de receptores P2X7 homoméricos. Es por esto que una explicación simple a nuestros datos sería que las subunidades más comunes presentes en éstas neuronas (P2X2/P2X7/P2X4), forman canales heteroméricos entre sí. En contra de ésta hipótesis, el P2X4 de la rata no parece formar receptores heteroméricos con la subunidad P2X2 o P2X7 (Antonio et al., 2011). En dicho trabajo, los autores coexpresan pares de subunidades (P2X4 con P2X2 o P2X4 con P2X7) pero no sabemos si la coexpresión de más de dos subunidades facilite el ensamble de receptores heteroméricos en las membranas nativas. Además, la complejidad y

probabilidad de la presencia de receptores heteroméricos en una célula dada podría ser elevada por la presencia de variantes de splicing de los receptores P2X. En las neuronas mientéricas del cobayo se han descrito tres variantes de splicing del receptor P2X2, dos de ellas pueden formar canales homoméricos con propiedades funcionales distintas y pueden estar expresadas en la misma neurona (Linan-Rico et al., 2012). Estas explicaciones requieren ser experimentalmente analizadas, lo que está claramente fuera del alcance de este trabajo.

Los datos experimentales recientemente publicados por Antonio et al., 2011, sugieren que canales P2X4 homoméricos interactúan con los receptores P2X2 y P2X7 como homómeros diferentes. Ya ha sido demostrada la interacción entre receptores de la familia “*cys-loop*” (Miranda-Morales et al., 2007) y entre receptores P2X y otros “*cys-loop*” en estas neuronas (Barajas-Lopez et al., 1998; Barajas-Lopez et al., 2002; Decker and Galligan, 2009; Karanjia et al., 2006; Ochoa-Cortes et al., 2010). Por lo tanto es posible que interacciones similares o más complejas sean las responsables de determinar las propiedades farmacológicas de los receptores P2X de las neuronas mientéricas.

En conclusión, nuestros datos indican que el receptor P2X4 está presente en las neuronas mientéricas del ratón. Las propiedades de los canales P2X nativos son diferentes de aquellas de los canales homoméricos P2X2, P2X4, y P2X7, lo que muy probablemente resulta de la heteromerización entre subunidades. La subunidad P2X4 tiene una amplia distribución en el plexo mientérico y se esperaría que juegue un papel importante en la señalización celular.

## V. APÉNDICE A

### **Variantes de *splicing* alternativo del receptor P2X4 en el intestino delgado del ratón.**

#### **Introducción**

El *splicing* alternativo es un mecanismo bien caracterizado por medio de cual se generan múltiples transcritos a partir de un solo mRNA precursor (Kim et al., 2008). La maquinaria de *splicing* reconoce exones e intrones mediante el uso de múltiples señales que resultan en una red de interacciones a través de los mismos. Las cuatro señales principales de *splicing* que delimitan uno y otro lado de los límites exón-intrón son: (1) el 5' y (2) el 3', sitios de *splicing* (5' splice site y 3' splice site), localizados río arriba y río abajo de la intersección exón-intrón respectivamente, (3) el sitio de bifurcación “*branch site*” (BS), y (4) la región de polipirimidina (PPT), la cual está localizada río arriba del 3' splice site (Black, 2003; Graveley, 2001) (ver Figura 12A). En los animales éstas señales de *splicing* no son suficientes para el completo funcionamiento de la maquinaria y se estima que éstas sólo proveen la mitad de la información requerida (Lim and Burge, 2001).

Los eventos de *splicing* alternativo también se clasifican en cuatro tipos principales: (1) salteamiento de exones (*exon skipping*), (2) selección de un sitio de *splicing* 5' alternativo o donador, (3) selección de un sitio de *splicing* 3' alternativo o aceptor y (4) retención de intrón (Kim et al., 2007; Sugnet et al., 2004) (Figura 12B). Además existen otros eventos complejos de *splicing* menos frecuentes que incluyen eventos mutuamente excluyentes, sitios alternativos del inicio de la transcripción, y sitios



múltiples de poliadenilación (Black, 2003; Breitbart et al., 1987; Suzuki et al., 2001). Por otro lado los análisis bioinformáticos indican que los eucariotes superiores tienen una proporción más grande de genes que son procesados por *splicing* alternativo (Kim et al., 2007; Sugnet et al., 2004).

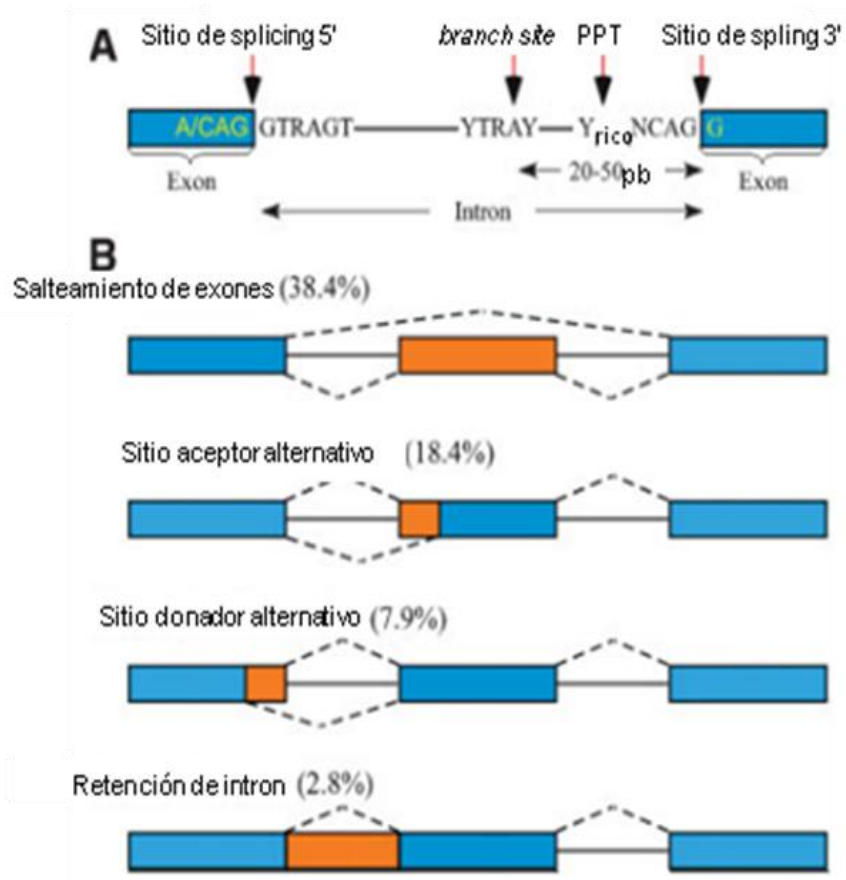
Los genes de los receptores P2X son sujeto de procesamiento por *splicing* alternativo (North, 2002). La mayoría de las variantes de *splicing* resultan de la remoción de uno o más exones, aunque existen algunas con exones alterados debido al uso de sitios donador/aceptor alternativos (North, 2002).

Se sabe que algunas variantes de *splicing* alternativo de los receptores P2X tienen propiedades diferentes con respecto a las secuencias canónicas, como cambios en la desensibilización del canal, formación del poro etc. (Brändle et al., 1997; Cheewatrakoolpong et al., 2005; Koshimizu et al., 1998) y en la interacción con otras proteínas (Koshimizu et al., 2006). También se ha encontrado que algunas son tejido específicas (Carpenter et al., 1999; Feng et al., 2006; Hardy et al., 2000; Linan-Rico et al., 2012), que se expresan en algún estadio del desarrollo (da Silva et al., 2007) y/o participan en algunos procesos fisiológicos (Brändle et al., 1997; Feng et al., 2006; Skarratt et al., 2005) entre ellos patologías (Dhir and Buratti, 2010). Además se ha visto que algunas cambian las propiedades de la variante completa si son co-expresadas con ésta ó resultan en la ganancia de función del receptor (Linan-Rico et al., 2012; Sun et al., 2010; Townsend-Nicholson et al., 1999).

En la base de datos del NCBI existen reportadas un número de variantes de *splicing* alternativo del receptor P2X4 del ratón, de las cuales 4 están validadas y de

éstas últimas solamente una ha sido probada para su funcionalidad (Townsend-Nicholson et al., 1999): AF089752 (Cuadro IV).

Es posible que, si la variante completa o canónica del receptor P2X4 del ratón se expresa en el intestino delgado, también existan variantes de splicing alternativo del receptor como se ha encontrado en otros tejidos (Townsend-Nicholson et al., 1999).



**Figura 13.** Tipos de splicing alternativo. A: Las cuatro señales de splicing basales. B: Los cuatro tipos de splicing mas importantes. La prevalencia relativa de cada tipo de splicing conservado en el humano y el ratón se muestra en paréntesis. El restante 32.5% que no se muestra representa formas más complejas de splicing. En azul se muestran los exones constitutivos, las regiones que sufren eventos de splicing en anaranjado, los intrones están representados por líneas sólidas, y las líneas punteadas muestran las opciones de splicing.

**Cuadro IV.** Variantes de *splicing* alternativo del receptor P2X4 del ratón

Nombre	Descripción	No. de Acceso	Referencia
P2X4a	Carece de exón 6	AF089752	(Townsend-Nicholson et al., 1999)
P2X4b	Carece de exón 6	AJ251460	Simon <i>et al.</i> , 1999
P2X4c	Carece de exón 10	AJ251461	Simon <i>et al.</i> , 1999
P2X4d	Carece de exón 6 y 10	AJ251462	Simon <i>et al.</i> , 1999

## **Justificación**

No se conoce si se expresan variantes de *splicing* del receptor P2X4 en el intestino del ratón y si se expresan, de cual tipo de variante de *splicing* se trata. Es importante conocer las variantes de *splicing* que se expresan en un tejido debido a que éstas pueden contribuir a formar canales heteroméricos con las variantes completas lo que cambia las propiedades fisiológicas de los canales. También pueden participar en la señalización purinérgica o pueden estar implicadas en otros procesos fisiológicos por determinar.

## **Objetivo**

Debido a lo anterior nos propusimos aislar y clonar las variantes de *splicing* del receptor P2X4 presentes en el intestino delgado del ratón e identificar su organización exónica.

## **Materiales y Métodos**

Después de llevar a cabo la reacción de RT-PCR con los oligonucleótidos P2X4-1 sentido y P2X4-1 antisentido como se menciona en la sección 7.3., se clonó el producto de PCR completo en pGEMT-Easy, se transformaron bacterias *E. coli* Top 10 calcio competentes y se extrajo el DNA plasmídico. Se mandaron secuenciar diferentes clonas que por digestión arrojaron distintos tamaños de banda y se analizaron para su identidad con la herramienta bioinformática BLAST y las herramientas del programa DNASTAR *Lasergene* versión 7.1. Además se utilizó el programa TMpred (<http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED>), para conocer la topología de las variantes mediante la predicción de las regiones que atraviesan la membrana y su orientación.

## Resultados

Llevamos a cabo amplificaciones por *RT-PCR* de cerebro (control positivo) y de preparaciones de músculo liso-plexo mientérico del yeyuno. Utilizamos oligonucleótidos específicos para amplificar el marco de lectura completo del receptor P2X4. Los oligonucleótidos utilizados fueron P2X4-1 sentido y P2X4-1 antisentido (ver Cuadro III de la sección 7.5). Después de clonar el producto de PCR completo y de secuenciar varias clonas, pudimos aislar cuatro cDNAs independientes de 1550, 1423, 1408 y 1240 nucleótidos de longitud. Dichos cDNAs correspondieron a cuatro isoformas del receptor P2X4; la variante completa de XII exones; una variante de *splicing* alternativo que carece del exón X (P2X4c) y que subimos a la base de datos del GenBank con el número de acceso: JX417451; otra variante de *splicing* que carece del exón VI; y una variante de *splicing* alternativo que no había sido reportada (P2X4e) que carece de los exones II, III, IV y gran parte del exón V, además presenta un codón de paro prematuro en el exón VI. (Figura 13).

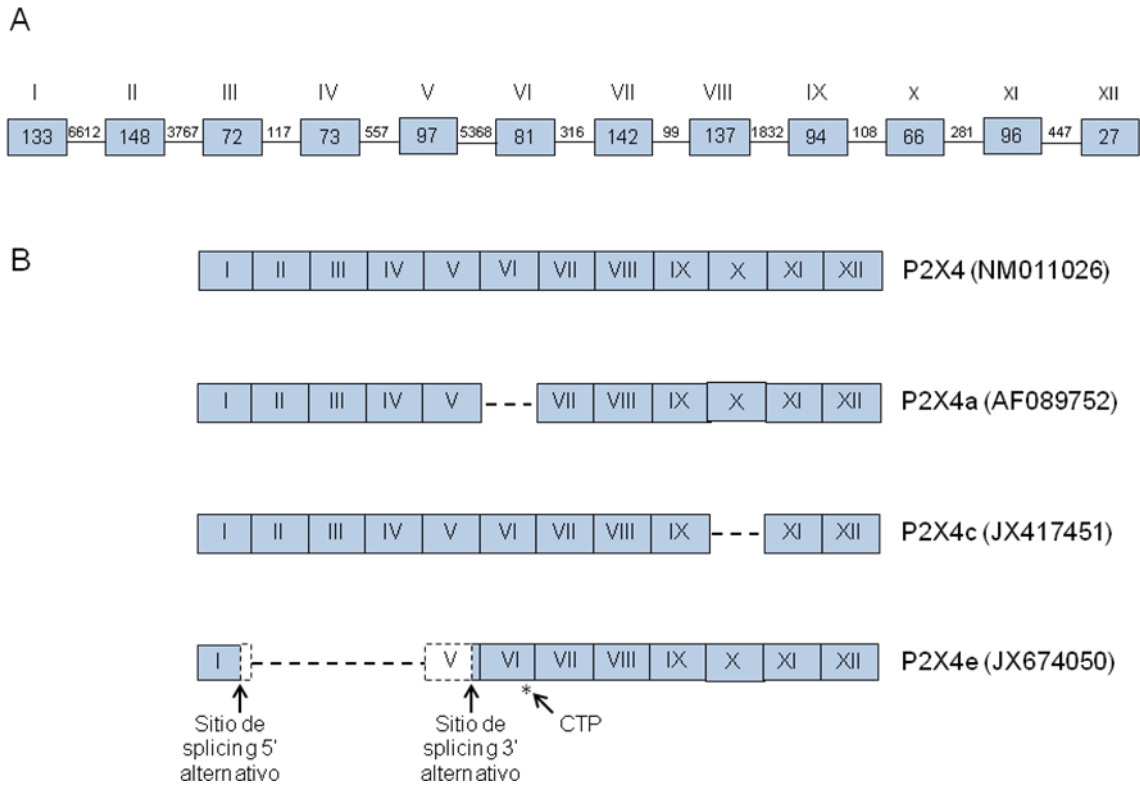
La variante P2X4c que sometimos a la base de datos con el número de acceso: JX41745, resulta de un evento de *splicing* alternativo del tipo de salteamiento de exones en la que el exón X fue eliminado. Como se mencionó anteriormente ya se había reportado una variante similar (AJ251461 ver Cuadro IV), en cuanto a que carecía del exón X (Simon *et al.*, 1999). Sin embargo, la anterior tiene cambios de nucleótidos (ver Figura suplementaria 1) con respecto a la clonada en éste trabajo, y la variante del intestino que clonamos es 100% idéntica en nucleótidos con la variante del receptor P2X4 canónica del ratón (NM\_011026).

Por otro lado la variante P2X4e, que también sometimos a la base de datos GenBank en éste trabajo, es un poco más compleja al ser resultado de la combinación de tres eventos de *splicing* alternativo: selección de un sitio de *splicing* 5' alternativo dentro del exón I (11 nt antes de que termine el exón), eliminación de los exones: II, III y IV; y selección de un sitio de *splicing* 3' alternativo dentro del exón V (se eliminan los primeros 91 nucleótidos del exón). Además estos eventos de *splicing* causan un cambio en el marco de lectura de la secuencia, lo que resulta en la lectura de un codón de paro prematuro (CTP) en la posición 204, sólo 9 nucleótidos antes de que termine el exón VI (ver Figura 13). Este tipo de transcritos es conocido como transcritos sin sentido y la mayoría de ellos son reconocidos y degradados eficientemente por la célula, a través de una ruta conocida como "*nonsense-mediated mRNA decay*" (NMD por sus siglas en inglés).

Con el fin de predecir un modelo topológico de la variante P2X4c en la membrana de la célula, y especular sobre su funcionalidad como canal, utilizamos el programa TMpred que predice las regiones transmembranales de una proteína, y su orientación.

Obtuvimos que el modelo preferido de topología de la variante es el de una proteína con su N-terminal intracelular, y dos hélices transmembranales con un score= 2986, ubicados en las posiciones 34 a 50 con orientación de adentro hacia afuera y de la 321 a 339 (aminoácidos) con orientación de afuera hacia adentro (ver patrón de hidrofobicidad en la Figura suplementaria 3).





**Figura 14.** Arreglo esquemático de las variantes del receptor P2X4 encontradas en el intestino delgado del ratón. A, organización genómica del gen del receptor P2X4 del ratón. B, transcritos (mRNA) de las variantes de *splicing* encontradas: variante completa (número de acceso: NM011026), variante que carece del exón 6 (número de acceso: AF089752), variante sin sentido que selecciona un sitio donador y aceptor alternativo, carece de los exones 2,3,4 y 5 y tiene un codón de paro prematuro (número de acceso: JX674050). Los número romanos representan el número de exones, la línea punteada representa los exones faltantes, y el símbolo (\*) el codón de paro prematuro.

## Discusión

Encontramos que el intestino de ratón expresa varias isoformas del receptor P2X4. Son dos laboratorios diferentes los que habían reportado variantes de *splicing* validadas del receptor P2X4 de ratón. Uno de ellos aisló las variantes de una línea celular inmortalizada de microglía, NTW8 (Simon *et al.*, 1999), y reportó las siguientes variantes: la variante completa (AJ251459), una variante que carece del exón VI (AJ251460), otra que carece del exón X (AJ251461) y una que carece tanto del exón 6 como del exón 10 (AJ251462). El otro laboratorio aisló las variantes a partir de una genoteca del cerebro del ratón, por medio de reacciones de *RT-PCR* (Townsend-Nicholson *et al.*, 1999), y reportó las siguientes variantes: la variante completa (AF089751) y una variante que carece del exón VI (AF089752).

Como podemos ver, tres de las variantes que encontramos en el intestino del ratón (P2X4, P2X4a y P2X4c) ya habían sido reportadas en el cerebro y en la microglía. Las variantes reportadas por los dos trabajos antes mencionados son diferentes entre ellas en el principio y al final de la secuencia (ver Figura suplementaria 2). No se sabe si estos cambios son debidos a que son variantes tejido-específicas, ó en el caso de las diferencias al final de la secuencia, a que sean debidas al oligonucleótido utilizado para su amplificación. Dichas diferencias en nucleótidos cambian algunos aminoácidos entre las variantes (ver Figura suplementaria 3), esto podría ser importante ya que se han reportado algunas diferencias farmacológicas (con el efecto del PPADS) entre dichas variantes (ver (Jones *et al.*, 2000; Townsend-Nicholson *et al.*, 1999). Sin embargo, es muy probable que la diferencia se deba a los diferentes

protocolos utilizados por los dos trabajos para el estudio de la farmacología del receptor (Jones et al., 2000).

Es importante aclarar que las variantes reportadas por Townsend-Nicholson en 1999 (la completa y la que carece del exón VI), son idénticas en nucleótidos a las que nosotros clonamos del intestino de ratón, y éstas a su vez son idénticas en nucleótidos a la secuencia reportada como canónica (número de acceso NM011026), por lo que muy posiblemente los cambios de las variantes de Simon *et al.* (1999) se deban a errores de secuenciación.

Con la evidencia aquí reportada no podemos conocer si las variantes de splicing alternativo encontradas son funcionales o no. Sin embargo, la variante P2X4a (AF089752) idéntica a la nuestra, demostró formar canales homoméricos con una muy baja eficacia al ATP (corrientes mínimas), y heteroméricos funcionales con una baja afinidad al ATP, al ser co-expresada con la variante completa (AF089751) en ovocitos de *Xenopus laevis* (Townsend-Nicholson et al., 1999). Las variantes P2X4c y P2X4e que nosotros clonamos no han sido probadas para su funcionalidad, aunque es poco probable que la variante P2X4e sea funcional ya que este tipo de transcritos es frecuentemente degradado en la célula por la ruta “*nonsense-mediated mRNA decay*” que es ubicua entre eucariontes. Se ha descrito que se lleva a cabo para proteger al organismo de los efectos nocivos o letales de proteínas dominantes negativas o de ganancia de función que podrían resultar si los transcritos sin sentido fueran estables; pero el mecanismo no es claro aún (NMD) (Frischmeyer and Dietz, 1999).

En conclusión, encontramos tres variantes de *splicing* alternativo, P2X4a, P2X4c y P2X4e que se expresan en el intestino delgado del ratón y son idénticas en nucleótidos a la secuencia canónica del receptor P2X4.



```

Majority      MAGCCSVLRAFLFEYDTPRIVLIRSRKVGMLNRRVQQLLILAYVIGWVFWVEKGYQETDSVSVSVTTKAKGVAVTNTSQLG
              10          20          30          40          50          60          70          80
P2X4 canonico.pro      MAGCCSVLRAFLFEYDTPRIVLIRSRKVGMLNRRVQQLLILAYVIGWVFWVEKGYQETDSVSVSVTTKAKGVAVTNTSQLG 80
P2X4a (AF089752).pro  MAGCCSVLRAFLFEYDTPRIVLIRSRKVGMLNRRVQQLLILAYVIGWVFWVEKGYQETDSVSVSVTTKAKGVAVTNTSQLG 80
P2X4c (JX417451).pro  MAGCCSVLRAFLFEYDTPRIVLIRSRKVGMLNRRVQQLLILAYVIGWVFWVEKGYQETDSVSVSVTTKAKGVAVTNTSQLG 80
P2X4c (AJ251461).pro  MAGCCSVLGSFLFEYDTPRIVLIRSRKVGMLNRRVQQLLILAYVIGWVFWVEKGYQETDSVSVSVTTKAKGVAVTNTSQLG 80
P2X4a (AJ251460).pro  MAGCCSVLGSFLFEYDTPRIVLIRSRKVGMLNRRVQQLLILAYVIGWVFWVEKGYQETDSVSVSVTTKAKGVAVTNTSQLG 80

Majority      FRIWDVADYVVPQAEEENSLFIMTNMIVTVNQTQGTCP EIPDKTSICDSDANCTLGSSDTHSSGIGTGRCVFPFNASVKTCE
              90          100         110         120         130         140         150         160
P2X4 canonico.pro      FRIWDVADYVVPQAEEENSLFIMTNMIVTVNQTQGTCP EIPDKTSICDSDANCTLGSSDTHSSGIGTGRCVFPFNASVKTCE 160
P2X4a (AF089752).pro  FRIWDVADYVVPQAEEENSLFIMTNMIVTVNQTQGTCP EIPDKTSICDSDANCTLGSSDTHSSGIGTGRCVFPFNASVKTCE 160
P2X4c (JX417451).pro  FRIWDVADYVVPQAEEENSLFIMTNMIVTVNQTQGTCP EIPDKTSICDSDANCTLGSSDTHSSGIGTGRCVFPFNASVKTCE 160
P2X4c (AJ251461).pro  FRIWDVADYVVPQAEEENSLFIMTNMIVTVNQTQGTCP EIPDKTSICDSDANCTLGSSDTHSSGIGTGRCVFPFNASVKTCE 160
P2X4a (AJ251460).pro  FRIWDVADYVVPQAEEENSLFIMTNMIVTVNQTQGTCP EIPDKTSICDSDANCTLGSSDTHSSGIGTGRCVFPFNASVKTCE 160

Majority      VAAWCPVENDAGVPTPAFLKAAENFTLLVKNNIWPYKFNFSKRNI LPNITTSYLKSCIYNARTDPFCPIFRLGQIVADAG
              170         180         190         200         210         220         230         240
P2X4 canonico.pro      VAAWCPVENDAGVPTPAFLKAAENFTLLVKNNIWPYKFNFSKRNI LPNITTSYLKSCIYNARTDPFCPIFRLGQIVADAG 240
P2X4a (AF089752).pro  VAAWCPVENDAGVPT-----RNILPNITTSYLKSCIYNARTDPFCPIFRLGQIVADAG 213
P2X4c (JX417451).pro  VAAWCPVENDAGVPTPAFLKAAENFTLLVKNNIWPYKFNFSKRNI LPNITTSYLKSCIYNARTDPFCPIFRLGQIVADAG 240
P2X4c (AJ251461).pro  VAAWCPVENDAGVPTPAFLKAAENFTLLVKNNIWPYKFNFSKRNI LPNITTSYLKSCIYNARTDPFCPIFRLGQIVADAG 240
P2X4a (AJ251460).pro  VAAWCPVENDAGVPT-----RNILPNITTSYLKSCIYNARTDPFCPIFRLGQIVADAG 213

Majority      HSFQEMAVEGGIMGIQIKWDCNLDRAASHCLPRYSFRRLDTRDLEHNVSPGYNFRFAKYYRDLAGNEQRTLTKAYGIRFD
              250         260         270         280         290         300         310         320
P2X4 canonico.pro      HSFQEMAVEGGIMGIQIKWDCNLDRAASHCLPRYSFRRLDTRDLEHNVSPGYNFRFAKYYRDLAGNEQRTLTKAYGIRFD 320
P2X4a (AF089752).pro  HSFQEMAVEGGIMGIQIKWDCNLDRAASHCLPRYSFRRLDTRDLEHNVSPGYNFRFAKYYRDLAGNEQRTLTKAYGIRFD 293
P2X4c (JX417451).pro  HSFQEMAVEGGIMGIQIKWDCNLDRAASHCLPRYSFRRLDTRDLEHNVSPGYNFRFAKYYRDLAGNEQRTLTKAYGIRFD 320
P2X4c (AJ251461).pro  HSFQEMAVEGGIMGIQIKWDCNLDRAASHCLPRYSFRRLDTRDLEHNVSPGYNFRFAKYYRDLAGNEQRTLTKAYGIRFD 320
P2X4a (AJ251460).pro  HSFQEMAVEGGIMGIQIKWDCNLDRAASHCLPRYSFRRLDTRDLEHNVSPGYNFRFAKYYRDLAGNEQRTLTKAYGIRFD 293

Majority      IIVFGKAGKFDIIP TMINVGSGLALLGVATVLC DVIIVLYCMKKRYRDKKYKYVEDYEQGLSGETDQ-
              330         340         350         360         370         380
P2X4 canonico.pro      IIVFGKAGKFDIIP TMINVGSGLALLGVATVLC DVIIVLYCMKKRYRDKKYKYVEDYEQGLSGETDQ. 389
P2X4a (AF089752).pro  IIVFGKAGKFDIIP TMINVGSGLALLGVATVLC DVIIVLYCMKKRYRDKKYKYVEDYEQGLSGETDQ. 362
P2X4c (JX417451).pro  IIVFGKA-----TVLCDVIIVLYCMKKRYRDKKYKYVEDYEQGLSGETDQ. 367
P2X4c (AJ251461).pro  IIVFGKA-----TVLCDVIIVLYCMKKRYRDKKYKYVEDYEQGLSGEMNQ. 367
P2X4a (AJ251460).pro  IIVFGKAGKFDIIP TMINVGSGLALLGVATVLC DVIIVLYCMKKRYRDKKYKYVEDYEQGLSGEMNQ. 362

```

Decoration 'Decoration #1': Shade (with solid light sky blue) residues that match the Consensus exactly.

**Figura Suplementaria 2.** Alineamiento por el método de ClustalV del programa DNASTar Lasergene versión 7.1 de la secuencias de aminoácidos de las variantes de splicing del receptor P2X4.

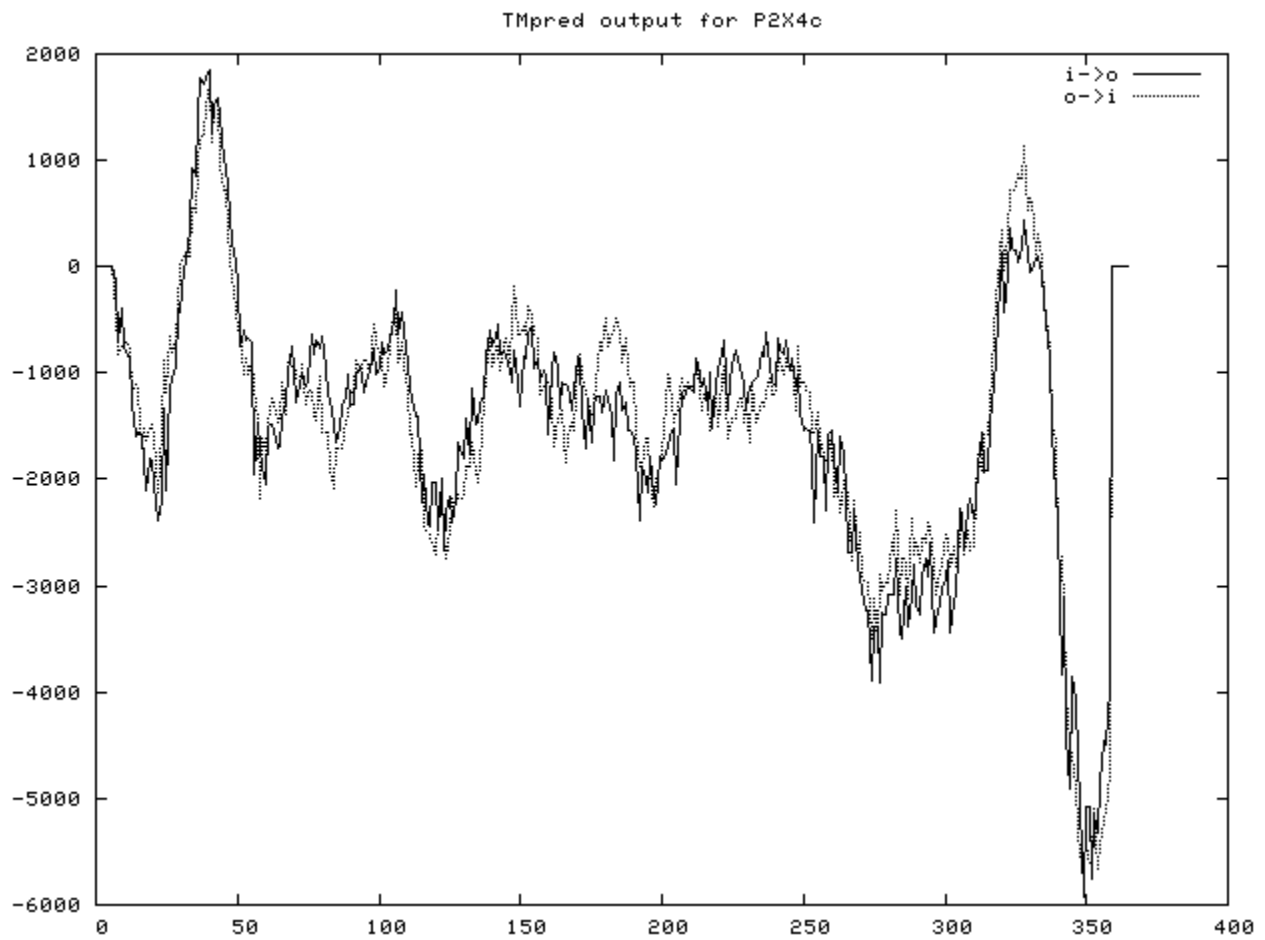


Figura Suplementaria 3. Gráfica del patrón de hidrofobicidad de la variante P2X4c que se aisló del intestino del ratón, obtenida con el programa TMpred.

## VII. REFERENCIAS

- Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Boeynaems, J.M., Barnard, E.A., Boyer, J.L., Kennedy, C., Knight, G.E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K.A., Weisman, G.A., 2006. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 58, 281-341.
- Agboh, K.C., Webb, T.E., Evans, R.J., Ennion, S.J., 2004. Functional characterization of a P2X receptor from *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* 279, 41650-41657.
- Antonio, L., Stewart, A., Xu, X., Varanda, W., Murrell-Lagnado, R., Edwardson, J., 2011. P2X4 receptors interact with both P2X2 and P2X7 receptors in the form of homotrimers. *British journal of pharmacology* 163, 1069-1077.
- Barajas-Lopez, C., Espinosa-Luna, R., Zhu, Y., 1998. Functional interactions between nicotinic and P2X channels in short-term cultures of guinea-pig submucosal neurons. *J Physiol* 513 ( Pt 3), 671-683.
- Barajas-Lopez, C., Huizinga, J., 1996. P2x-purinoceptors of myenteric neurones from the guinea-pig ileum and their unusual pharmacological properties. *British journal of pharmacology* 119, 1541-1548.
- Barajas-Lopez, C., Montano, L.M., Espinosa-Luna, R., 2002. Inhibitory interactions between 5-HT3 and P2X channels in submucosal neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283, G1238-1248.
- Bernier, L.-P., Ase, A., Chevallier, S.p., Blais, D., Zhao, Q., Boucraut, E., Logothetis, D., Sanguela, P., 2008. Phosphoinositides regulate P2X4 ATP-gated channels through direct interactions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 12938-12945.
- Bian, X., Bertrand, P., 2000. Descending inhibitory reflexes involve P2X receptor-mediated transmission from interneurons to motor neurons in guinea-pig ileum. *The Journal of physiology*.
- Bian, X., Ren, J., DeVries, M., Schnegelsberg, B., Cockayne, D.A., Ford, A.P., Galligan, J.J., 2003. Peristalsis is impaired in the small intestine of mice lacking the P2X3 subunit. *J Physiol* 551, 309-322.
- Black, D.L., 2003. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72, 291-336.
- Bo, X., Kim, M., Nori, S., Schoepfer, R., Burnstock, G., North, R., 2003. Tissue distribution of P2X4 receptors studied with an ectodomain antibody. *Cell and tissue research* 313, 159-224.
- Bo, X., Zhang, Y., Nassar, M., Burnstock, G., Schoepfer, R., 1995. A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. *FEBS letters* 375, 129-133.
- Bornstein, J.C., 2006. Intrinsic sensory neurons of mouse gut--toward a detailed knowledge of enteric neural circuitry across species. Focus on "characterization of myenteric sensory neurons in the mouse small intestine". *J Neurophysiol* 96, 973-974.
- Bornstein, J.C., Furness, J.B., Kunze, W.A., 1994. Electrophysiological characterization of myenteric neurons: how do classification schemes relate? *J Auton Nerv Syst* 48, 1-15.
- Bowler, J.W., Bailey, R.J., North, R.A., Surprenant, A., 2003. P2X4, P2Y1 and P2Y2 receptors on rat alveolar macrophages. *Br J Pharmacol* 140, 567-575.



Brake, A.J., Wagenbach, M.J., Julius, D., 1994. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 371, 519-523.

Brändle, U., Spielmanns, P., Osteroth, R., Sim, J., Surprenant, A., Buell, G., Ruppertsberg, J., Plinkert, P., Zenner, H., Glowatzki, E., 1997. Desensitization of the P2X(2) receptor controlled by alternative splicing. *FEBS letters* 404, 294-298.

Breitbart, R.E., Andreadis, A., Nadal-Ginard, B., 1987. Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. *Annu Rev Biochem* 56, 467-495.

Brookes, S.J., 2001. Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *Anat Rec* 262, 58-70.

Buell, G., Lewis, C., Collo, G., North, R., Surprenant, A., 1996. An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *The EMBO Journal* 15, 1996.

Burkhart, C.N., 2000. Ivermectin: an assessment of its pharmacology, microbiology and safety. *Vet Hum Toxicol* 42, 30-35.

Carpenter, D., Meadows, H., Brough, S., Chapman, G., Clarke, C., Coldwell, M., Davis, R., Harrison, D., Meakin, J., McHale, M., Rice, S., Tomlinson, W., Wood, M., Sanger, G., 1999. Site-specific splice variation of the human P2X4 receptor. *Neuroscience letters* 273, 183-186.

Castelucci, P., Robbins, H., Poole, D., Furness, J., 2002. The distribution of purine P2X(2) receptors in the guinea-pig enteric nervous system. *Histochemistry and cell biology* 117, 415-437.

Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J., Stojilkovic, S., 2011. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacological reviews* 63, 641-683.

Costa, M., Brookes, S.J., Steele, P.A., Gibbins, I., Burcher, E., Kandiah, C.J., 1996. Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* 75, 949-967.

Crack, B.E., Beukers, M.W., McKechnie, K.C., Ijzerman, A.P., Leff, P., 1994. Pharmacological analysis of ecto-ATPase inhibition: evidence for combined enzyme inhibition and receptor antagonism in P2X-purinoceptor ligands. *British journal of pharmacology* 113, 1432-1438.

Cunha, R.A., Sebastiao, A.M., Ribeiro, J.A., 1998. Inhibition by ATP of hippocampal synaptic transmission requires localized extracellular catabolism by ecto-nucleotidases into adenosine and channeling to adenosine A1 receptors. *J Neurosci* 18, 1987-1995.

Cheewatrakoolpong, B., Gilcrest, H., Anthes, J.C., Greenfeder, S., 2005. Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel. *Biochem Biophys Res Commun* 332, 17-27.

Chen, C.C., Akopian, A.N., Sivilotti, L., Colquhoun, D., Burnstock, G., Wood, J.N., 1995. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 377, 428-431.

da Silva, R.r., Resende, R., Ulrich, H., 2007. Alternative splicing of P2X6 receptors in developing mouse brain and during in vitro neuronal differentiation. *Experimental physiology* 92, 139-145.

Decker, D.A., Galligan, J.J., 2009. Cross-inhibition between nicotinic acetylcholine receptors and P2X receptors in myenteric neurons and HEK-293 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296, G1267-1276.

Dhir, A., Buratti, E., 2010. Alternative splicing: role of pseudoexons in human disease and potential therapeutic strategies. *The FEBS journal* 277, 841-855.

Edwards, F.A., Gibb, A.J., Colquhoun, D., 1992. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* 359, 144-147.

Evans, R.J., Derkach, V., Surprenant, A., 1992. ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature* 357, 503-505.

Evans, R.J., Lewis, C., Buell, G., Valera, S., North, R.A., Surprenant, A., 1995. Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Mol Pharmacol* 48, 178-183.

Feng, Y.-H., Li, X., Wang, L., Zhou, L., Gorodeski, G., 2006. A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization. *The Journal of biological chemistry* 281, 17228-17237.

Fountain, S., North, R., 2006. A C-terminal lysine that controls human P2X4 receptor desensitization. *The Journal of biological chemistry* 281, 15044-15049.

Fountain, S.J., Cao, L., Young, M.T., North, R.A., 2008. Permeation properties of a P2X receptor in the green algae *Ostreococcus tauri*. *J Biol Chem* 283, 15122-15126.

Fountain, S.J., Parkinson, K., Young, M.T., Cao, L., Thompson, C.R., North, R.A., 2007. An intracellular P2X receptor required for osmoregulation in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 448, 200-203.

Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C., 1999. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet* 8, 1893-1900.

Furness, J.B., 2000. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 81, 87-96.

Furness, J.B., Costa, M., 1980. Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience* 5, 1-20.

Furness, J.B., Kunze, W.A., Bertrand, P.P., Clerc, N., Bornstein, J.C., 1998. Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog Neurobiol* 54, 1-18.

Furness, J.B., Sanger, G.J., 2002. Intrinsic nerve circuits of the gastrointestinal tract: identification of drug targets. *Curr Opin Pharmacol* 2, 612-622.

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

Galligan, J.J., 2002. Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 14, 611-623.

Graveley, B.R., 2001. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet* 17, 100-107.

Guerrero-Alba, R., Valdez-Morales, E., Juárez, E., Miranda-Morales, M., Ramírez-Martínez, J., Espinosa-Luna, R., Barajas-López, C., 2010. Two suramin binding sites are present in guinea pig but only one in murine native P2X myenteric receptors. *European journal of pharmacology* 626, 179-264.

Gulbransen, B.D., Bashashati, M., Hirota, S.A., Gui, X., Roberts, J.A., MacDonald, J.A., Muruve, D.A., McKay, D.M., Beck, P.L., Mawe, G.M., Thompson, R.J., Sharkey, K.A., 2012. Activation of neuronal P2X7 receptor-pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis. *Nat Med* 18, 600-604.

Guo, L.H., Trautmann, K., Schluesener, H.J., 2005. Expression of P2X4 receptor by lesional activated microglia during formalin-induced inflammatory pain. *J Neuroimmunol* 163, 120-127.

Hardy, L., Harvey, I., Chambers, P., Gillespie, J., 2000. A putative alternatively spliced variant of the P2X(1) purinoreceptor in human bladder. *Experimental physiology* 85, 461-463.

Hirst, G.D., Holman, M.E., Spence, I., 1974. Two types of neurones in the myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig. *J Physiol* 236, 303-326.

Hourani, S.M., Chown, J.A., 1989. The effects of some possible inhibitors of ectonucleotidases on the breakdown and pharmacological effects of ATP in the guinea-pig urinary bladder. *Gen Pharmacol* 20, 413-416.

Hu, H., Gao, N., Lin, Z., Gao, C., Liu, S., Ren, J., Xia, Y., Wood, J., 2001. P2X(7) receptors in the enteric nervous system of guinea-pig small intestine. *The Journal of comparative neurology* 440, 299-609.

Hu, H.Z., Gao, N., Zhu, M.X., Liu, S., Ren, J., Gao, C., Xia, Y., Wood, J.D., 2003. Slow excitatory synaptic transmission mediated by P2Y1 receptors in the guinea-pig enteric nervous system. *J Physiol* 550, 493-504.

Inoue, K., Tsuda, M., Koizumi, S., 2004. ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: chronic pain and microglia: involvement of the ATP receptor P2X4. *J Pharmacol Sci* 94, 112-114.

Jelínková, I., Vávra, V., Jindrichova, M., Obsil, T., Zemkova, H., Stojilkovic, S., 2008. Identification of P2X(4) receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 456, 939-950.

Jelínková, I., Yan, Z., Liang, Z., Moonat, S., Teisinger, J., Stojilkovic, S., Zemková, H., 2006. Identification of P2X4 receptor-specific residues contributing to the ivermectin effects on channel deactivation. *Biochemical and biophysical research communications* 349, 619-644.

Jo, Y.H., Donier, E., Martinez, A., Garret, M., Toulme, E., Boue-Grabot, E., 2011. Cross-talk between P2X4 and gamma-aminobutyric acid, type A receptors determines synaptic efficacy at a central synapse. *J Biol Chem* 286, 19993-20004.

Jones, C., Chessell, I., Simon, J., Barnard, E., Miller, K., Michel, A., Humphrey, P., 2000. Functional characterization of the P2X(4) receptor orthologues. *British journal of pharmacology* 129, 388-482.

Karanjia, R., Garcia-Hernandez, L.M., Miranda-Morales, M., Somani, N., Espinosa-Luna, R., Montano, L.M., Barajas-Lopez, C., 2006. Cross-inhibitory interactions between GABAA and P2X channels in myenteric neurones. *Eur J Neurosci* 23, 3259-3268.

Kawate, T., Michel, J., Birdsong, W., Gouaux, E., 2009. Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* 460, 592-600.

Khakh, B., Proctor, W., Dunwiddie, T., Labarca, C., Lester, H., 1999. Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 7289-7388.

Khakh, B.S., Burnstock, G., Kennedy, C., King, B.F., North, R.A., Seguela, P., Voigt, M., Humphrey, P.P., 2001. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 53, 107-118.

Khakh, B.S., North, R.A., 2006. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 442, 527-532.

Kim, E., Goren, A., Ast, G., 2008. Alternative splicing: current perspectives. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 30, 38-47.

Kim, E., Magen, A., Ast, G., 2007. Different levels of alternative splicing among eukaryotes. *Nucleic acids research* 35, 125-131.

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

Koshimizu, T.-a., Kretschmannova, K., He, M.-L., Ueno, S., Tanoue, A., Yanagihara, N., Stojilkovic, S., Tsujimoto, G., 2006. Carboxyl-terminal splicing enhances physical interactions between the cytoplasmic tails of purinergic P2X receptors. *Molecular pharmacology* 69, 1588-1598.

Koshimizu, T., TomiÅž, M., Van Goor, F., Stojilkovic, S., 1998. Functional role of alternative splicing in pituitary P2X2 receptor-channel activation and desensitization. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 12, 901-913.

Kunze, W.A., Furness, J.B., 1999. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu Rev Physiol* 61, 117-142.

Lalo, U., Verkhatsky, A., Pankratov, Y., 2007. Ivermectin potentiates ATP-induced ion currents in cortical neurons: evidence for functional expression of P2X4 receptors? *Neuroscience letters* 421, 158-162.

Lambrecht, G., Friebe, T., Grimm, U., Windscheif, U., Bungardt, E., Hildebrandt, C., Baumert, H.G., Spatz-Kumbel, G., Mutschler, E., 1992. PPADS, a novel functionally selective antagonist of P2 purinoceptor-mediated responses. *Eur J Pharmacol* 217, 217-219.

Lê, K., Babinski, K., Séguéla, P., 1998. Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18, 7152-7161.

Le, K., BouÅ©-Grabot, E., Archambault, V., SÅ©guÅ©la, P., 1999. Functional and biochemical evidence for heteromeric ATP-gated channels composed of P2X1 and P2X5 subunits. *The Journal of biological chemistry* 274, 15415-15419.

Lim, L., Burge, C., 2001. A computational analysis of sequence features involved in recognition of short introns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 11193-11198.

Linan-Rico, A., Jaramillo-Polanco, J., Espinosa-Luna, R., Jimenez-Bremont, J.F., Linan-Rico, L., Montano, L.M., Barajas-Lopez, C., 2012. Retention of a new-defined intron changes pharmacology and kinetics of the full-length P2X2 receptor found in myenteric neurons of the guinea pig. *Neuropharmacology* 63, 394-404.

Mao, Y., Wang, B., Kunze, W., 2006. Characterization of myenteric sensory neurons in the mouse small intestine. *J Neurophysiol* 96, 998-1010.

Miranda-Morales, M., Garcia-Hernandez, L.M., Ochoa-Cortes, F., Espinosa-Luna, R., Naranjo-Rodriguez, E.B., Barajas-Lopez, C., 2007. Cross-talking between 5-HT3 and GABAA receptors in cultured myenteric neurons. *Synapse* 61, 732-740.

Monro, R.L., Bertrand, P.P., Bornstein, J.C., 2004. ATP participates in three excitatory postsynaptic potentials in the submucous plexus of the guinea pig ileum. *J Physiol* 556, 571-584.

Murrell-Lagnado, R., Qureshi, O., 2008. Assembly and trafficking of P2X purinergic receptors (Review). *Molecular membrane biology* 25, 321-331.

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

Norenberg, W., Sobottka, H., Hempel, C., Plotz, T., Fischer, W., Schmalzing, G., Schaefer, M., 2012. Positive allosteric modulation by ivermectin of human but not murine P2X7 receptors. *Br J Pharmacol* 167, 48-66.

North, R., 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews* 82, 1013-1080.

Ochoa-Cortes, F., Garcia-Hernandez, L.M., Espinosa-Luna, R., Miranda-Morales, M., Montano, L.M., Barajas-Lopez, C., 2010. Functional interactions between nicotinic and P2X receptors in celiac ganglia neurons. *Auton Neurosci* 154, 59-65.

Oglesby, I.B., Lachnit, W.G., Burnstock, G., A.P.D.W., F., 1999. Subunit Specificity of Polyclonal Antisera to the Carboxy Terminal Regions of P2X Receptors, P2X1 through P2X7. *Drug Development Research* 47, 189-195.

Ohta, T., Kubota, A., Murakami, M., Otsuguro, K.-i., Ito, S., 2005. P2X2 receptors are essential for  $[Ca^{2+}]_i$  increases in response to ATP in cultured rat myenteric neurons. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 289, 48.

Pompolo, S., Furness, J.B., 1988. Ultrastructure and synaptic relationships of calbindin-reactive, Dogiel type II neurons, in myenteric ganglia of guinea-pig small intestine. *J Neurocytol* 17, 771-782.

Priel, A., Silberberg, S., 2004. Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels. *The Journal of general physiology* 123, 281-374.

Qureshi, O., Paramasivam, A., Yu, J., Murrell-Lagnado, R., 2007. Regulation of P2X4 receptors by lysosomal targeting, glycan protection and exocytosis. *Journal of cell science* 120, 3838-3849.

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

Ren, J., Bian, X., DeVries, M., Schnegelsberg, B., Cockayne, D., Ford, A., Galligan, J., 2003. P2X2 subunits contribute to fast synaptic excitation in myenteric neurons of the mouse small intestine. *The Journal of physiology* 552, 809-821.

Roberts, J., Vial, C., Digby, H., Agboh, K., Wen, H., Atterbury-Thomas, A., Evans, R., 2006. Molecular properties of P2X receptors. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 452, 486-500.

Robertson, S.J., Edwards, F.A., 1998. ATP and glutamate are released from separate neurones in the rat medial habenula nucleus: frequency dependence and adenosine-mediated inhibition of release. *The Journal of physiology* 508, 691-701.

Royle, S., BobanoviÄ‡, L., Murrell-Lagnado, R., 2002. Identification of a non-canonical tyrosine-based endocytic motif in an ionotropic receptor. *The Journal of biological chemistry* 277, 35378-35463.

Ruan, H., Burnstock, G., 2005. The distribution of P2X5 purinergic receptors in the enteric nervous system of mouse. *Cell and tissue research* 319, 191-391.

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

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

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

Silinsky, E.M., Gerzanich, V., Vanner, S.M., 1992. ATP mediates excitatory synaptic transmission in mammalian neurones. *Br J Pharmacol* 106, 762-763.

Sim, J., Chaumont, S.v., Jo, J., Ulmann, L., Young, M., Cho, K., Buell, G., North, R., Rassendren, F., 2006. Altered hippocampal synaptic potentiation in P2X4 knock-out mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 9006-9009.

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

Skarratt, K., Fuller, S., Sluyter, R., Dao-Ung, L.-P., Gu, B., Wiley, J., 2005. A 5' intronic splice site polymorphism leads to a null allele of the P2X7 gene in 1-2% of the Caucasian population. *FEBS letters* 579, 2675-2678.

Smith, T.K., Burke, E.P., Shuttleworth, C.W., 1999. Topographical and electrophysiological characteristics of highly excitable S neurones in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *J Physiol* 517 ( Pt 3), 817-830.

Soto, F., Garcia-Guzman, M., Gomez-Hernandez, J., Hollmann, M., Karschin, C., StÃ¼hmer, W., 1996. P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 3684-3692.

Stojilkovic, S., Yan, Z., Obsil, T., Zemkova, H., 2010. Structural insights into the function of P2X4: an ATP-gated cation channel of neuroendocrine cells. *Cellular and molecular neurobiology* 30, 1251-1258.

Sugnet, C.W., Kent, W.J., Ares, M., Jr., Haussler, D., 2004. Transcriptome and genome conservation of alternative splicing events in humans and mice. *Pac Symp Biocomput*, 66-77.

Sun, C., Chu, J., Singh, S., Salter, R.D., 2010. Identification and characterization of a novel variant of the human P2X(7) receptor resulting in gain of function. *Purinergic Signal* 6, 31-45.

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

Surprenant, A., North, R., 2009. Signaling at purinergic P2X receptors. *Annual review of physiology* 71, 333-392.

Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R.A., Buell, G., 1996. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272, 735-738.

Suzuki, Y., Taira, H., Tsunoda, T., Mizushima-Sugano, J., Sese, J., Hata, H., Ota, T., Isogai, T., Tanaka, T., Morishita, S., Okubo, K., Sakaki, Y., Nakamura, Y., Suyama, A., Sugano, S., 2001. Diverse transcriptional initiation revealed by fine, large-scale mapping of mRNA start sites. *EMBO reports* 2, 388-393.

Torres, G., Egan, T., Voigt, M., 1999. Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *The Journal of biological chemistry* 274, 6653-6662.

Toulm e, E., Soto, F., Garret, M., Bou e-Grabot, E., 2006. Functional properties of internalization-deficient P2X4 receptors reveal a novel mechanism of ligand-gated channel facilitation by ivermectin. *Molecular pharmacology* 69, 576-587.

Townsend-Nicholson, A., King, B., Wildman, S., Burnstock, G., 1999. Molecular cloning, functional characterization and possible cooperativity between the murine P2X4 and P2X4a receptors. *Brain research. Molecular brain research* 64, 246-300.

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

Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W., Inoue, K., 2003. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424, 778-783.

Ulmann, L., Hatcher, J.P., Hughes, J.P., Chaumont, S., Green, P.J., Conquet, F., Buell, G.N., Reeve, A.J., Chessell, I.P., Rassendren, F., 2008. Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J Neurosci* 28, 11263-11268.

Valdez-Morales, E., Guerrero-Alba, R., Linan-Rico, A., Espinosa-Luna, R., Zarazua-Guzman, S., Miranda-Morales, M., Montano, L.M., Barajas-Lopez, C., 2011. P2X7 receptors contribute to the currents induced by ATP in guinea pig intestinal myenteric neurons. *Eur J Pharmacol* 668, 366-372.

Valera, S., Hussy, N., Evans, R.J., Adami, N., North, R.A., Surprenant, A., Buell, G., 1994. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 371, 516-519.

Vanderwinden, J.M., Timmermans, J.P., Schiffmann, S.N., 2003. Glial cells, but not interstitial cells, express P2X7, an ionotropic purinergic receptor, in rat gastrointestinal musculature. *Cell Tissue Res* 312, 149-154.

Visentin, S., Renzi, M., Frank, C., Greco, A., Levi, G., 1999. Two different ionotropic receptors are activated by ATP in rat microglia. *J Physiol* 519 Pt 3, 723-736.

von K&Auml;gelgen, I., Wetter, A., 2000. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 362, 310-323.

Xia, R., Mei, Z.Z., Milligan, C., Jiang, L.H., 2008. Inhibitory interaction between P2X4 and GABA(C) rho1 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 375, 38-43.

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

Yamamoto, K., Sokabe, T., Matsumoto, T., Yoshimura, K., Shibata, M., Ohura, N., Fukuda, T., Sato, T., Sekine, K., Kato, S., Isshiki, M., Fujita, T., Kobayashi, M., Kawamura, K., Masuda, H., Kamiya, A., Ando, J., 2006. Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nat Med* 12, 133-137.

Yu, Q., Zhao, Z., Sun, J., Guo, W., Fu, J., Burnstock, G., He, C., Xiang, Z., 2010. Expression of P2X6 receptors in the enteric nervous system of the rat gastrointestinal tract. *Histochemistry and cell biology* 133, 177-188.

Zhou, X., Galligan, J., 1996. P2X purinoceptors in cultured myenteric neurons of guinea-pig small intestine. *The Journal of physiology* 496 719-748.