



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES  
CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



Maestría en  
Investigación  
Biomédica

**TESIS  
“IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2X3 EN EL DOLOR  
CRÓNICO VISCERAL DURANTE LA COLITIS ULCERATIVA”**

**PRESENTA  
CARLOS ARMANDO SÁNCHEZ NAVARRO**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

**TUTOR  
DR. DANIEL CERVANTES GARCÍA**

**INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL**

**CO-TUTOR  
DRA. RAQUEL GUERRERO ALBA**

**ASESOR:  
EDUARDO EMMANUEL VALDEZ MORALES**

**AGUASCALIENTES, AGS., 19 DE MAYO DEL 2022**

CARTA DE VOTO APROBATORIO  
COMITÉ TUTORAL

DRA. PAULINA ANDRADE LOZANO  
DECANA SUBSTITUTA DEL CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD

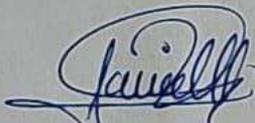
PRESENTE

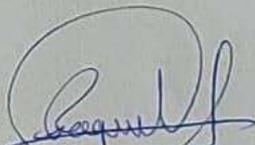
Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **CARLOS ARMANDO SÁNCHEZ NAVARRO** con ID 16058 quien realizó *la tesis* titulado: **IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2X3 EN EL DOLOR CRÓNICO VISCERAL DURANTE LA COLITIS ULCERATIVA**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que *él* pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 19 de mayo de 2022.

  
**Dr. Daniel Cervantes García**  
Tutor de tesis

  
**Dra. Raquel Guerrero Alba**  
Co-Tutor de tesis

  
**Dr. Eduardo Emmanuel Valdez Morales**  
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado

c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.

Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.

Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16

Actualización: 00

Emisión: 17/05/19

DICTAMEN DE LIBERACION ACADEMICA PARA INICIAR LOS TRAMITES DEL EXAMEN  
DE GRADO

Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 25/05/22

NOMBRE: CARLOS ARMANDO SÁNCHEZ NAVARRO ID 16058

PROGRAMA: MAestrÍA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA LGAC (del posgrado): BIOMEDICINA MOLECULAR Y CELULAR

TIPO DE TRABAJO: ( X ) Tesis ( ) Trabajo Práctico

TÍTULO: IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2X3 EN EL DOLOR CRÓNICO VISCERAL DURANTE LA COLITIS ULCERATIVA

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): En esta tesis se identificaron receptores P2X3 asociados al dolor crónico visceral en un proceso de colitis ulcerativa, como parte de un conocimiento en el área de gastroenterología y su aplicación clínica.

INDICAR	SI	NO	N.A. (NO APLICA)	SEGÚN	CORRESPONDA:
<i>Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:</i>					
SI					El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI					La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI					Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI					Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI					Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI					El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI					Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
SI					Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI					Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
<i>El egresado cumple con lo siguiente:</i>					
SI					Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI					Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI					Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutoral, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
SI					Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI					Coincide con el título y objetivo registrado
SI					Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI					Tiene el CVU del Conacyt actualizado
No					Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
<i>En caso de Tesis por artículos científicos publicados</i>					
N.A.					Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
N.A.					El estudiante es el primer autor
N.A.					El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
N.A.					En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
N.A.					Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
N.A.					La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado:

Sí  X

No

Elaboró:

FIRMAS

\* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADESCRIPCION:

DR. RICARDO ERNESTO RAMÍREZ OROZCO

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DR. LUIS FERNANDO BARBA GALLARDO

\* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutoral, asignado por el Decano

Revisó:

DR. RICARDO ERNESTO RAMÍREZ OROZCO

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

Autorizó:

DRA. PAULINA ANDRÁDE LOZANO

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

**Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado**

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

### Your manuscript submission - 872760

- Parte del contenido de este mensaje se ha bloqueado porque el remitente no está en la lista de remitentes seguros. Confío en el contenido de immunology.editorial.office@frontiersin.org. | Mostrar contenido bloqueado
- Marca para seguimiento.
- Reenvió este mensaje el Mié 23/02/2022 12:54.

 immunology.editorial.office=frontiersin.org@mg.frontiersin.org en nombre de Frontiers in Immunology Editorial Office <immunology.editorial.office@frontiersin.org>  
 Para: CARLOS ARMANDO SANCHEZ NAVARRO Mié 09/02/2022 16:18

Dear Dr Sánchez-Navarro

We are pleased to inform you that we have received the manuscript "TNF- $\alpha$  enhances sensory DRG neurons excitability through modulation of P2X3 receptors in an acute colitis model" to be considered for publication in Frontiers in Immunology, section Cytokines and Soluble Mediators in Immunity.

You can access the review forum and track the progress of your manuscript using the following link:  
<https://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

If you have already created a Frontiers account using a different email address, please add this one as a secondary email to your Frontiers profile following this link:  
<https://loop.frontiersin.org/settings/email>  
 For any questions on the above, you can contact support@frontiersin.org

You will receive a notification as soon as the interactive review forum is activated and you receive access the review reports. You will then be able to interact directly with the reviewers in the interactive review forum and also re-submit a revised manuscript. If the required number of reviewers endorse your manuscript in the Independent Review stage, their tabs will be closed and the manuscript will be forwarded to the Review Finalized stage, where you will be able to interact with the handling editor via the Editor tab.

Kind regards,

Your Frontiers in Immunology team

Frontiers | Editorial Office - Collaborative Peer Review Team  
 www.frontiersin.org  
 12 Moorgate,  
 EC2R 6DA, London, UK  
 Office T 44 203 5144 082

For technical issues, please contact our IT Helpdesk (support@frontiersin.org) or visit our Frontiers Help Center (zendesk.frontiersin.org/hc/en-us); Frontiers in Immunology is the official journal of the IUIS

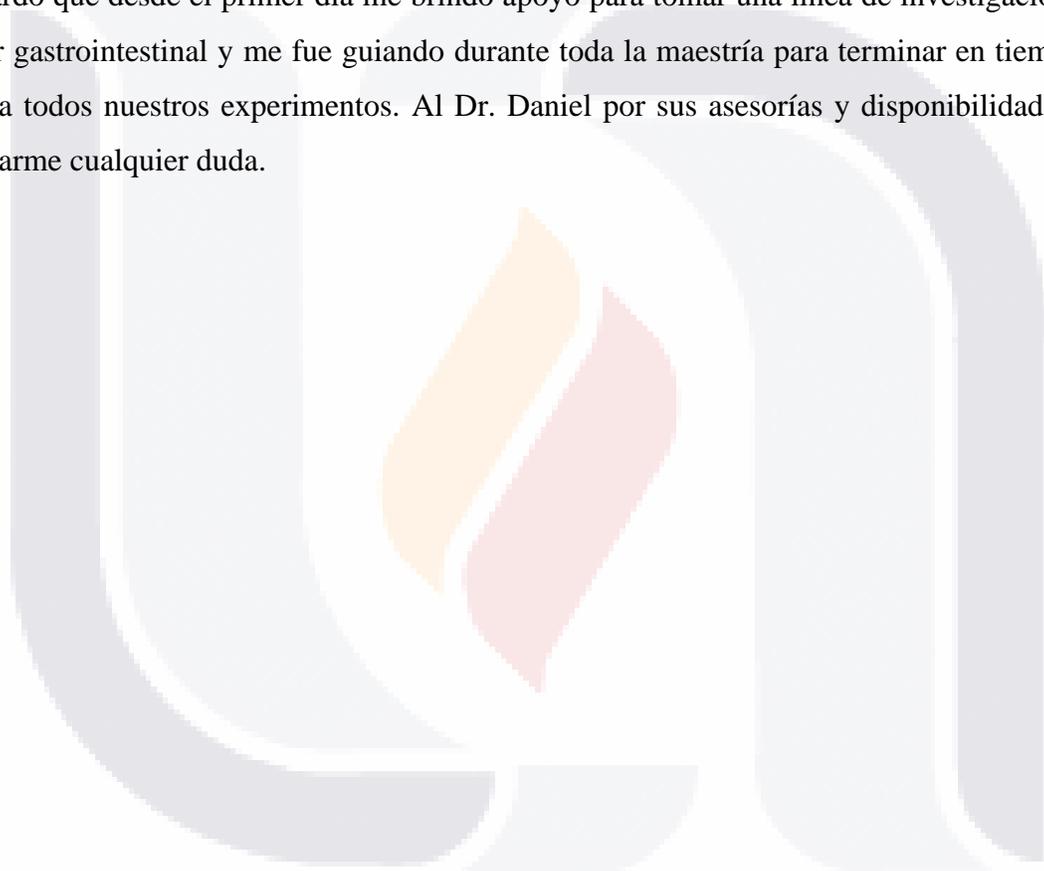
-----MANUSCRIPT DETAILS-----  
 Manuscript title: TNF- $\alpha$  enhances sensory DRG neurons excitability through modulation of P2X3 receptors in an acute colitis model  
 Manuscript ID: 872760  
 Submitted By: Raquel Guerrero-Alba  
 Authors: Raquel Guerrero-Alba, Eduardo E Valdez-Morales, Carlos A Sánchez-Navarro, Diana Reyes-Pavón, Tonatiuh Barrios-García, Fernando Ochoa-Cortes, Alma Barajas-Espinosa and Paulino Barragan-Iglesias  
 Journal: Frontiers in Immunology, section Cytokines and Soluble Mediators in Immunity  
 Research Topic: Purines, Pus, and Pathogens: The Roles of Purinergic Signaling in Inflammation and Immunity  
 Article type: Original Research  
 Submitted on: 09 Feb 2022

-----ADDITIONAL INFORMATION-----  
 In order to enable a smooth and efficient review process, please familiarize yourself with the Frontiers review guidelines:  
[https://www.frontiersin.org/Journal/ReviewGuidelines.aspx?s=1250&name=cytokines\\_and\\_soluble\\_mediators\\_in\\_immunity](https://www.frontiersin.org/Journal/ReviewGuidelines.aspx?s=1250&name=cytokines_and_soluble_mediators_in_immunity)

To take part in the Resource Identification Initiative please cite antibodies, genetically modified organisms, software tools, data, databases and services using the corresponding catalog number and RRID in the text of your article. Please see here for more information: [https://www.frontiersin.org/files/pdf/letter\\_to\\_author.pdf](https://www.frontiersin.org/files/pdf/letter_to_author.pdf)

## **AGRADECIMIENTOS**

Poder realizar esta maestría me permitió conocer a excelentes investigadores, maestros y compañeros, de los cuales pude aprender y sobre todo inspirarme para seguir adelante en mi vida profesional, contar con la experiencia de profesores del Sistema Nacional de Investigadores género en mí la inquietud para que no me detenga hasta formar parte del SNI. Agradezco a la Dra. Raquel por abrirme las puertas de su laboratorio, compartir todos sus conocimientos, guiarme en cada paso de esta maestría y por su enorme paciencia. Al Dr. Eduardo que desde el primer día me brindo apoyo para tomar una línea de investigación en dolor gastrointestinal y me fue guiando durante toda la maestría para terminar en tiempo y forma todos nuestros experimentos. Al Dr. Daniel por sus asesorías y disponibilidad para aclararme cualquier duda.



**ÍNDICE GENERAL**

ÍNDICE DE FIGURAS ..... 3

ÍNDICE DE TABLAS ..... 4

ACRÓNIMOS ..... 5

RESUMEN ..... 7

ABSTRACT..... 8

1. INTRODUCCIÓN ..... 9

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA ..... 11

3. MARCO TEÓRICO ..... 13

3.1 Enfermedad Infamatoria Intestinal ..... 13

3.2 Epidemiología de la EII. .... 14

3.3 Diagnóstico de la colitis ulcerosa. .... 14

3.4 Riesgo de cáncer colorrectal en la colitis ulcerosa. .... 15

3.5 Tratamiento de la colitis ulcerosa. .... 16

3.6 Bases neurobiológicas del dolor visceral ..... 17

3.7 Inervación sensitiva periférica y central del colon ..... 17

3.8 Sensibilización periférica..... 19

3.9 Sensibilización central ..... 20

3.10 Role del TNF- $\alpha$  y ATP en la colitis aguda ..... 20

3.11 Generalidades sobre los receptores purinérgicos P2X..... 21

3.12 Implicación de los receptores P2X3 en la colitis ..... 23

3.13 Modelos animales de EII y su aplicabilidad ..... 23

4. JUSTIFICACIÓN ..... 26

5. HIPÓTESIS ..... 27

6. OBJETIVO GENERAL..... 27

7.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
8.	METODOLOGÍA .....	28
8.1	Tipo y diseño general de estudio. ....	28
8.2	Universo de trabajo .....	29
8.3	Tipo de muestreo, selección y tamaño de muestra. ....	30
8.4	Establecimiento del modelo de colitis aguda en ratones C57BL6 con ácido sulfónico de dinitrobenceno (DNBS). ....	30
8.5	Evaluación de la severidad de la colitis .....	30
8.6	Análisis de la expresión génica de citocinas proinflamatorias .....	32
8.7	Registros electrofisiológicos mediante la técnica de Patch Clamp.....	33
8.8	Inmunofluorescencia.....	34
8.9	Análisis de Western blot .....	34
8.10	Soluciones y reactivos .....	35
8.11	Análisis estadístico .....	35
9.	RESULTADOS .....	36
9.1	Evaluación de la colitis aguda.....	36
9.2	Aumento de la expresión de ARNm de TNF- $\alpha$ en el tejido de colon inflamado.....	38
9.3	Efectos de la colitis aguda en la excitabilidad de las neuronas pequeñas de los DRGs.....	39
9.4	Niveles de proteína del receptor P2X3 en DRG (T8-L1) de ratones tratados con DNBS .....	43
10.	DISCUSION .....	45
11.	CONCLUSIÓN.....	47
12.	REFERENCIAS.....	48
13.	ANEXOS .....	58

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Tipos de Enfermedad Inflamatoria Intestinal.....13

Figura 2. Evaluación histológica a bajo aumento del grado de inflamación y alteraciones arquitecturales de colitis ulcerosa (HE 20x).....15

Figura 3. Sección transversal de la médula espinal.....18

Figura 4. Mecanismos que subyacen a la sensibilización.....19

Figura 5. Estructura molecular de los receptores P2X.....22

Figura 6. Evaluación de la colitis aguda inducida por DNBS.....36

Figura 7. Evaluación macroscópica y microscópica de la colitis aguda inducida por DNBS .....37

Figura 8. Los niveles de ARNm de TNF- $\alpha$  están elevados en el tejido colónico de ratones con colitis inducida por DNBS en comparación con los ratones control.....38

Figura 9. Las neuronas de los DRGs (T8-L1) aisladas de ratones tratados con DNBS son más excitables que las aisladas de ratones control.....39

Figura 10. El TNF- $\alpha$  exógeno incrementa la excitabilidad de las neuronas pequeñas de los DRG.....41

Figura 11. El efecto de TNF- $\alpha$  sobre la excitabilidad neuronal de DRG se atenúa notablemente por el antagonista selectivo del receptor P2X3, A-17491.....42

Figura 12. Inmunorreactividad del receptor P2X3 (verde) e IB4 (rojo) en las neuronas DRG (T8-L1) en los ratones control (A) y después del cuarto día de inducción de la colitis en ratones DNBS (B).....44

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Características de los modelos animales inducidos en EII.....25

Tabla 2. Variables, definiciones conceptuales y operacionales.....28

Tabla 3. Puntaje de diarrea y sangrado rectal.....31

Tabla 4. Secuencias de oligos utilizadas en ensayos de RT-PCR en tejido colónico y sus longitudes de producto esperados en pares de bases (pb).....32



**ACRÓNIMOS**

5-ASA	Ácido 5-Aminosalicílico
AINES	Antinflamatorios no esteroideos
CCR	Cáncer Colorrectal
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CI	Colitis Indeterminada o Inclasificable
CU	Colitis ulcerativa
DNBS	Ácido sulfónico de dinitrobenceno
DRGs	Ganglios de la raíz dorsal
DSS	Dextrano sulfato de sodio
eATP	Adenosin 5'-trifosfato extracelular
EC	Enfermedad de Crohn
EII	Enfermedad Intestinal Inflamatoria
FRAP	Fosfatasa ácida fluoro-resistente
H & E	Hematoxilina-eosina
IASP	Asociación Internacional para el Estudio del Dolor
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-16	Interleucina 6
pA	PicoAmperes
PM	Peso molecular
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico

SP	Sustancia P
TNBS	Ácido sulfónico trinitrobenceno
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TRPV1	Receptor de potencial transitorio V1



## RESUMEN

### **Implicación de los receptores purinérgicos P2X3 en el dolor crónico visceral durante la colitis ulcerativa**

Estudios previos han demostrado que la colitis aguda conduce a un aumento en la excitabilidad neuronal de los ganglios de la raíz dorsal (DRG). Sin embargo, los elementos de señalización implicados en esta hiperexcitabilidad aún no se han descifrado por completo. La adenosina 5'-trifosfato (ATP) extracelular es una molécula de señalización sensorial reconocida que aumenta la respuesta nociceptiva después de la inflamación a través de la activación de los receptores P2X3, que se expresan principalmente en las neuronas sensoriales periféricas. El objetivo de este trabajo fue determinar la participación de los receptores P2X3 en la hiperexcitabilidad neuronal en un modelo animal de colitis aguda. Para lograr esto, se administró DNBS (ácido sulfónico de dinitrobenzeno; 200 mg/kg) por vía intrarectal a ratones C57BL/6 y se evaluó la gravedad de la inflamación de acuerdo con los siguientes parámetros: pérdida de peso, puntajes macroscópicos y microscópicos. Se utilizó la técnica de patch-clamp para evaluar la excitabilidad neuronal mediante la medición de los cambios en la reobase y la activación del potencial de acción en las neuronas T8-L1 DRG. A-317491, es un antagonista del receptor P2X3 potente y selectivo bien establecido, sirvió para determinar la contribución de este receptor en las respuestas registradas. La expresión proteica de los receptores P2X3 en DRG se evaluó mediante Western blot e inmunofluorescencia. Cuatro días después de la administración de DNBS, se recolectaron secciones de colon para los análisis histológicos, las secciones provenientes de ratones DNBS mostraron ulceraciones focales, pérdida de las criptas e infiltración de células inmunes. Las neuronas DRG de ratones tratados con DNBS fueron significativamente más excitables en comparación con los controles; estos cambios se correlacionaron con una mayor expresión del receptor P2X3. Además, la expresión de ARNm de TNF- $\alpha$  también fue significativamente mayor en los tejidos colónicos inflamados en comparación con los controles. La incubación de neuronas DRG con TNF- $\alpha$  dio como resultado una hiperexcitabilidad celular similar a la medida en neuronas provenientes de ratones DNBS. El antagonista selectivo del receptor P2X3, A-317491, bloqueó el efecto inducido por TNF- $\alpha$ . Estos resultados respaldan la hipótesis de que el TNF- $\alpha$  aumenta la excitabilidad de las neuronas DRG que inervan el colon a través de la modulación de la actividad del receptor P2X3.

## ABSTRACT

### **Involvement of the P2X3 receptor in neuronal hyperexcitability in a colitis model in C57BL6 mice**

Previous studies have demonstrated that acute colonic inflammation leads to an increase in dorsal root ganglia (DRG) neuronal excitability. However, the signaling elements implicated in this hyperexcitability have yet to be fully unraveled. Extracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP) is a well-recognized sensory signaling molecule that enhances the nociceptive response after inflammation through activation of P2X3 receptors, which are expressed mainly by peripheral sensory neurons. The aim of this study is to investigate how P2X3 alters neuronal hypersensitivity in an animal model of acute colitis. To achieve this, DNBS (Dinitrobenzene sulfonic acid; 200 mg/kg) was intrarectally administered to C57BL/6 mice, and inflammation severity was assessed according to the following parameters: weight loss, macroscopic and microscopic scores on colonic tissue. Perforated patch clamp technique was used to evaluate neuronal excitability via measuring changes in rheobase and action potential triggered in T8-L1 DRG neurons. A-317491, a well-established potent and selective P2X3 receptor antagonist, helped to determine the contribution of the receptor on recorded responses. Protein expression of P2X3 receptors in DRG was evaluated by western blotting and immunofluorescence. Four days post-DNBS administration, colons were processed for histological analyses of ulceration, crypt morphology, goblet cell density, and immune cell infiltration. DRG neurons from DNBS-treated mice were significantly more excitable compared with controls; these changes correlated with increased expression of the P2X3 receptor. Furthermore, TNF- $\alpha$  mRNA expression was also significantly higher in inflamed colons compared to controls. Incubation of control DRG neurons with TNF- $\alpha$  resulted in similar cell hyperexcitability as measured in DNBS-derived neurons. The selective P2X3 receptor antagonist, A-317491, blocked the TNF- $\alpha$ -induced effect. These results support the hypothesis that TNF- $\alpha$  enhances colon-innervating DRG neuron excitability via modulation of P2X3 receptor activity.

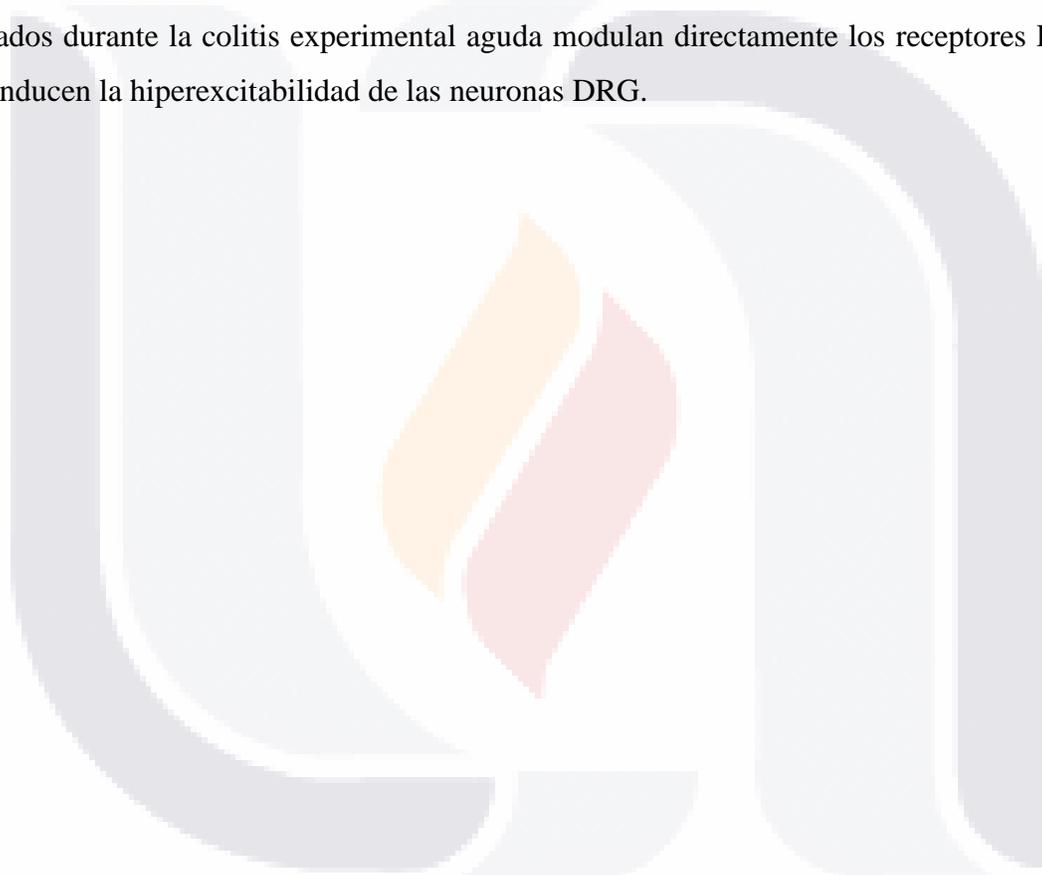
## 1. INTRODUCCIÓN

Tanto la enfermedad de Crohn (EC) como la colitis ulcerosa (CU) son tipos de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) que afectan aproximadamente a 1 millón de personas jóvenes (entre 15 y 35 años) en los EE. UU. y 2,5 millones en Europa (1). Ambas son enfermedades crónicas caracterizadas por inflamación recurrente del tracto gastrointestinal (GI), pero difieren en la distribución del área del tracto GI y la gravedad de la inflamación. Mientras que la EC afecta indiscriminadamente a todo el tracto GI (aunque es más común en el íleon terminal o la región perianal) y causa daño en todo el espesor del tejido afectado, la CU afecta principalmente a las capas mucosa y submucosa, se limita al colon y presenta tanto brotes (fase activa) como períodos de remisión (fase inactiva) (2). Las respuestas inmunitarias desreguladas en la mucosa intestinal son factores críticos en la aparición de la EII (3). Una liberación constante de mediadores proinflamatorios, incluidas la interleucina-1b (IL-1b), IL-6, IL-8 y entre las que destaca el factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , durante los brotes conduce a la sensibilización de las neuronas nociceptivas que inervan el intestino en los ganglios de la raíz dorsal (DRG), lo que provoca dolor visceral (4). Este aumento de la nocicepción se ha observado durante brotes agudos en pacientes con CU (5).

Cada vez hay más pruebas de que la adenosina 5'-trifosfato (ATP) extracelular es un importante mediador inflamatorio capaz de excitar directamente a los nociceptores (6). El ATP provoca este efecto mediante la activación de canales catiónicos controlados por ligandos denominados receptores P2X, localizados en la periferia de las neuronas sensoriales y centralmente en las neuronas de segundo orden de la asta dorsal (7). Se han identificado siete subunidades de receptores P2X (P2X1-P2X7). El subtipo de receptor P2X3 se expresa principalmente en neuronas DRG de tamaño pequeño y mediano, clasificadas como neuronas aferentes primarias de fibra C nociceptivas (8). Tras la unión del ATP a los receptores P2X3, los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  se movilizan hacia dentro de la célula induciendo la despolarización de la membrana, lo que conduce a la activación de procesos intracelulares dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  provocando dolor e hiperalgesia (7).

El papel de los receptores P2X3 en el dolor y la hipersensibilidad ha sido ampliamente estudiado, y son ampliamente aceptados como mediadores de respuestas de dolor anormales posteriores a una lesión o inflamación de la médula espinal (9). Se ha demostrado que la

activación de los receptores homoméricos P2X3 o heteroméricos P2X2/3 por ATP endógeno es fundamental para el desarrollo de hiperalgesia en condiciones inflamatorias (10). Por lo tanto, quizás no sea sorprendente que la expresión de estos receptores esté regulada positivamente en las biopsias de colon de pacientes con EII (11). El receptor P2X3 también ha sido implicado como mediador de la hipersensibilidad visceral durante la colitis aguda inducida por sustancias químicas (12). Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales el receptor P2X3 media esta hipersensibilidad visceral no se comprenden bien. Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo determinar si los mediadores proinflamatorios liberados durante la colitis experimental aguda modulan directamente los receptores P2X3 que inducen la hiperexcitabilidad de las neuronas DRG.



## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad intestinal inflamatoria (EII) se caracteriza por una inflamación crónica y recurrente dentro del tracto gastrointestinal, como son la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn, ambas generan una alta morbilidad y se diagnostican con mayor frecuencia en personas de entre 15 a 30 años, su prevalencia e incidencia varía dependiendo de etnia, localización geográfica y otros factores. En México, la tasa de incidencia de la EII ha incrementado significativamente en los últimos 10 años. Sus síntomas pueden variar de muy leves a muy severos, incluyen diarrea, sangre en las heces, fatiga, pérdida de peso y dolor abdominal. El dolor abdominal es un síntoma debilitante para muchos pacientes con EII causando un sufrimiento emocional y discapacidad física. Este dolor puede ser difícil de tratar con eficacia, debido a que sus causas no son bien entendidas. Como resultado los tratamientos farmacológicos con opioides resultan ser ineficientes, y la falta de respuesta adecuada conduce a la escalada de dosis (tolerancia), con sus efectos secundarios concomitantes, tales como el estreñimiento, el deterioro cognitivo, y paradójicamente estos medicamentos pueden empeorar el dolor (síndrome del intestino narcótico o hiperalgesia gastrointestinal inducida por opiáceos).

Mientras que las neuronas en el sistema nervioso central (SNC) son claramente importantes en la integración y expresión del dolor, el presente trabajo se enfoca en las neuronas periféricas de los DRG por las siguientes razones. Primero, las fibras nerviosas del tipo C pequeñas y del tipo A $\delta$  más grandes de los DRG son neuronas pseudounipolares nociceptivas cuyos axones distales inervan el intestino mientras que las porciones centrales proyectan hacia neuronas sensoriales de segundo orden en la asta dorsal de la medula espinal que transmite información sensorial al SNC. Por lo que los DRG son blancos terapéuticos ideales para la supresión del dolor debido a que estos son orientados hacia receptores periféricos, lo cual podría minimizar o evitar los efectos secundarios indeseados en el SNC. Segundo, son fundamentales para la generación del dolor visceral y varios estudios han demostrado que la inflamación incrementa la excitabilidad de las neuronas aferentes primarias de los DRG. Sin embargo, los mecanismos moleculares que alteran la función neuronal durante la inflamación gastrointestinal en la colitis aguda no son claros. Múltiples evidencias, sugieren fuertemente la participación de los receptores purinérgicos P2X3 debido a que es altamente expresado en neuronas nociceptivas de los DRG y varios estudios lo han

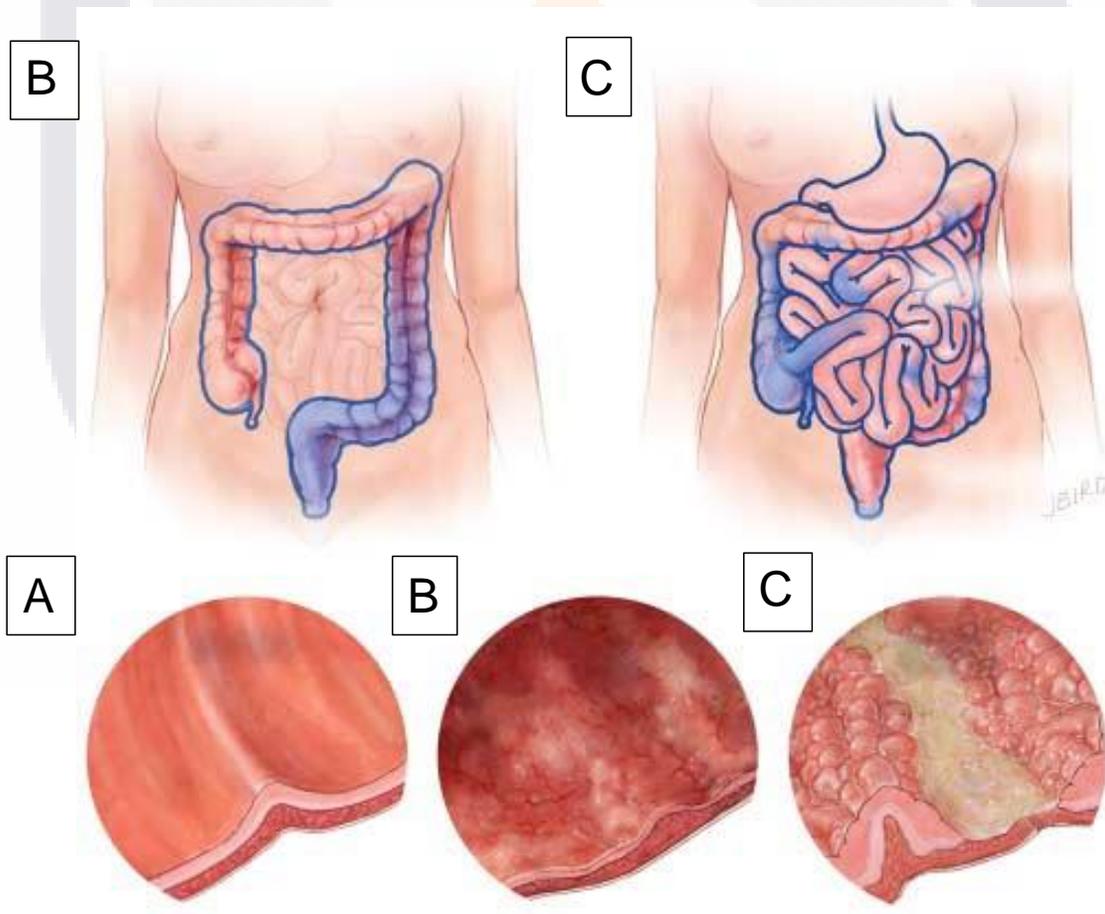
involucrado en la sensación de dolor. Por tal motivo, actualmente los receptores P2X3 son un objetivo interesante en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de dolor crónico neuropático e inflamatorio. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen la función esencial de los receptores P2X3 en el desarrollo de hiperalgesia durante la colitis no son claros.



### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Enfermedad Ininflamatoria Intestinal

La EII comprende principalmente la colitis ulcerosa (CU), la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis indeterminada o inclasificable (CI). Estas enfermedades se caracterizan por una inflamación crónica y recurrente dentro del tracto gastrointestinal, pero difieren con respecto a las regiones del tracto gastrointestinal que pueden ser afectadas, así como la distribución y profundidad de la inflamación (13). Al respecto, en la EC se afecta cualquier segmento del tracto gastrointestinal desde la boca hasta el ano, y la inflamación se presenta en todas las capas de la pared gastrointestinal; mientras que en la CU se afecta solamente el colon e invariablemente al recto y por lo general involucra solamente la mucosa de la pared intestinal (14) (figura 1).



**Figura 1. Tipos de Enfermedad Ininflamatoria Intestinal.** A) Pared normal del colon, B) Colitis ulcerativa, C) Enfermedad de Crohn. <https://www.rensheng2.com/>

### **3.2 Epidemiología de la EII.**

La EII se presenta con mayor frecuencia entre las edades de 20 y 40 años afectando la calidad de vida, el rendimiento educativo y la participación en el lugar de trabajo. Además, representa un problema de salud pública a nivel mundial debido a la acumulación de un alto número de casos, tasas altas de hospitalización, incapacidad, mortalidad prematura y un incremento en el costo médico directo con la llegada de la terapia biológica (3).

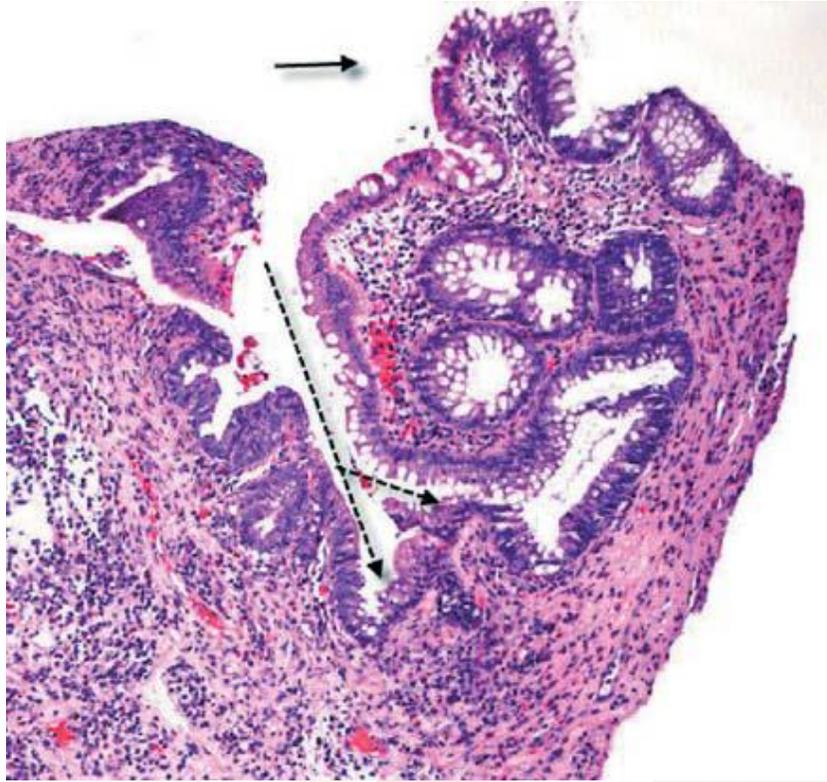
En 2017, se reportaron 6.8 millones de casos de EII a nivel mundial y la tasa de prevalencia aumento de 79.5 por 100 000 habitantes a 84.3 por cada 100 000 habitantes durante este periodo de tiempo (14). En Norteamérica y Europa, entre 1.5 y 2 millones de personas sufren la enfermedad (15). En 2015, en México se atendieron 33 060 casos y se observó una prevalencia en mujeres de 27.7 y en hombres de 26.9 por 100 000 habitantes (16), el promedio anual de nuevos casos fue de 28.8 (1987-1996) a 76.1 (1997-2006), la incidencia de nuevos casos se incrementó en 2.6 comparando ambos periodos de tiempo (13).

### **3.3 Diagnóstico de la colitis ulcerosa.**

El diagnóstico de la CU se realiza con los síntomas clínicos combinados con radiológicos, endoscópicos y biomarcadores no invasivos (17). Los síntomas son diarrea, pujo, tenesmo rectal, pérdida de peso, fiebre y dolor abdominal (18). Los estudios paraclínicos que se deben realizar son una biometría hemática, pruebas de función hepática, examen coprológico, cuantificación de proteína C reactiva y velocidad de sedimentación globular que son marcadores séricos de respuesta inflamatoria (6). Se sugiere la determinación de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo con patrón perinuclear (p-ANCA o su patrón atípico x-ANCA), ya que se ha asociado como predictor de la extensión y manifestaciones extraintestinales como artralgia. En pacientes que están siendo evaluados por dolor abdominal agudo se debe realizar una placa simple de abdomen y tele de tórax, así como una tomografía computarizada (TAC) en pacientes con sospecha de megacolon tóxico o perforación (18).

Para realizar el diagnóstico histológico, es necesario realizar múltiples biopsias de al menos 6 segmentos del colon: íleon terminal, ascendente, transverso, descendente, sigmoides y recto. Estas deben ser tomadas de sitios con actividad y sin actividad endoscópica evidente.

Los hallazgos histopatológicos sugestivos de la CU son: distorsión de la arquitectura de las criptas (figura 2), infiltrado linfoplasmocitario en la lámina propia, presencia de criptitis, abscesos de cripta, así como disminución de las células caliciformes (19).



**Figura 2. Evaluación histológica a bajo aumento del grado de inflamación y alteraciones arquitecturales de colitis ulcerosa (H&E 20x).** La flecha punteada señala una cripta ramificada, la flecha pequeña señala la aparición pseudovillosa (19)

### 3.4 Riesgo de cáncer colorrectal en la colitis ulcerosa.

El riesgo de cáncer colorrectal (CCR) en pacientes con CU está incrementado en comparación con la población general (20). El riesgo se asocia con la duración y con el grado de actividad de la enfermedad (21). Algunos estudios reportan que a 30 años el riesgo acumulado de CCR va del 7 al 18% y reciente se ha mostrado que la colonoscopia de vigilancia tiene impacto en el riesgo de CCR (21).

### 3.5 Tratamiento de la colitis ulcerosa.

El tratamiento de la CU implica terapia farmacológica o quirúrgica, éste último para los casos más graves. El ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) es el primer paso en el tratamiento de la CU, un 15% de la población con CU no responden y presentan efectos adversos como son mayor dolor abdominal, náuseas, diarrea, cefalea, deterioro clínico de la CU, irritación de la piel y trombocitopenia (17). El siguiente paso del manejo son corticoesteroides orales o sistémicos, este tipo de medicamentos no se pueden administrar a largo plazo debido a sus efectos adversos (glaucoma, retención de líquidos, problemas cognitivos, síndrome de Cushing) (22). De persistir con CU se implementan fármacos inmunomoduladores (azatioprina, mercaptopurina y tofacitinib). Un 30 a 40% no responden y un 10 a 20% no tolera el tratamiento por efectos adversos (intolerancia digestiva, pancreatitis, fiebre, artromialgias, exantema y hepatotoxicidad), además se ha relacionado el desarrollo de neoplasias con su administración (23,24). Existen cuatro fármacos (anticuerpos monoclonales) contra el TNF- $\alpha$ , los cuales son infliximab, adalimumab, certolizumab pegol y el golimumab, sin embargo en pacientes con EII se han informado tasas de falta de respuesta primaria que varían aproximadamente 10% a 75% (25), y sus efectos secundarios van de infecciones respiratorias leves (rinitis, sinusitis) hasta insuficiencia cardíaca (26).

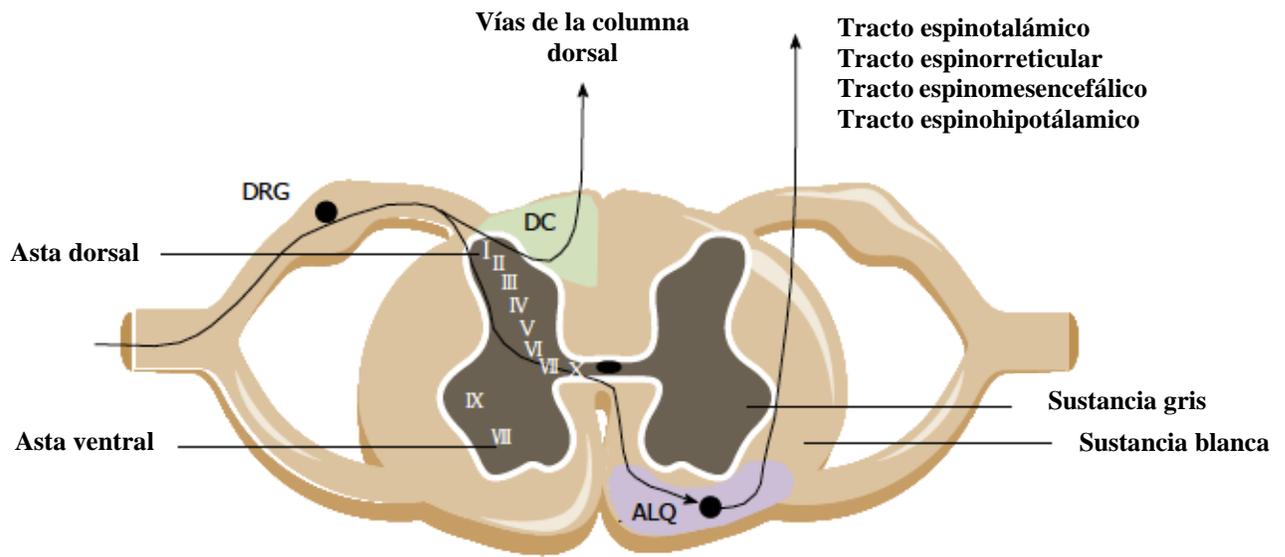
El síntoma más debilitante para los pacientes con CU es el dolor abdominal que presenta episodios de agudización y recurrencia. Este dolor visceral es difícil de tratar con eficacia, debido a que sus causas no son bien entendidas, y como resultado los tratamientos comunes como el uso de espasmolíticos (mebeverina, bromuro de hioscina), antidepresivos tricíclicos (amitriptilina, doxepina) y fármacos opioides (tramadol) pueden ser ineficientes. El uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) se indica en el tratamiento de la CU, generando disrupción de la barrera epitelial del intestino afectando la interacción entre el microbioma y las células inmunes del intestino lo que aumenta el riesgo de recaídas en los pacientes con CU (17). La falta de una respuesta adecuada puede conducir a escalada de dosis (tolerancia), con sus efectos secundarios concomitantes, como náusea, somnolencia, estreñimiento, y paradójicamente estos medicamentos pueden empeorar el dolor (síndrome del intestino narcótico o hiperalgesia gastrointestinal inducida por opiáceos) (27). Estas deficiencias de tratamiento para el dolor abdominal crónico representan un desafío común para los médicos.

### **3.6 Bases neurobiológicas del dolor visceral**

El dolor crónico visceral es uno de los trastornos más frecuentes y debilitantes de la población en general, e impacta de forma crítica la economía y la calidad de vida de los pacientes (28). Los trastornos gastrointestinales funcionales son la causa de la forma más prevalente de dolor visceral. Por ejemplo, el 50-70% de los pacientes con CU manifiestan dolor visceral como uno de los primeros síntomas (29). La fisiopatología precisa de dolor visceral crónico se desconoce. Sin embargo, estudios recientes indican que este trastorno podría estar asociado con una desregulación en múltiples niveles del eje cerebro-intestino y podría involucrar tanto al Sistema Nervioso Central y Sistema Nervioso Periférico (30). De acuerdo con la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés), la nocicepción, es el proceso neural mediante el cual se codifican y procesan los estímulos potencialmente dañinos. Las terminaciones nerviosas libres periféricas de las neuronas sensoriales o aferentes que inician la sensación de dolor se denominan ‘receptores de dolor’ o nociceptores. Los nociceptores pueden ser activados por estímulos mecánicos (distensión, estiramiento) y químicos (isquemia, inflamación). Para abordar el estudio del dolor visceral a nivel colónico se debe comprender las bases neurobiológicas de la organización central y periférica de la inervación sensitiva visceral.

### **3.7 Inervación sensitiva periférica y central del colon**

La organización anatómica de la inervación sensitiva visceral del colon comienza en el tracto gastrointestinal, los nociceptores están localizados en las capas de la mucosa, submucosa y muscular transmitiendo la sensación de dolor principalmente por fibras aferentes A $\delta$  finamente mielinizadas y fibras C, estas últimas neuronas son polimodales debido a su conducción lenta responde a estímulos térmicos, mecánicos y químicos (31). Los cuerpos celulares de las fibras aferentes medulares viscerales están situados en los DRG (32), estos cuerpos celulares se pueden abordar por diferentes técnicas para estudiar los cambios en la colitis aguda. La transmisión del dolor visceral se proyecta hacia las neuronas de segundo orden en las láminas I, II, V y X de la sustancia gris de la asta dorsal de la médula espinal, desde donde se transmite la información a estructuras supramedulares por la vía espinotalámica contralateral (33) (Figura 3).

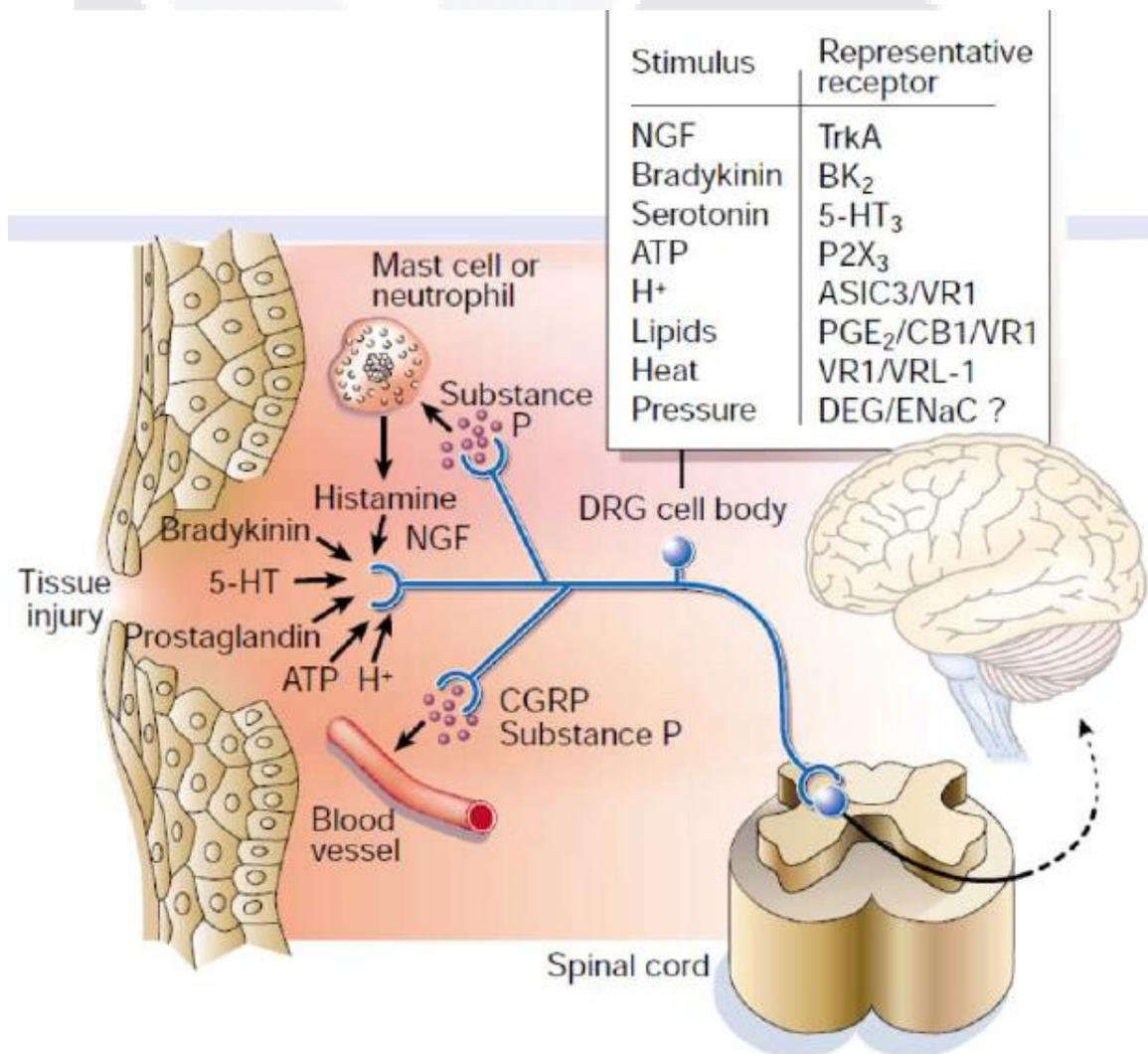


**Figura 3. Sección transversal de la médula espinal.** Las fibras aferentes viscerales que inervan el colon viajan a través de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) y se proyectan en las neuronas de segundo orden en las láminas I, II, V y X de la sustancia gris de la asta dorsal de la médula espinal. Las vías ascendentes surgen en el cuadrante anterolateral (ALQ, zona morada) y en la región de la columna dorsal (DC, zona verde) en la médula espinal y se proyectan hacia los centros cerebrales superiores (33).

La mayoría de los pacientes con brotes agudos de la CU, experimentan dolor abdominal. Sin embargo, la inflamación persistente y severa no es suficiente para explicar el dolor en estos pacientes, ya que aproximadamente el 20% de los pacientes en remisión clínica y endoscópica, es decir en pacientes que no tienen signos clínicos de inflamación, siguen experimentando la sensación de dolor abdominal. Esto se debe a que la continua liberación de mediadores proinflamatorios durante los brotes de la enfermedad puede causar la sensibilización periférica de las neuronas aferentes que transmiten el dolor visceral resultando en una sensibilidad alterada y dolor abdominal (31), el cual no solamente está presente durante los brotes agudos de la inflamación sino también durante una fase de remisión (34).

### 3.8 Sensibilización periférica

La IASP define la sensibilización periférica como una mayor capacidad de respuesta y umbral reducido de las neuronas nociceptivas en la periferia a la estimulación de sus campos receptivos. Las neuronas sensoriales expresan una gran variedad de receptores que son activados por mediadores liberados de varias fuentes celulares dentro de la pared intestinal (33,38,39). Muchos mediadores se liberan durante la inflamación, las lesiones y la isquemia, a partir de plaquetas, leucocitos, linfocitos, macrófagos, mastocitos, glía, fibroblastos, vasos sanguíneos, músculos y neuronas (40) (Figura 4).



**Figura 4. Mecanismos que subyacen a la sensibilización.** Los factores luminales y los mediadores liberados en respuesta a isquemia, lesiones e inflamación actúan sobre las terminaciones sensoriales que impulsan la sensibilización. la activación de los nociceptores produce la liberación de péptidos y neurotransmisores que contribuyen más a la respuesta inflamatoria. Ejemplo de estas sustancias y sus receptores representativos se indican en la tabla de la imagen. Julius (2001) (38).

Dichos mediadores pueden ser prostaglandinas, proteasas, citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), aminas (Histamina, Serotonina), purinas (ATP, Adenosina), prostanoides (Ácido araquidónico), generan su acción en los terminales nerviosos sensoriales produciendo un incremento de la sensibilidad a los estímulos químicos y mecánicos (denominada "plasticidad") (42). El resultado de esta sensibilización periférica es que la sensibilidad al dolor se ve aumentada, fenómeno conocido como hiperalgesia. De tal manera, que el paciente con hiperalgesia tiene umbrales de dolor más bajos, de modo que estímulos que no resultarían muy dolorosos para la mayoría de las personas, para estos pacientes son muy dolorosos, tal es el caso para los pacientes con EII. La hiperalgesia es una característica de los estados de dolor crónico (43).

### **3.9 Sensibilización central**

La IASP define a la sensibilización central como la mayor capacidad de respuesta de las neuronas nociceptivas en el sistema nervioso central a su entrada aferente normal o subliminal. Aunque la sensibilización central se desencadena en las neuronas de la asta dorsal por la actividad en los nociceptores, los efectos se generalizan a otras aferencias que se originan en mecanorreceptores de bajo umbral (44). Así, los estímulos que bajo condiciones normales no causan dolor activan neuronas de segundo orden en la asta dorsal que reciben aferencias nociceptivas, y dan origen a una sensación de dolor (45). La inducción de dolor por un estímulo no doloroso se denomina alodinia (42), lo que explicaría por qué los pacientes con EII sienten dolor tras el paso del bolo alimenticio al tracto gastrointestinal.

### **3.10 Role del TNF- $\alpha$ y ATP en la colitis aguda**

El TNF- $\alpha$  es una citocina proinflamatoria, que se involucra en situaciones de dolor (43), en la EII, EC y CU se presenta un incremento de la triptasa de los mastocitos y un aumento en el número de mastocitos a nivel de la lámina propia y submucosa que se acompaña de una elevación de la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-16 y sustancia P (SP) (44). La activación de los receptores de TNF- $\alpha$  en las neuronas nociceptivas del DRG aumenta la excitabilidad de estas, lo cual indica que el TNF- $\alpha$  es un mediador clave en la nocicepción (30). De hecho, numerosas evidencias sugieren que el TNF- $\alpha$  tiene un rol esencial en la

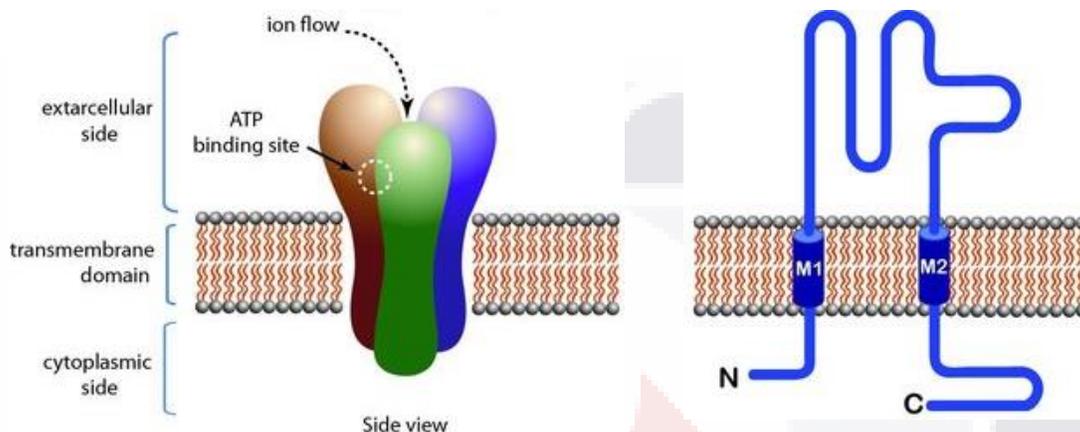
patogénesis del dolor (45) , incluyendo el dolor neuropático (46,47) y el dolor inflamatorio (48,49). Los efectos periféricos del TNF- $\alpha$  sobre la sensibilización periférica han sido bien documentados. Por ejemplo, inyecciones intraplantares, intradérmicas o intramusculares de TNF- $\alpha$  inducen hiperalgesia térmica y mecánica (38), y puede inducir actividad espontánea en las neuronas de los DRG (49). Además, se ha demostrado que el TNF- $\alpha$  modula la actividad de múltiples canales iónicos, incluyendo el receptor a capsaicina, TRPV1 (receptor de potencial transitorio V1) y los canales de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje (50, 51), y de este modo incrementar la vía de señalización del dolor de un amplio rango de estímulos sensoriales.

El ATP extracelular es un mediador inflamatorio que ejerce un efecto destacado en algunos estados de dolor (52). Durante un proceso de inflamación aguda concentraciones altas de ATP extracelular han sido medidas en el sitio del tejido lesionado en animales experimentales (53). Por lo que, el ATP extracelular ha sido establecido como una molécula clave en la nocicepción. Al respecto, se ha observado que la administración de ATP exagera la inflamación durante la colitis experimental (54). Los receptores de ATP o receptores purinérgicos, incluidos P2X y P2Y se expresan en neuronas sensoriales primarias (55). Tanto el TNF- $\alpha$  como el ATP son mediadores liberados durante la inflamación y en la colitis experimental, pero se desconoce si el TNF- $\alpha$  modula los receptores P2X a nivel de los DRG.

### **3.11 Generalidades sobre los receptores purinérgicos P2X**

Los receptores P2X son canales iónicos de membrana activados por ATP extracelular. Su activación tras la unión de ATP a su sitio de unión causa la apertura de un canal selectivo a cationes (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>). Se han identificado, hasta la fecha, siete subunidades P2X diferentes, denominadas P2X1 a P2X7, que se ensamblan para dar lugar a canales funcionales (56). Cada subunidad muestra una estructura molecular similar consistiendo en dos dominios transmembranales (TM1 y TM2) unidos por un asa extracelular hidrofílica, mientras que sus grupos amino (-NH<sub>2</sub>) y carboxilo (-COOH) terminales son intracelulares. El dominio TM1 es responsable de la compuerta del canal y el dominio TM2 forma el poro del canal. El asa extracelular se sugiere que está involucrada en la unión de dos moléculas de ATP, así como en la estructura terciaria de la proteína, ya que se encuentran conservados 10 residuos de

cisteínas, que al ser oxidados forman puentes disulfuros (S-S) (Figura 5) (57). Todas las subunidades P2X tienen una secuencia consenso para glicosilación (Asn-X-Ser/Thr), y algunas glicosilaciones son esenciales para el tráfico de los receptores a la superficie de la membrana celular (58). La estructura molecular de un receptor P2X es probablemente como trímero. Dichos trímeros pueden estar compuestos de la misma subunidad o diferentes subunidades formando receptores homoméricos o heteroméricos, respectivamente.



**Figura 5. Estructura molecular de los receptores P2X.** Los dominios transmembranales TM1 y TM2 unidos por un asa extracelular hidrofóbica, sus grupos amino (NH<sub>2</sub>) y carboxilo (COOH) terminales son intracelulares (60).

El co-ensamblamiento de las subunidades P2X se ha estudiado en modelos de expresión heteróloga, de tal forma que se ha podido obtener información acerca de cuáles son las subunidades que se co-ensamblan. Por ejemplo, en estos estudios, todas las subunidades pueden formar homómeros, excepto la subunidad P2X6, la cual solo se combina con otras subunidades. También se ha determinado la existencia de receptores heteroméricos como son P2X1/2, P2X1/4, P2X1/5, P2X2/3, P2X2/6, P2X4/6, (6, 58) y P2X4/7 (59). La combinación de algunas subunidades resulta en canales con propiedades fisiológicas y farmacológicas distintas a las observadas en cada canal expresado de manera individual. De los siete receptores P2X identificados, el receptor P2X3 es de interés particular en el contexto de las vías del dolor.

### **3.12 Implicación de los receptores P2X3 en la colitis**

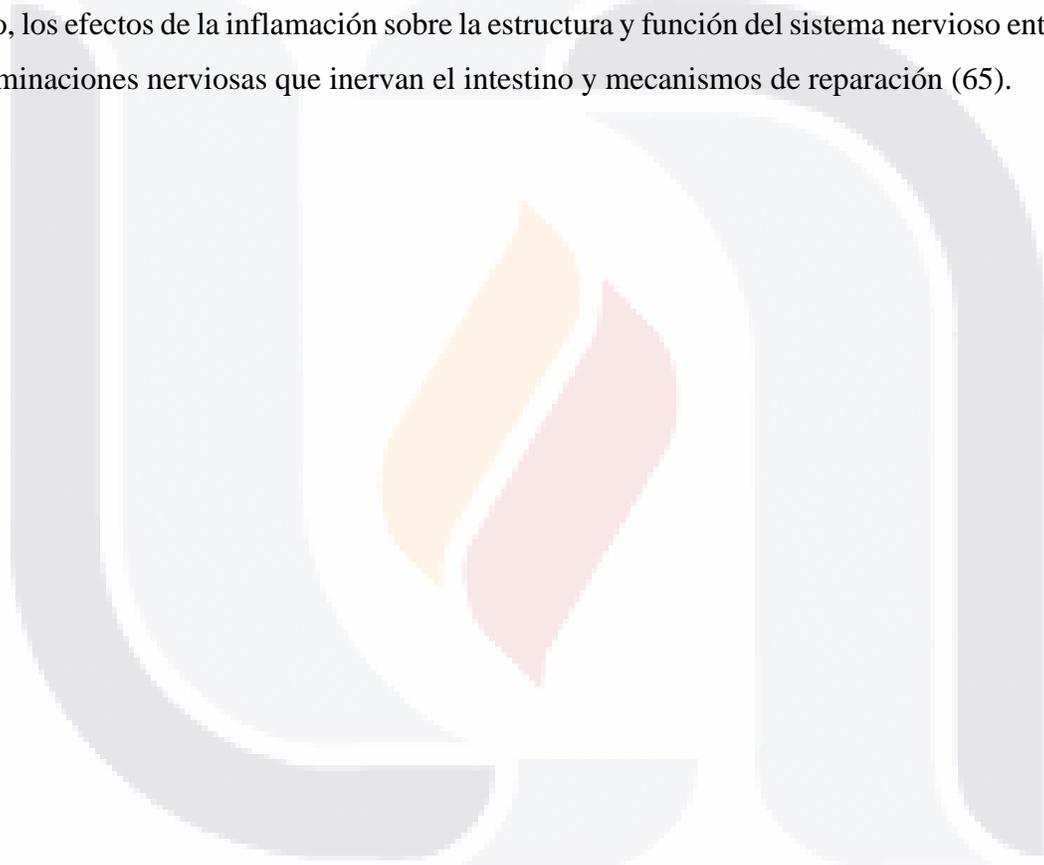
El receptor P2X3 es un canal catiónico de rápida desensibilización y están altamente expresados en neuronas de los DRG, preferencialmente sobre neuronas pequeñas, que se consideran neuronas sensoriales nociceptivas tipo C (60,61). Estos receptores parecen mediar respuestas de dolor anormales después de una inflamación y lesiones nerviosas (9). Por ejemplo, se ha demostrado que la activación de los receptores P2X3 homoméricos o receptores P2X2/3 heteroméricos por ATP endógeno es esencial para desarrollar hiperalgesia durante inflamación (10). Además, se ha observado un incremento en la expresión de estos receptores en el colon inflamado de pacientes con enfermedades intestinales inflamatorias (11). Así mismo, también se ha demostrado que el receptor P2X3 modula la hiperalgesia visceral durante una colitis aguda y aún después de que la inflamación ha sido remitida (12). Por otro lado, se ha demostrado que la aplicación de un agonista selectivo para P2X3,  $\alpha\beta\text{meATP}$ , aumenta la sensación de dolor agudo inducida por la inyección de la prostaglandina (PG) E2, bradiquinina o formalina (62,63). Por tal motivo, actualmente los receptores P2X3 son un objetivo interesante en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de dolor neuropático e inflamatorio. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen la función esencial de los receptores P2X3 en el desarrollo de hiperalgesia durante la colitis no son claros.

### **3.13 Modelos animales de EII y su aplicabilidad**

Actualmente se han propuesto diferentes modelos experimentales de colitis, que demuestran diversas respuestas clínicas, histológicas e inmunes características de la colitis ulcerosa (64). En la tabla 1 se muestran los modelos más utilizados.

Los modelos químicos en el estudio de la EII son más rápidos de desarrollar y son de bajo costo. Los químicos utilizados son dextrano sulfato de sodio (DSS), el ácido sulfónico trinitrobenceno (TNBS) y el ácido sulfónico de dinitrobenceno (DNBS) (63). La inducción de colitis aguda con haptenos DNBS o TNBS instilado rectalmente sensibiliza la mucosa, diluidos en diferentes concentraciones de etanol, este destruye la barrera de la mucosa del colon y genera entrada de estos haptenos en la lámina propia, haptениzando las proteínas microbianas intestinales y del colon traduciéndolas en inmunogénicas, dando una respuesta

inmunitaria innata, adaptativa e inflamación intestinal, produciendo diarrea severa, pérdida de peso, sangrado, dolor, simulando la colitis aguda (64). En comparación con DNBS, el TNBS es peligroso debido a sus propiedades altamente oxidativas que pueden presentar un riesgo de explosión al entrar en contacto con bases como el hidróxido de sodio y potasio. Por lo tanto, DNBS se considera actualmente como una opción preferida de producto químico sobre TNBS para inducir colitis. En los roedores, la colitis por DNBS se considera uno de los métodos más convenientes para estudiar aspectos fisiopatológicos de la EII debido que permite estudiar los efectos de la depresión y estrés sobre la reactivación de la colitis. Así como, los efectos de la inflamación sobre la estructura y función del sistema nervioso entérico o terminaciones nerviosas que inervan el intestino y mecanismos de reparación (65).



**Tabla 1. Características de los modelos animales inducidos en EII (65)**

Características de los modelos animales inducidos en EII								
Ac. acético	Inmunocomplejos	TNBS/Etanol	Oxazolona	PG-PS	Carragenina	DSS	Ciclosporina	Indometacina
Enema	Enema/I.V.	Enema	Enema	Intra-mural	Oral	Oral (ciclos)	S.C.	S.C./oral
Rata, ratón, conejo, cobayo	Conejo, rata	Rata, ratón, conejo	Rata, ratón	Rata	Rata, ratón, cobayo	Rata, ratón, hámster	Ratón	Rata, ratón, perro
Fase aguda hasta 3 días post-inducción	Fase aguda hasta 3 días post-inducción	Fase aguda hasta 3 días post-inducción	Fase aguda hasta 3 días post-inducción	Fase aguda hasta 3 días post-inducción	3-6 semanas	7-10 días	2 semanas	2-3 días
Fase crónica: No	Fase crónica: No	8 semanas (ratas) 2-3 semanas (ratón)	Fase crónica: No	1-3 semanas	Fase crónica: No	2-3 semanas (12 semanas)	1-4 semanas	7-10 días (R. Fisher) 11 semanas (R. Lewis)
Mucosa transmural	Mucosa > submucosa	Transmural (granulomas)	Mucosa > submucosa	Transmural	Mucosa y submucosa	Mucosa y submucosa	Transmural	Transmural
Lesión por ácido orgánico	Activación por complemento	Reacción de hipersensibilidad retardada por alérgenos	Reacción de hipersensibilidad por contacto	Activación de macrófagos y células T	Erosión epitelial con disfunción de macrófagos	Erosión epitelial con disfunción de macrófagos	Activación de células T	Inhibición de la síntesis de PGE2 y PGI2
Valores elevados de IL-1, LTB4, PGE2, TXB2, ON, histamina, PAF	Valores elevados de IL-1, IL-1R, LTB4, PGE2	Valores elevados de IL-1, IL-6, IL-12, IFN, TNF, PGE2, LTB, ON	Valores elevados de IL-4 y IL-5	Valores elevados de PGE2, ON, IL-1, IL-6, IGF1 y 1kB	Valores elevados de PGE2 y TXB2	Valores elevados de PGE2, TXB2, IL-2, IL-4 y IL-6	Valores elevados de IFN, IL-1, TNF	
Influencia bacteriana: No	No	Sí (etapas de cronificación)	?	Sí	Sí	Sí	?	Sí (etapas de cronificación)
Reproducibilidad: 100%	90%	90-100% (ratas) 60-80% (ratón)	?	80-95%	90%	100%	?	90-100%
Características	CU	EC	CU	EC	CU	CU	CU	EC

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Existen evidencias suficientes que demuestran que el receptor P2X3 está presente en neuronas sensoriales de los DRG y que además están involucrados en la sensación de dolor visceral. Dichas evidencias sugieren que durante una colitis ulcerativa la liberación de mediadores proinflamatorios podría inducir cambios en las propiedades electrofisiológicas, farmacológicas y/o moleculares de los receptores P2X3 en las neuronas del DRG, y de este modo interrumpir o distorsionar su respuesta y/o su transmisión de la señal, lo cual podría estar sustentando, en parte, la hiperexcitabilidad de las fibras del dolor durante el proceso inflamatorio. Los datos obtenidos van a contribuir a un mejor entendimiento de los mecanismos involucrados en la modulación de los receptores purinérgicos en condiciones fisiopatológicas como son los procesos inflamatorios. Además, tal conocimiento, puede potencialmente dar lugar a un paradigma de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento del dolor visceral en la colitis ulcerativa.

## **5. HIPÓTESIS**

La liberación de mediadores proinflamatorios durante la colitis experimental modula la actividad del receptor P2X3 induciendo un aumento en la excitabilidad de las neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal que inerva el colón

## **6. OBJETIVO GENERAL**

Determinar si los mediadores proinflamatorios liberados durante la colitis experimental aguda modulan directamente los receptores P2X3 que inducen la hiperexcitabilidad de las neuronas sensoriales de los DRGs.

## **7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Establecer un modelo experimental en ratón de colitis aguda inflamatoria intestinal con DNBS y evaluar la severidad de la colitis.
- Evaluación del daño histopatológico en ratón de colitis aguda inflamatoria intestinal con DNBS.
- Definir cuáles son los mediadores proinflamatorios expresados mayormente durante la colitis experimental en tejidos colónicos de ratón.
- Determinar los efectos de la colitis experimental sobre la excitabilidad de las neuronas sensoriales de los DRGs.
- Determinar el efecto modulador de estos mediadores proinflamatorios sobre los receptores P2X3 en cultivos primarios de neuronas de los DRGs de ratón.
- Determinar el efecto de la colitis experimental sobre la expresión proteica del receptor P2X3.

## 8. METODOLOGÍA

### 8.1 Tipo y diseño general de estudio.

Se realizó un estudio experimental, longitudinal y prospectivo. En la **tabla 2** se muestran las variables y definiciones conceptuales y operacionales.

**Tabla 2. Variables, definiciones conceptuales y operacionales.**

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Clasificación de variable de acuerdo con su escala de medición	Indicadores	Dimensión o nivel de medición	Codificación y unidad de medida
Peso corporal	Magnitud física que designa la masa corporal	Masa corporal del ratón medida por una báscula calibrada en gramos	Cuantitativa continua	Gramos	Proporción	Peso en gramos
Tiempo	La dimensión del universo físico que, en un determinado lugar, ordena la secuencia de los acontecimientos	Días calendario a partir del inicio de cada experimento	Cuantitativa discreta	Días	Intervalo	De 0 a 4 días
Consistencia de las heces	Cualidad de la materia fecal que resiste sin romperse ni deformarse refleja el estado de salud intestinal	Escala valida de Melgar et al, (2005) (1).	Cualitativa ordinal	N/A	Intervalo	0 Heces duras 1 Heces pastosas 2 Heces aguadas 3 Diarrea líquida
Sangre fecal o anal visible	Sangre en las heces o sangre visible en la zona perianal del ratón	Determinación de sangre oculta por Hema-screen (immunostics, inc, USA).	Cualitativa ordinal	N/A	Intervalo	0 Normal (sin sangre) 1 Un poco sangrientas 2 Adherencia de sangre alrededor del ano 3 sangrado a través del ano
Daño macroscópico	Determinación del puntaje de daño macroscópico en la mucosa colónica del ratón.	Escala valida de Melgar et al, (2005) (1).	Cualitativa ordinal	N/A	Intervalo	0 Normal 1 Leve inflamación 2 Moderada inflamación y/o edema 3 Intensa inflamación y/o ulceración y/o edema
Daño microscópico	Determinación del puntaje de	Escala valida	Cualitativa ordinal	N/A	Intervalo	0 Normal

	daño microscópico en la mucosa colónica del ratón.					1 Leve inflamación 2 Moderada inflamación y/o edema 3 Intensa inflamación y/o ulceración y/o edema
Factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ )	Citocina proinflamatoria, que se involucra en situaciones de dolor	PCR	Cuantitativa discreta	% control	Razón	0-1
Interleucina 6 (IL-6)	Citocina que forma parte de la cascada inflamatoria	PCR	Cuantitativa discreta	% control	Razón	0-1
Interleucina 1- $\beta$ (IL1- $\beta$ )	Citocina mediadora de respuesta inmunitaria e inflamatoria	PCR	Cuantitativa discreta	% control	Razón	0-1
Intensidad total de fluorescencia del receptor P2X3	Determinación del nivel de fluorescencia celular	Inmuno-histoquímica utilizando la fórmula para calcular la fluorescencia celular total corregida (CTCF)	Cuantitativa discreta	% control	Razón	0-1
Cuantificación de la proteína p2x3	Cuantificación de proteína por electroinmuno-transferencia	Western Blot	Cuantitativa discreta	% control	Razón	0-1
Excitabilidad de las neuronas DRG	Medición del potencial eléctrico de las neuronas DRG	Patch clamp	Cuantitativa discreta	pA	Razón	-60 a 20

## 8.2 Universo de trabajo

Ratones C57BL6 machos y hembras de un peso promedio de 15 a 20 g proporcionados por el bioterio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Los ratones se resguardaron en el bioterio del edificio 23 de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, en condiciones controladas de temperatura (22-24 °C) y ciclos de luz-obscuridad de 12 por 12 horas, humedad del 55%  $\pm$  10%, alimento estándar y agua potable *ad libitum*.

### **8.3 Tipo de muestreo, selección y tamaño de muestra.**

Se realizó un muestreo no probabilístico de cuota con ratones C57BL6. Los experimentos se realizaron en el laboratorio de electrofisiología edificio 23 de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Para la selección de grupos se dividieron aleatoriamente los ratones.

### **8.4 Establecimiento del modelo de colitis aguda en ratones C57BL6 con ácido sulfónico de dinitrobenceno (DNBS).**

Los ratones C57BL6 machos y hembras (15-20 g) se mantuvieron en el bioterio en condiciones controladas de temperatura (22-24°C) y ciclos de luz-obscuridad de 12-12 horas con alimento y agua potable *ad libitum*. Todos los animales se trataron conforme a la normativa institucional (NOM-062-ZOO-1999). La colitis aguda se indujo mediante la administración intrarectal de 2-6 mg de DNBS en 100 µl de etanol al 50% v/v. Los ratones control (sin colitis) recibieron solamente el etanol al 50% v/v. Para la administración intrarectal los ratones se anestesiaron con 1.5% de isoflurano, para evitar sufrimiento. Una vez anestesiado el ratón se le insertó un catéter de polietileno (PE-50) por el recto aproximadamente 3 cm dentro del colon. Los animales se mantuvieron en observación durante 4 días después de inducir la colitis.

### **8.5 Evaluación de la severidad de la colitis**

Para discernir la gravedad de la inflamación causada por DNBS, se registraron diariamente los siguientes parámetros: peso corporal, consistencia de las heces y sangre fecal. Se determinó que la diferencia entre los pesos diarios registrados y el peso corporal inicial (antes de la administración de DNBS, tomado como el 100 % del peso) como el % de pérdida de peso inducida por la colitis. Se determinó la consistencia de las heces (consulte la **Tabla 3**) y la sangre fecal se detectó utilizando tiras de prueba de detección de Hema.

**Tabla 3. Puntaje de diarrea y sangrado rectal (66)**

<b>Puntaje</b>	<b>Consistencia de las heces</b>	<b>Sangre fecal</b>
0	Duras	Normal sin sangre
1	Pastosas	Sangre oculta
2	Aguadas	Adherencias de sangre alrededor del ano
3	Diarrea líquida	Sangrado a través del ano

Cuatro días después de la inducción de colitis, se sacrificaron los ratones, se obtuvo el colon distal, se diseccionó, se enjuagó con PBS frío y se fotografió para análisis posteriores de daños en la superficie serosa de acuerdo con los criterios validados descritos por Morris et al (1989) (67), donde 0 = sin sangrado, sin úlceras ni edema; 1 = hemorragia leve, edema leve o erosión mucosa leve; 2 = edema moderado, úlceras o erosiones sangrantes; 3 = ulceración severa, erosiones, edema, necrosis tisular y perforación. Los análisis de daño (puntuación) fueron realizados por dos individuos independientes ciegos en cuanto al tratamiento de los ratones. El colon disecado se dividió en dos segmentos de 1 cm y se usó como sigue.

La primera sección de colon se fijó en formalina al 10 % durante 24 horas (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EE. UU.), se deshidrató en alcoholes graduados, se aclaró en xileno y se embebió en parafina. Las secciones transversales de colon (7 µm de espesor) teñidas con hematoxilina y eosina (H & E) se visualizaron bajo un microscopio óptico (Axioscope 140 40, Carl Zeiss, Alemania) y se fotografiaron para su análisis histopatológico.

El segundo segmento de colon se utilizó para aislar el ARN total y se determinaron los niveles de expresión, mediante RT-PCR semicuantitativa, de los siguientes transcritos: factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-α), interleucina-1beta (IL- 1β) e interleucina-6 (IL-6).

## 8.6 Análisis de la expresión génica de citocinas proinflamatorias

Usando el método de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), se extrajo el ARN total de secciones de colon diseccionadas de 1 cm. Se cuantificó el ARN y se transcribió reversamente 1 µg con el kit iScript (Biorad, Hercules CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A partir de esto, se amplificó 1 µl de cDNA/25 µl de volumen de reacción que contenía: Buffer de PCR 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, oligo sentido e inverso 0,2 mM y 0,5 U DNA Taq Polimerasa (Life Technologies, Texas, EE. UU.). La transcripción de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se usó como control interno, y la expresión de las citocinas se normalizó con éste. Cada amplificación del transcrito se realizó por triplicado, y los resultados mostrados son el promedio de estas tres amplificaciones. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 3 min desnaturalización a 94°C, 35 ciclos de amplificación (desnaturalización: 30 s a 95°C; alineamiento: 30 s a 55°C; y extensión: 30 s a 72°C). Después de completar el ciclo final, las muestras se incubaron durante un período adicional de 5 min a 72 °C para la elongación terminal. Todos los oligos se adquirieron de Integrated DNA Technologies, sus secuencias se enumeran en la **Tabla 4**.

Se separó un total de 5 µl de cada producto de PCR en un gel de agarosa al 1,5 %, se tiñeron con bromuro de etidio al 0,1 %, se fotodocumentaron (miniBis Pro, DNR Bio-177 Imaging System) y se determinó la densitometría de la banda visible usando Imagen Software J 1.43 (NIH). Como se mencionó anteriormente, todos los productos fueron normalizados con el control de GAPDH.

**Tabla 4. Secuencias de oligos utilizadas en ensayos de RT-PCR en tejido colónico y sus longitudes de producto esperadas en pares de bases (pb)**

Gen	Secuencia (5'-3')	Temp alinamiento(°C)	bp
GAPDH	F - CCA TCA CCA TCT TCC AGG AG	55	576
	R - CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG		
TNF-α	F - AAC TAG TGG TGC CAG CCG AT	50	334
	R - CTT CAC AGA GCA ATG ACT CC		
IL-1β	F - TGA TGA GAA TGA CCT CTT CT	55	251
	R - CTT CTT CAA AGA TGA AGG AAA		

### **8.7 Registros electrofisiológicos mediante la técnica de Patch Clamp**

Para los registros electrofisiológicos se utilizaron cultivos primarios de neuronas de los DRG T8-L1 cuyas terminaciones nerviosas inervan el colon de ratones control y tratados con DNBS (32). Para evaluar la excitabilidad de las neuronas se midió la reobase, que es la mínima corriente necesaria para disparar un potencial de acción, y el número de potenciales de acción a dos reobases, mediante la técnica de patch clamp en su configuración de célula completa usando parche perforado con anfotericina B (0.24 mg/ml).

El patch clamp es una técnica electrofisiológica utilizada para medir el potencial de membrana y la actividad de los canales iónicos en la membrana celular. La configuración de célula completa se logra después de obtener un sello entre la micropipeta de cristal y los lípidos de la membrana (configuración de célula sellada), con una resistencia mayor a 1 Gigaohm ( $G\Omega$ ). Una vez que se tiene este sello, la anfotericina B agregada a la solución interna de la pipeta comienza a hacer poros en la membrana plasmática de la neurona y así establecer la configuración célula completa.

Únicamente se seleccionaron las neuronas pequeñas ( $<40$  pF), las cuales se sabe que exhiben propiedades nociceptivas (68) y las que tuvieron un potencial de membrana en reposo entre  $-40$  mV y  $-50$  mV. Se usaron pipetas de borosilicato con una resistencia de entre  $2-5$   $M\Omega$  en solución externa, cuya composición fue: NaCl (140 mM), KCl (5 mM),  $MgCl_2$  (1 mM),  $CaCl_2$  (2 mM), 4-(2-Hidroxietil)-1-ácido piperazineetanolsulfónico (HEPES, 10 mM), D-glucosa (10 mM), pH 7.4. La composición de la solución interna de la micropipeta fue: gluconato de potasio (110 mM), KCl (30 mM), HEPES (10 mM),  $MgCl_2$  (1 mM),  $CaCl_2$  (2 mM) pH 7.25. Los cambios en el potencial de membrana se amplificaron con un amplificador Axopatch 200B, digitalizadas con un convertidor Digidata 1440A y registradas en una PC usando el software pClamp® 9 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

## 8.8 Inmunofluorescencia

Después de sacrificar a los animales, los DRGs (T8-L1) de los ratones control y DNBS se diseccionaron e inmediatamente se incluyeron en O.C.T. sobre hielo seco. Las criosecciones (20  $\mu\text{m}$ ) se adhirieron a portaobjetos SuperFrost Plus (Thermo Fisher Scientific), se fijaron durante 1 hora en formalina al 10% fría en PBS 1X, se lavaron 3 veces por 10 minutos en PBS y se permeabilizaron durante 30 minutos en 0.2% de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich). Después de esto, se lavó el exceso de Tritón tres veces por 5 minutos con PBS, y los tejidos se bloquearon durante 2 horas en suero de cabra normal al 10% (ThermoFisher). La incubación con los anticuerpos primarios IB4 (1:500, # de cat. I21412; Thermo Fisher), NeuN (1:500, # de cat. MAB377; Millipore Sigma) y P2X3 (1:500; # de cat. ab10269; Abcam) se realizó durante la noche a 4°C. Finalmente, se realizó una incubación de 1 hora con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor-219 a temperatura ambiente (aproximadamente 21°C). Se visualizó la inmunorreactividad y se capturaron imágenes usando un microscopio confocal Olympus FluoView 1200. El análisis de colocalización se realizó como se describió anteriormente (69). Las muestras de colon de 3 animales separados por grupos de tratamiento (control y DNBS) se procesaron, y en los resultados se presentan imágenes representativas (proyecciones de pilas z).

## 8.9 Análisis de Western blot

Se usó Western blot para examinar la expresión del receptor P2X3 y la expresión de GAPDH en el extracto de proteína neuronal DRG (T8-L1). Se utilizaron un total de cinco ratones por grupo (control frente a DNBS) para la recolección de los DRGs. Los ganglios totales (T8-L1) de cada ratón se combinaron, se congelaron en hielo seco y luego se homogeneizaron en 300  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis (Tris 50 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0 y Triton X-100 al 1 %) suplementados con inhibidores de proteasa (P8340 Sigma-Aldrich®) y fosfatasa (P5726 y D0044 Sigma-Aldrich®). Los homogeneizados se centrifugaron a 14.000 rpm, 15 min a 4°C; el sobrenadante se aisló y almacenó a -80 °C. La cuantificación de las proteínas se realizó con el ensayo de proteínas Micro BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL). Se separó un total de 15  $\mu\text{g}$  de proteína en un SDS-PAGE al 10 % y se transfirió a una membrana de PVDF (Biorad, Hercules CA, 238 EE. UU.) durante toda la noche a 25 V y 4

°C. La unión de anticuerpos no específicos se bloqueó incubando la membrana durante al menos 24 horas con leche descremada en polvo al 5 % en solución buffer Tris 1X que contenía Tween 20 (TTBS). El exceso de leche se eliminó con TTBS 1X y luego se incubaron las membranas con anti-P2X3 (1:1000; Abcam #ab10269) y GAPDH (1:10,000; Cell Signaling) durante toda la noche a 4 °C. El siguiente día, se eliminó el anticuerpo primario, se lavó el exceso con TTBS 1X y luego se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario correspondiente a temperatura ambiente durante 1 hora (1:10,000; Jackson Immunoresearch). Después de la incubación, se lavaron las membranas con TTBS 1X, se detectó la inmunorreactividad con el sustrato Clarity™ Western ECL (BioRad) y se documentó con MicroChemi 4.2 (Bio-imagine Systems). El análisis densitométrico se realizó con el software LI-COR Image Studio.

#### **8.10 Soluciones y reactivos**

El medio F12, FBS, L-glutamina, penicilina, estreptomina, ATP, A-317491, TNF- $\alpha$  humano y todas las sales se adquirieron de Sigma-Aldrich (Toluca, MX). La solución stock de ATP (100 mM) se preparó utilizando agua destilada desionizada y se almacenó a -20°C; estos se diluyeron para obtener la concentración final deseada en solución externa antes de su uso, y se ajustó el pH a 7,4 con NaOH. Las células se incubaron con antagonista del receptor de P2X3, A-317491, 30 min antes de la aplicación de ATP o TNF- $\alpha$ , a menos que se indique lo contrario.

#### **8.11 Análisis estadístico**

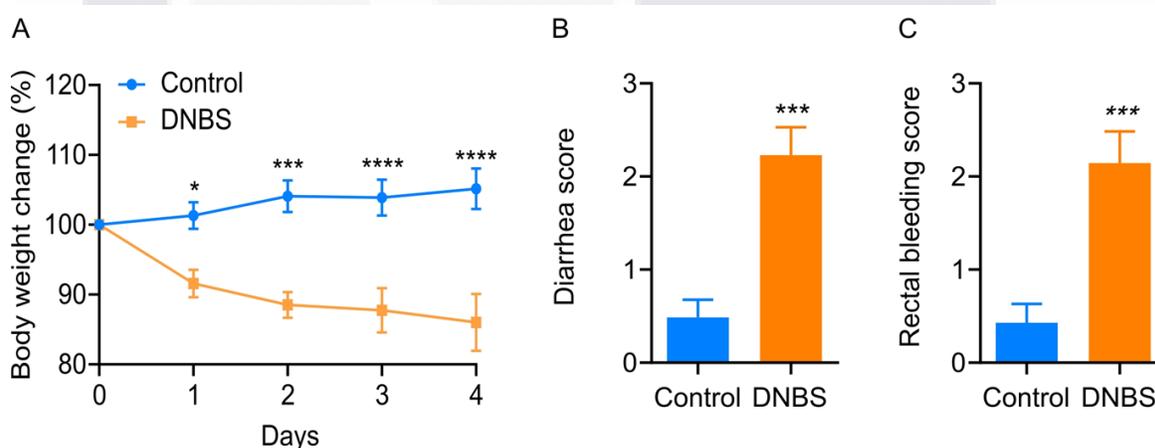
Los valores de los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar de la media (S.E.M.). El número de experimentos realizados se designa como "n". Se usaron células de al menos cinco ratones diferentes para cada protocolo experimental. Para probar las diferencias estadísticas entre dos conjuntos de datos, usamos la prueba *t* de Student no pareada.

Se utilizó ANOVA con la prueba post hoc de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los datos se consideraron estadísticamente diferentes cuando  $P \leq 0.05$  en GraphPad Prism versión 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU.).

## 9. RESULTADOS

### 9.1 Evaluación de la colitis aguda

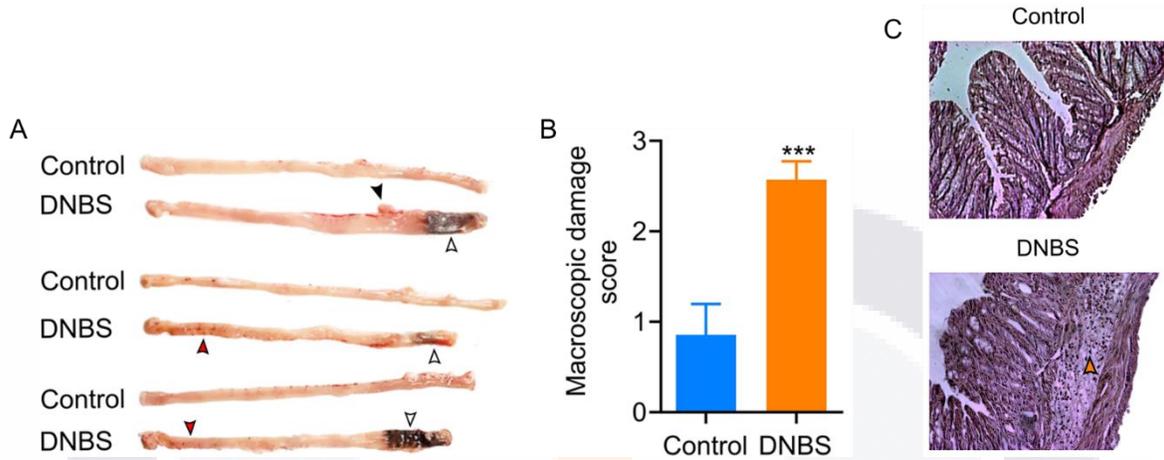
La presencia de colitis generalmente se confirma usando puntajes de pérdida de peso corporal, diarrea, sangrado rectal y daño macroscópico. Como era de esperar, la inducción de colitis produjo una pérdida significativa de peso corporal en el grupo DNBS (Figura 6A), que alcanzó un máximo del 14 % después de cuatro días de inducir colitis. Además, las puntuaciones de diarrea y sangrado rectal fueron significativamente más altas ( $P < 0,001$ ) para el grupo tratado con DNBS que para el grupo de control (Figura 6B y 6C).



**Figura 6. Evaluación de la colitis aguda inducida por DNBS.** (A) Gráfica mostrando los cambios en el peso corporal posteriores a la aplicación de DNBS intrarectal. El cambio de peso corporal se calculó como el porcentaje de la diferencia con respecto al peso corporal inicial. (B) Puntuación de diarrea. (C) Puntuación de sangrado. Los datos se presentan como la media  $\pm$  S.E.M,  $n = 7$  por grupo. La administración de DNBS se asoció con una disminución significativa del peso corporal y aumento en la puntuación de diarrea y sangrado. \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$  y \*\*\*\*  $P < 0,001$ . Para el cambio de peso corporal, el análisis estadístico fue ANOVA de dos vías seguido por una prueba post hoc de Bonferroni. Para las puntuaciones, el análisis estadístico fue una prueba de  $t$ -student para datos no pareados. ESPAÑOL

Cuatro días después de la aplicación de DNBS, se sacrificaron a los ratones y se diseccionaron, se inspeccionaron y procesaron sus intestinos gruesos. La inspección visual del colon reveló erosiones, adherencias, pérdida del grosor de la pared del colon y hemorragia petequeal en todos los animales tratados con DNBS (Figura 7A), lo que resultó en una puntuación de daño macroscópico 2.9 veces mayor en los ratones tratados con DNBS, en comparación con los ratones controles ( $P = 0,001$ ; Figura 7B). Además, el análisis histológico del colon distal reveló erosiones epiteliales ocasionales e infiltración extensa de células

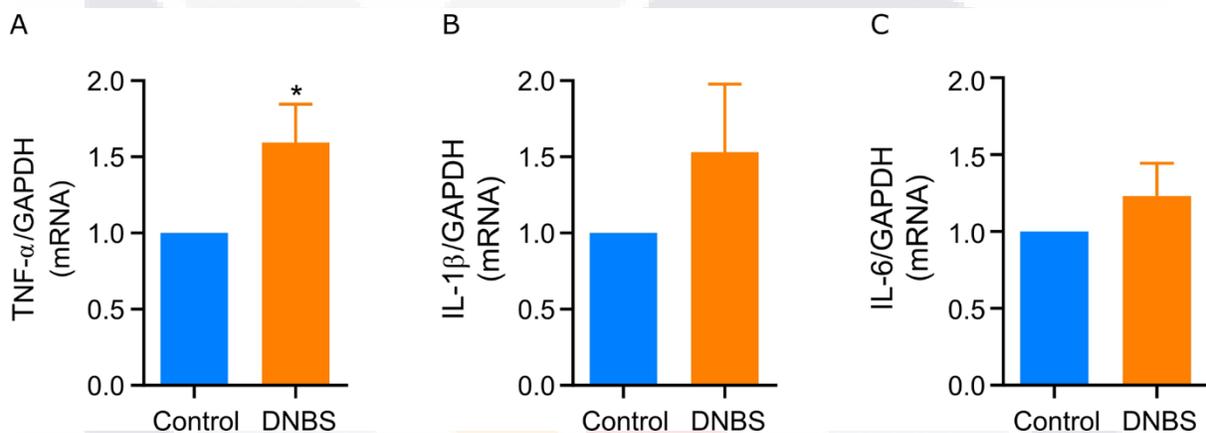
inmunitarias en los tejidos colónicos de ratones DNBS, ninguno de los cuales estaba presente en los controles (Figura 7C). Tomados en conjunto, estos resultados indican que los ratones tratados con DNBS exhibieron señales significativas de colitis aguda.



**Figura 7. Evaluación macroscópica y microscópica de la colitis aguda inducida por DNBS.** (A) Imágenes de colon representativas de ratones de los dos grupos. (B) Puntuación de daño macroscópico. La punta de flecha negra indica adherencias, la punta de flecha blanca necrosis y la punta de flecha roja sangrado petequiral (C) Secciones representativas de colon teñidas con H & E de un ratón control y DNBS; la punta de flecha naranja indica el infiltrado celular; 50  $\mu$ m; aumento x10. Los datos se presentan como la media  $\pm$  S.E.M, n = 7 por grupo. \*\*\* P < 0,001, el análisis estadístico fue una prueba de *t*-Student para datos no pareados.

### 9.2 Aumento de la expresión de ARNm de TNF- $\alpha$ en el tejido de colon inflamado

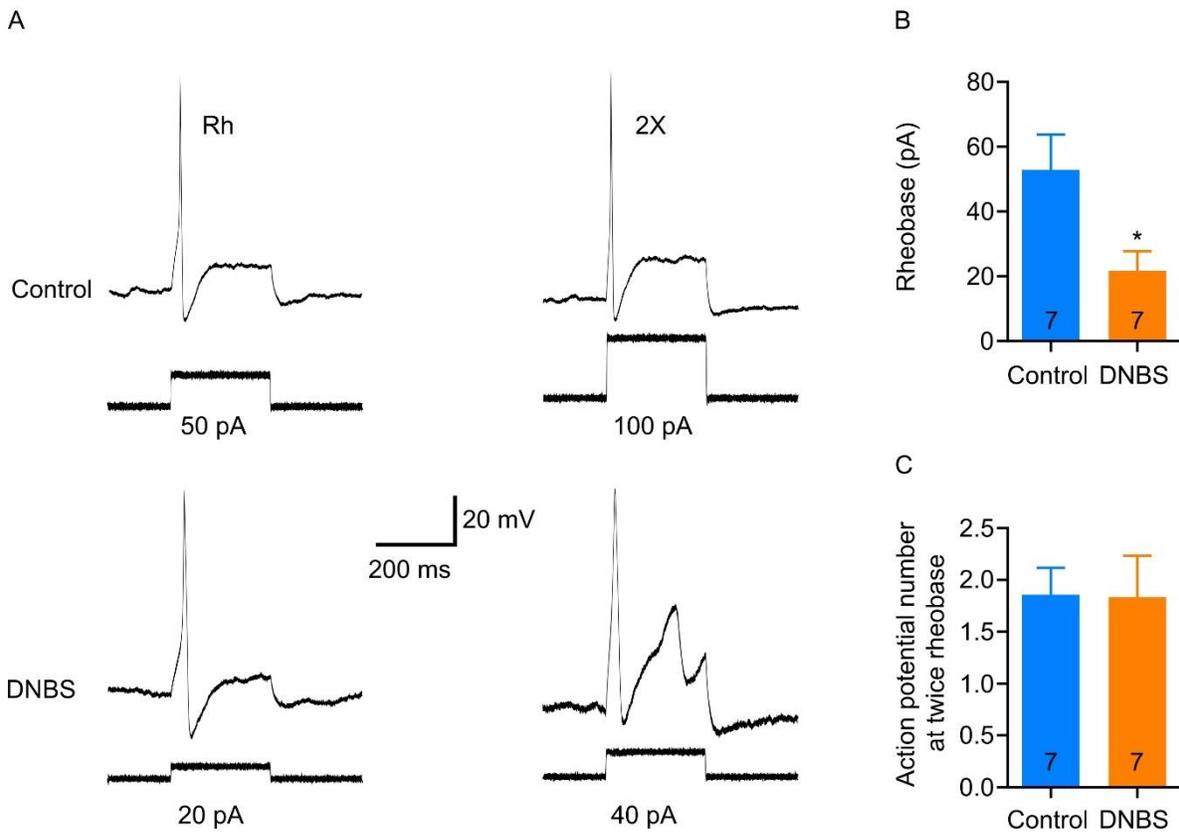
El proceso inflamatorio del colon inducido por DNBS en ratones se reflejó además por un aumento estadísticamente significativo de 1.5 veces en la expresión de ARNm de TNF- $\alpha$  en comparación con el grupo control ( $P < 0.05$ ; figura 8A). Además, también hubo un aumento en la expresión de ARNm de IL-1 $\beta$  e IL-6 en los tejidos colónicos de ratones tratados con DNBS, en comparación con el grupo control, pero este cambio no fue estadísticamente significativo (Figura 8B y C). Estos resultados indican que la inflamación colónica en este modelo agudo está influenciada principalmente por la sobreexpresión de TNF- $\alpha$ .



**Figura 8. Los niveles de ARNm de TNF- $\alpha$  están elevados en el tejido colónico de ratones con colitis inducida por DNBS en comparación con los ratones control.** Niveles de ARNm de TNF- $\alpha$  (A) IL-1 $\beta$  (B) e IL-6 (C) en los tejidos colónicos de ratones de los dos grupos. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ). Diferencias estadísticas \*  $P < 0,05$  en comparación con el grupo de control mediante la prueba  $t$  de Student para datos no pareados.

### 9.3 Efectos de la colitis aguda en la excitabilidad de las neuronas pequeñas de los DRGs

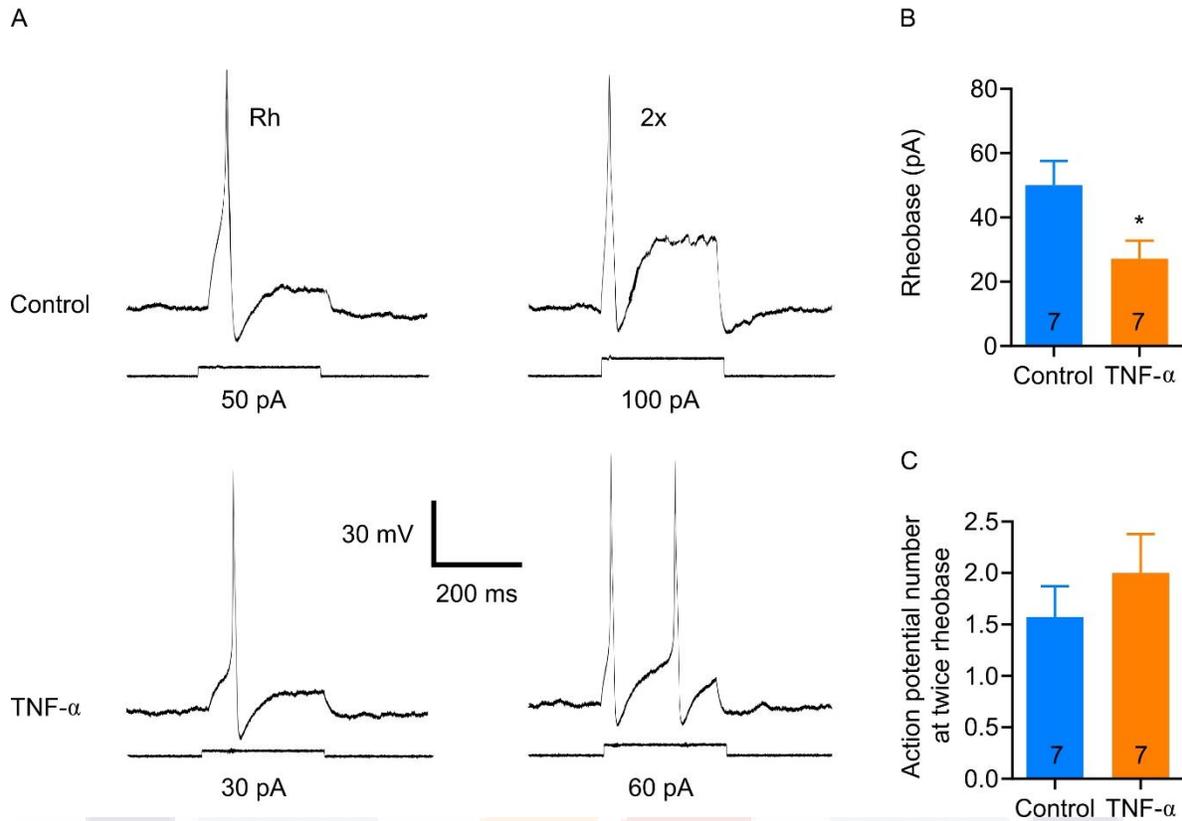
Para estudiar el efecto de la colitis aguda en la excitabilidad neuronal, cultivamos T8-L1 DRGs de ratones tratados con DNBS y de control. Los registros representativos del potencial de membrana en la reobase (estímulo de corriente mínima requerida para provocar un potencial de acción único) y el número de potenciales de acción a dos reobases se muestran en la figura 9A. La reobase se redujo significativamente (41 %) con el tratamiento con DNBS (DNBS:  $21,7 \pm 6,0$  pA vs Control:  $52,8 \pm 10,8$  pA;  $P = 0,035$ ; figura 9B). Sin embargo, el número de potenciales de acción al doble de la reobase fue similar entre los grupos DNBS y control (Figura 9C). Este resultado indica que la inflamación colónica afecta las propiedades de excitabilidad neuronal, haciéndolas más hiperexcitables.



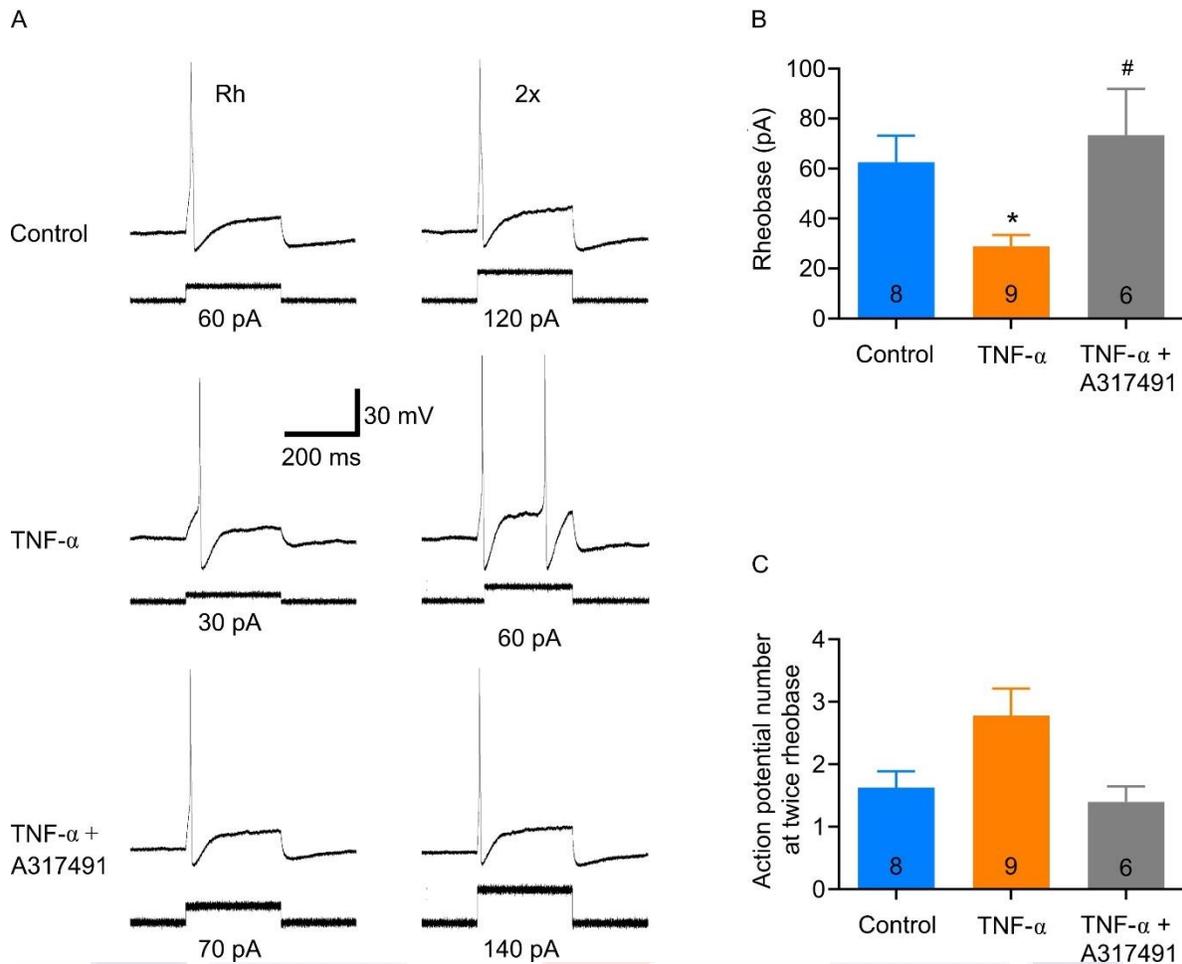
**Figura 9. Las neuronas de los DRGs (T8-L1) aisladas de ratones tratados con DNBS son más excitables que las aisladas de ratones control. (A)** Registros representativos de patch clamp de una neurona aislada de un ratón tratado con DNBS mostrando una reobase disminuida (trazo izquierdo inferior) y una neurona aislada de un ratón control (trazo izquierdo superior). Los trazos de la derecha (superior e inferior) son los potenciales de acción a dos reobases. **(B)** Gráficas de barras mostrando los datos de las reobases. Las células aisladas de ratones DNBS tienen una marcada disminución de la reobase en comparación con las células de ratones control (\* $P < 0,05$ ). El número de células registradas se muestra en cada barra y se obtuvieron de al menos tres ratones

diferentes. Las barras representan la media  $\pm$  el S.E.M. El \* indica estadísticamente significativo por la prueba *t*-student no pareada. (C) Gráfico de barras del resumen de los datos del número de potenciales de acción al doble de la reobase. No se observan cambios significativos. Los números dentro de las barras representan el número de neuronas registradas y las barras representan la media  $\pm$  SEM.

Para determinar si el TNF- $\alpha$  es capaz de producir la excitabilidad observada en neuronas DRG provenientes de ratones tratados con DNBS, se llevaron a cabo registros de patch clamp en neuronas DRG T8-L1 disociadas incubadas durante toda la noche con TNF- $\alpha$  (0.1  $\mu$ g/mL). Al igual que las neuronas DRG de los ratones tratados con DNBS, la reobase disminuyó significativamente en las neuronas incubadas con TNF- $\alpha$  (los registros representativos se muestran en la figura 10A), reduciéndose en un 54.3 % (TNF- $\alpha$ :  $27,1 \pm 5,7$  pA, n = 7; vs control:  $50 \pm 7.6$  pA, n= 7; P = 0.03; prueba *t* de Student no pareada; figura 10B). El número de potenciales de acción evocados al doble de la reobase fue casi el mismo entre las neuronas incubadas con TNF- $\alpha$  y neuronas incubadas con medio de cultivo. Para probar si la activación del receptor P2X3 precede a la potenciación de la excitabilidad de las neuronas del DRG por TNF- $\alpha$ , se coincubaron las neuronas con ATP (100  $\mu$ M), TNF- $\alpha$  (0.1  $\mu$ g/ml) y el antagonista del receptor P2X3 A-317491 (1  $\mu$ M). El antagonista se aplicó 30 min antes del ATP y TNF- $\alpha$ . Los efectos del TNF- $\alpha$  sobre la reobase de las neuronas fueron inhibidos por la incubación previa con A-317491 (Figura 11A). El valor promedio de la reobase de las neuronas de control (ATP solo) fue de  $62,5 \pm 10,7$  pA, mientras que la incubación con TNF- $\alpha$  la redujo a  $28,9 \pm 330 \pm 4,5$  pA, una respuesta que se bloqueó con la preincubación con A-317491 seguida de estimulación con TNF- $\alpha$ , lo que dio como resultado una reobase de  $73,3 \pm 18,5$  pA (Figura 11B). Entre estos grupos, no hubo diferencias en el número de potenciales de acción evocado con un estímulo de dos veces la reobase (Figura 11C).



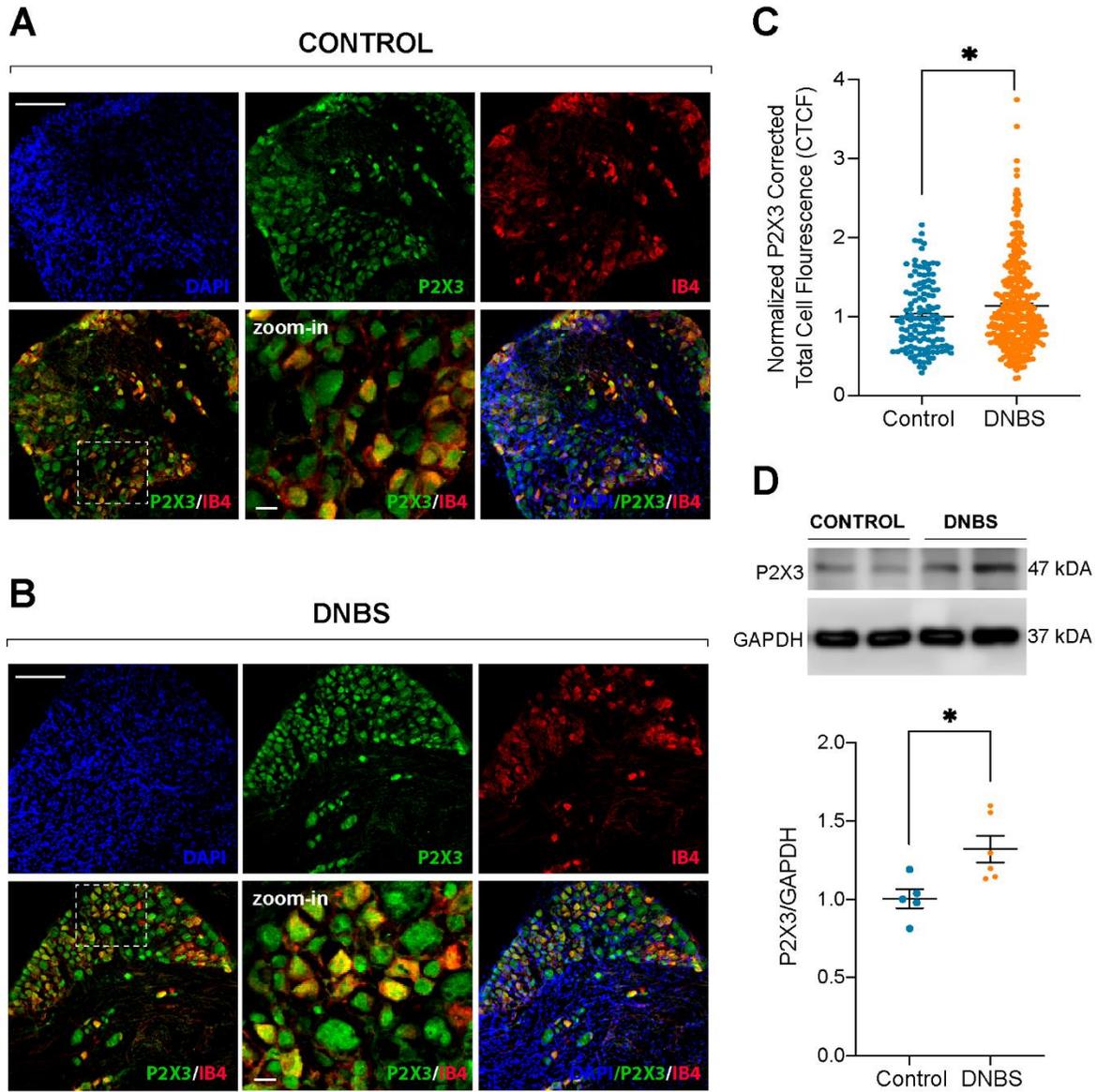
**Figura 10. El TNF- $\alpha$  exógeno incrementa la excitabilidad de las neuronas pequeñas de los DRG.** (A) Registros representativos de Patch Clamp de una neurona control y una incubada toda la noche con TNF- $\alpha$  (0.1  $\mu$ g/ml). Los trazos de la izquierda son potenciales de acción generados por la mínima corriente aplicada (Reobase) y los trazos de la derecha son los potenciales de acción generados por dos veces la reobase. (B) Gráfica de barras del resumen de los datos que demuestran que las neuronas incubadas toda la noche con TNF- $\alpha$  (0.1  $\mu$ g/ml) presentan una reducción significativa en la reobase en comparación con las neuronas incubadas únicamente con medio. Los números dentro de las barras representan el número de neuronas registrada y las barras representan el promedio  $\pm$  SEM. El \* indica estadísticamente significativo ( $P < 0.05$ ) por la prueba de  $t$ -Student no pareada. (C) Gráfica de barras del resumen de los datos del número de potenciales de acción a dos veces la reobase. No se observan cambios significativos. Los números dentro de las barras representan el número de neuronas registrada y las barras representan el promedio  $\pm$  SEM.



**Figura 11. El efecto de TNF- $\alpha$  sobre la excitabilidad neuronal de DRG se atenúa notablemente por el antagonista selectivo del receptor P2X3, A-317491.** Las neuronas DRG fueron coincubadas con ATP (100  $\mu$ M), TNF- $\alpha$  (0.1  $\mu$ g/ml) y el antagonista del receptor P2X3 A-317491 (1  $\mu$ M). El antagonista se incubó durante 30 min antes de aplicar ATP y TNF- $\alpha$ . (A) Registros representativos de Patch Clamp de una neurona de control (ATP solo), una incubada durante toda la noche con ATP plus TNF- $\alpha$  (0,1  $\mu$ g/ml) y otra incubada con ATP más TNF- $\alpha$  + A-317491 (1  $\mu$ M). Los trazos de la izquierda son potenciales de acción generados a la corriente mínima necesaria (reobase), y los trazos de la derecha son los potenciales de acción generados por el doble de reobase. (B) Gráfica de barras del resumen de los datos que muestran que el efecto excitador del TNF- $\alpha$  en las neuronas sensoriales es impedido por el antagonista del receptor P2X3, A-317491. Los números dentro de las barras representan el número de neuronas registradas y las barras representan la media  $\pm$  SEM. El \* indica estadísticamente significativo ( $P < 0,05$ ) mediante ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Bonferroni. (C) Gráfica de barras de los datos del número de potenciales de acción al doble de la reobase. No se observan cambios significativos. Los números dentro de las barras representan el número de neuronas registradas y las barras representan la media  $\pm$  SEM.

#### **9.4 Niveles de proteína del receptor P2X3 en DRG (T8-L1) de ratones tratados con DNBS**

Los datos electrofisiológicos descritos anteriormente sugieren que un colon inflamado puede causar una sensibilización directa de las neuronas aferentes primarias a través de la modulación directa de los receptores P2X3. Esta modulación directa podría ser el resultado de la sobreexpresión del receptor P2X3 en las neuronas de los DRGs. Para probar esta hipótesis, llevamos a cabo ensayos de inmunofluorescencia y western blot. Es bien sabido que la mayoría de las neuronas DRG P2X3-positivas en el ratón son neuronas no peptidérgica que se unen a la isolectina-B4 (IB4) (70-72). Las imágenes representativas de inmunofluorescencia se muestran en las figuras 12A y B. El análisis de inmunofluorescencia de los receptores P2X3 en los DRG T8-L1 reveló que, en comparación con los controles, la proporción de neuronas positivas para P2X3<sup>+</sup>/IB4<sup>+</sup> aumentó notablemente en los ratones tratados con DNBS en comparación con los ratones control ( $P < 0,05$ ; figura 12C). El análisis de Western blot confirmó este hallazgo, ya que los niveles de proteína P2X3 en DRGs (T8-L1) aumentaron significativamente en ratones con colitis inducida por DNBS ( $P < 0,05$ ; figura 12D). Estos resultados revelan una regulación al alza en el receptor P2X3 en las neuronas DRG que inervan el colon de los ratones tratados con DNBS.



**Figura 12. Inmunorreactividad del receptor P2X3 (verde) e IB4 (rojo) en las neuronas DRG (T8-L1) en los ratones control (A) y después del cuarto día de inducción de la colitis en ratones DNBS (B).** Obsérvese el mayor número de neuronas que muestran colocalización entre los receptores IB4 y P2X3 en el modelo de colitis. Barra de escala 100  $\mu$ m y acercamiento 15  $\mu$ m. (C) La intensidad de la fluorescencia se cuantificó utilizando Image J. Los datos son mostrados como media  $\pm$  S.E.M. \*  $P < 0,05$  significativo en comparación con el control respectivo mediante la prueba  $t$  no pareada. (D) Arriba: inmunoblots representativos de los niveles de proteína de los receptores P2X3 de los DRG (T8-L1) de ratones del grupo de control y del grupo DNBS. Gráfico inferior: histograma que muestra la densidad de banda del inmunoblot de la proteína receptora P2X3. La expresión de la proteína del receptor P2X3 aumentó significativamente en las neuronas DRG de los ratones tratados con DNBS. Los datos se muestran como media  $\pm$  S.E.M. \*  $P < 0,05$  significativo en comparación con el control respectivo mediante la prueba  $t$  no pareada.

## 10. DISCUSION

Los resultados de este estudio respaldan la hipótesis de que la liberación de TNF- $\alpha$  durante la colitis aguda contribuye a la regulación positiva funcional de los receptores P2X3 causando hiperexcitabilidad en las neuronas DRG de diámetro pequeño que inervan el colon inflamado, lo que puede conducir a señales nociceptivas en el sistema nervioso central (SNC) y contribuyen, al menos en parte, a la plasticidad nociceptiva de los aferentes viscerales. En apoyo de esta interpretación, estudios previos han descrito la participación de los receptores P2X3 en la hipersensibilidad visceral durante la colitis aguda inducida por TNBS (12, 73).

El microambiente inflamatorio de las terminales axónicas nociceptivas del DRG está compuesto por numerosos mediadores inflamatorios, muchos con capacidad de activación o sensibilización neuronal (7). La identidad del mediador, la producción y la secreción se basan en las características del entorno inflamatorio. Dada esta variabilidad, el primer objetivo de este estudio fue caracterizar la inflamación y determinar cuáles de las citocinas proinflamatorias clásicas de fase aguda se expresaban. Se demostró que la inflamación intestinal estaba en una fase activa cuatro días después de la aplicación de DNBS, con un aumento significativo en la expresión del ARNm de TNF- $\alpha$ . Varios estudios han demostrado consistentemente que los linfocitos y las células presentadoras de antígenos (APC) orquestan el proceso inflamatorio en la EII activa, principalmente a través de la producción de TNF- $\alpha$ , que se ha correlacionado con el grado endoscópico de inflamación en EII (3, 74).

Las pequeñas neuronas de los DRGs de ratones tratados con DNBS fueron hiperexcitables, ya que sus reobases fueron más bajas en comparación con las de ratones control, revelando, por lo tanto, un efecto del entorno inflamatorio sobre la función neuronal. Esta alteración en el umbral probablemente hace que estas neuronas sean más sensibles a los estímulos por debajo del umbral *in vivo* en condiciones inflamatorias. Este hallazgo es consistente con estudios previos, que revelan que la inflamación intestinal indujo hiperexcitabilidad en las neuronas pequeñas del DRG del colon (75, 76). Además, encontramos que la hiperexcitabilidad inducida por DNBS de las neuronas T8-L1 DRG es similar a la observada en aquellas neuronas T8-L1 DRG incubadas con TNF- $\alpha$ . Estos resultados resaltan el importante papel que juega el TNF- $\alpha$  en la nocicepción por colitis. Nuestros resultados concuerdan con otro estudio que muestra que las neuronas DRG co-

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

incubados con TNF- $\alpha$  y sobrenadantes de pacientes con CU activa mostraron reobases significativamente bajas y un aumento en el número de potencial de acción en comparación con las neuronas de control (30). A diferencia del estudio antes mencionado, en este trabajo no hubo diferencias en el número de potenciales de acción. Esta discrepancia podría deberse a que solo incubamos con TNF- $\alpha$  y, por lo tanto, no observamos el efecto sinérgico de los mediadores proinflamatorios adicionales encontrados en los sobrenadantes de pacientes con CU activa.

El mecanismo por el cual el TNF- $\alpha$  tiene efectos pronociceptivos en las neuronas del DRG que inervan el colon no se comprende por completo. Cada vez hay más pruebas que demuestran que el TNF- $\alpha$  ejerce sus efectos directamente sobre las neuronas aferentes primarias para inducir hipersensibilidad (50, 77, 78) a través de la modulación de los canales iónicos, esto incluye el receptor de capsaicina TRPV1 y canales de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje (76, 79-80). Por otro lado, también hay estudios que demuestran que los receptores homoméricos P2X3 y heteroméricos P2X2/3 participan en el desarrollo de hiperalgesia inflamatoria (9, 11, 81, 82). Para investigar si TNF- $\alpha$  aumenta la excitabilidad de las neuronas DRG a través de la modulación de los receptores P2X3, las neuronas se trataron previamente con el antagonista de los receptores P2X3 A-317491 antes de aplicar ATP y TNF- $\alpha$ . Nuestros resultados demuestran, por primera vez, que la preincubación con A-317491 previene el aumento de la excitabilidad neuronal inducida por el TNF- $\alpha$ . Esto sugiere que el TNF- $\alpha$  desencadena la hiperexcitabilidad de las neuronas sensoriales a través de la modulación directa del receptor P2X3. Hay datos que respaldan esta noción, ya que se ha demostrado que el TNF- $\alpha$  activa una vía dependiente de p38 MAPK que conduce a la rápida sensibilización de P2X3 en las neuronas DRG (83).

La respuesta aumentada en las neuronas DRG tratadas con TNF- $\alpha$  probablemente surge de la regulación positiva de la expresión del receptor P2X3. En este estudio se demostró que la regulación al alza de P2X3 se produce después de la inducción de colitis en las neuronas de los DRG T8-L1, las cuales son neuronas sensoriales del colon distal y el recto (32). Esta sobreexpresión de P2X3 coincide con las neuronas positivas para IB4, lo que sugiere que se trata de neuronas nociceptivas de naturaleza no peptidérgica que detectan la nocicepción mecánica colorrectal (84). También se han encontrado resultados de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sobreexpresión del receptor P2X3 en neuronas DRG después de la inducción de colitis con TNBS (73). Estos estudios indican que el receptor P2X3 tiene un rol fundamental en la sensibilización de los nociceptores durante la colitis inflamatoria aguda.

Nuestros hallazgos brindan nuevos conocimientos sobre la colitis y brindan evidencia de que los mediadores proinflamatorios como el TNF- $\alpha$  aumentan la excitabilidad de las neuronas sensoriales de las fibras aferentes primarias que inervan el colon a través de la modulación de la actividad de los receptores P2X3. Además, estos hallazgos resaltan la necesidad de desarrollar antagonistas selectivos de P2X3 con el objetivo de usarlos como terapia en la enfermedad inflamatoria intestinal.

## **11. CONCLUSIÓN**

En conclusión, nuestros resultados indican que, durante la colitis aguda, la liberación de mediadores proinflamatorios, como TNF- $\alpha$ , aumenta la excitabilidad de las neuronas sensoriales DRG cuyas terminaciones nerviosas periféricas inervan el colon. Este efecto es revertido por un antagonista selectivo del receptor P2X3, lo que sugiere que el TNF- $\alpha$  a través de la modulación de estos receptores provoca un aumento de la excitabilidad de las neuronas sensoriales en un modelo de colitis aguda.

## 12. REFERENCIAS

1. Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* (2015);12(12):720-7. doi: 10.1038/nrgastro.2015.150.
2. Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol.* (2014); 20(1):91-9. doi: 10.3748/wjg.v20.i1.91.
3. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* (2014);14(5):329-342. doi:10.1038/nri3661
4. Valdez-Morales E, Guerrero-Alba R, Ochoa-Cortes F, Benson J, Spreadbury I, Hurlbut D, Miranda-Morales M, Lomax AE, Vanner S. Release of endogenous opioids during a chronic IBD model suppresses the excitability of colonic DRG neurons. *Neurogastroenterol Motil.* (2013); 25(1):39-46.e4. doi: 10.1111/nmo.12008.
5. Farthing MJ, Lennard-jones JE. Sensibility of the rectum to distension and the anorectal distension reflex in ulcerative colitis. *Gut.* (1978); 19(1):64-69. doi:10.1136/gut.19.1.64
6. Huang J, Zhang X, McNaughton PA. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr Neuropharmacol.* (2006); 4(3):197-206. doi:10.2174/157015906778019554.
7. Yam MF, Loh YC, Tan CS, Khadijah Adam S, Abdul Manan N, Basir R. General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. *Int J Mol Sci.* (2018);19(8):2164. doi:10.3390/ijms19082164.
8. Brederson JD, Jarvis MF. Homomeric and heteromeric P2X3 receptors in peripheral sensory neurons. *Curr Opin Investig Drugs.* (2008) ;9(7):716-725.
9. Jarvis MF, Burgard EC, McGaraughty S, Honore P, Lynch K, Brennan TJ, et al. A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* (2002) ;99(26):17179–84.

10. Oliveira MC, Pelegrini-da-Silva A, Tambeli CH, Parada CA. Peripheral mechanisms underlying the essential role of P2X<sub>3,2/3</sub> receptors in the development of inflammatory hyperalgesia. *Pain*. (2009);141(1-2):127-134. doi:10.1016/j.pain.2008.10.024.
11. Yiangou Y, Facer P, Baecker PA, Ford, A. P., Knowles, C. H., Chan, C. L., Williams, N. S., & Anand, P. ATP-gated ion channel P2X<sub>3</sub> is increased in human inflammatory bowel disease. *Neurogastroenterol Motil*. (2001); 13(4):365-369. doi:10.1046/j.1365-
12. Deiteren A, van der Linden L, de Wit A, Ceuleers, H., Buckinx, R., Timmermans, J. P., Moreels, T. G., Pelckmans, P. A., De Man, J. G., & De Winter, B. Y. P2X<sub>3</sub> receptors mediate visceral hypersensitivity during acute chemically-induced colitis and in the post-inflammatory phase via different mechanisms of sensitization. *PLoS One*. (2015); 10(4):e0123810. doi:10.1371/journal.pone.0123810.
13. Yamamoto-Furusho JK, Bosques-Padilla F, de-Paula J, Galiano MT, Ibañez P, Juliao F, et al. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal: Primer Consenso Latinoamericano de la Pan American Crohn's and Colitis Organisation. *Rev Gastroenterol Mex*. (2017);82(1):46–84. doi:10.1016/j.rgmx.2016.07.003
14. Alatab S, Sepanlou SG, Ikuta K, Vahedi H, Bisignano C, Zafiro S, et al. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*. (2020) Jan 1;5(1):17–30. doi: 10.1016/S2468-1253(19)30333-4
15. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*. (2017) ;390(10114):2769–78. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32448-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32448-0)
16. Yamamoto-Furusho JK, Bosques-Padilla FJ, Charúa-Guindic L, Cortés-Espinosa T, Miranda-Cordero RM, Saez A, et al. Inflammatory bowel disease in Mexico: Epidemiology, burden of disease, and treatment trends. *Rev Gastroenterol Mex (Engl Ed)*. Jul-Sep (2020) ;85(3):246-256. doi: 10.1016/j.rgmx.2019.07.008.

17. Cioffi M. Laboratory markers in ulcerative colitis: Current insights and future advances. *World J Gastrointest Pathophysiol* (2015) Feb 15;6(1):13-22. doi:10.4291/wjgp.v6.i1.13.
18. Yamamoto-Furusho JK, Gutiérrez-Grobe Y, López-Gómez JG, Bosques-Padilla F, Rocha-Ramírez JL. Consenso mexicano para el diagnóstico y tratamiento de la colitis ulcerosa crónica idiopática. *Rev Gastroenterol Mex.* Abr-Jun (2018);83(2):144–67. doi: 10.1016/j.rgmx.2017.08.006
19. Arévalo F, Arias Stella Castillo J, Monge E, Arias Stella J. Biopsia de colon: características histológicas en diferentes tipos de Colitis Crónica. *Rev Gastroenterol. Perú.* (2008) Apr;28(2):140-149. Available from [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1022-51292008000200006&lng=en](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292008000200006&lng=en)
20. Castaño-Milla C, Chaparro M, Gisbert JP. Systematic review with meta-Analysis: The declining risk of colorectal cancer in ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics.* (2014); 39(7):645–59. doi: 10.1111/apt.12651
21. Agredano-Pérez S, Mariscal-Ramírez I, Ronquillo-Carreón C, Pineda-Razo T, Nava-Zavala AH, Rubio-Jurado B. Angiogénesis y hemostasia en cáncer colorectal. *Gaceta Mexicana de Oncología.* (2017) May 1;16(3):171-174. Available from <https://doi.org/10.24875/j.gamo.M17000068>
22. Sholter DE, Armstrong PW. Adverse effects of corticosteroids on the cardiovascular system. *Can J Cardiol.* (2000) Apr;16(4):505-11
23. Angueira Teresa, Lucendo Alfredo J. Esofagitis por fármacos. *Rev Esp Enferm Dig.* (2015) Mayo;107(5):322-322. Available from: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1130-01082015000500013&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082015000500013&lng=es).
24. Bermejo F, Aguas M, Chaparro M, et al. Recomendaciones del Grupo Español de Trabajo en Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa (GETECCU) sobre el uso de tiopurinas en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterología y Hepatología.* Mar (2018); 41(3):205-221. doi: 10.1016/j.gastrohep.2017.11.007

25. Ben-Horin S, Kopylov U, Chowers Y. Optimizing anti-TNF treatments in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev.* (2014) Jan;13(1):24-30. doi: 10.1016/j.autrev.2013.06.002.
26. Cohn HM, Dave M, Loftus E v. Understanding the Cautions and Contraindications of Immunomodulator and Biologic Therapies for Use in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* (2017) Aug;23(8):1301-1315. doi: 10.1097/MIB.0000000000001199
27. Maithili V Chitnavis, Merwise Baray, Patrick G Northup, Anne G Tuskey, Brian W Behm. Opioid use and misuse in ulcerative colitis. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics.* (2019) ;10(1):22–8. Available from: <https://www.wjgnet.com/bpg/gerinfo/240>
28. Chang L. Review article: Epidemiology and quality of life in functional gastrointestinal disorders. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics, Supplement.* (2004); 20(7):31–9.
29. Docherty MJ, Jones RCW, Wallace MS. Managing pain in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology and Hepatology.* (2011); 7(9):592–601.
30. Ibeakanma C, Vanner S. TNF $\alpha$  is a key mediator of the pronociceptive effects of mucosal supernatant from human ulcerative colitis on colonic DRG neurons. *Gut.* (2010) May 1;59(5):612 LP – 621. Available from: <http://gut.bmj.com/content/59/5/612.abstract>
31. Drewes AM, Olesen AE, Farmer AD, Szigethy E, Rebours V, Olesen SS. Gastrointestinal pain. *Nature Reviews Disease Primers* (2020); 6(1):1–16. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41572-019-0135-7>
32. Robinson DR, McNaughton PA, Evans ML, Hicks GA. Characterization of the primary spinal afferent innervation of the mouse colon using retrograde labelling. *Neurogastroenterology and Motility.* (2004); 16(1):113–24. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2982.2003.00456.x>
33. Vermeulen W, de Man JG, Pelckmans PA, de Winter BY. Neuroanatomy of lower gastrointestinal pain disorders. *World J of Gastroenterol.* (2014). Jan 28;20(4):1005-20. doi:10.3748/wjg.v20.i4.1005

34. de Schepper HU, de Man JG, Moreels TG, Pelckmans PA, de Winter BY. Review article: gastrointestinal sensory and motor disturbances in inflammatory bowel disease – clinical relevance and pathophysiological mechanisms. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. (2008) ;27(8):621–37. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2036.2008.03624.x>
35. Bamias G, Nyce MR, de La Rue SA, Cominelli F. New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Annals of internal medicine*. (2005); 143(12):895–904. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16365470/>
36. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine* (2002); 347(6):417–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12167685/>
37. Salim SY, Söderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases*. (2011); 17(1):362–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20725949/>
38. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. (2001) ;413(6852):203–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11557989/>
39. Purves D. *Neuroscience*. 2nd ed. United States: Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, c2001.; Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/?Db=nlmcatalog&DbFrom=books&Cmd=Link&LinkName=books\\_nlmcatalog&IdsFromResult=1625852](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/?Db=nlmcatalog&DbFrom=books&Cmd=Link&LinkName=books_nlmcatalog&IdsFromResult=1625852)
40. Vanner SJ, Greenwood-Van Meerveld B, Mawe GM, Shea-Donohue T, Verdu EF, Wood J, et al. Fundamentals of neurogastroenterology: Basic science. *Gastroenterology*. (2016) May 1;150(6):1280–91. doi:10.1053/j.gastro.2016.02.018
41. Berta T, Qadri Y, Tan PH, Ji RR. Targeting dorsal root ganglia and primary sensory neurons for the treatment of chronic pain. *Expert opinion on therapeutic targets*. (2017); 21(7):695–703. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28480765/>
42. Wang F, Ma S bin, Tian ZC, Cui YT, Cong XY, Wu W bin, et al. Nociceptor-localized cGMP-dependent protein kinase I is a critical generator for central sensitization and neuropathic pain. *Pain*. (2021); 162(1):135–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32773598/>

43. Lakhan SE, Kirchgessner A. Neuroinflammation in inflammatory bowel disease. *Journal of neuroinflammation*. (2010); Jul 8;7:37. doi: 10.1186/1742-2094-7-37
44. Sommer C, Kress M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neuroscience letters*. (2004) May 6;361(1–3):184–7. doi: 10.1016/j.neulet.2003.12.007
45. Sweitzer S, Martin D, DeLeo JA. Intrathecal interleukin-1 receptor antagonist in combination with soluble tumor necrosis factor receptor exhibits an anti-allodynic action in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience*. (2001) Mar 14;103(2):529–39. doi: 10.1016/s0306-4522(00)00574-1
46. Schäfers M, Geis C, Svensson CI, Luo ZD, Sommer C. Selective increase of tumour necrosis factor-alpha in injured and spared myelinated primary afferents after chronic constrictive injury of rat sciatic nerve. *Eur J Neurosci*. (2003) Feb;17(4):791–804. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02504.x
47. Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*. (1992) Nov;107(3):660–4. doi: 10.1111/j.1476-5381.1992.tb14503.x
48. Woolf CJ, Allchorne A, Safieh-Garabedian B, Poole S. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. *Br J Pharmacology*. (1997) Jun;121(3):417–24. doi: 10.1038/sj.bjp.0701148
49. Sorkin LS, Xiao WH, Wagner R, Myers RR. Tumour necrosis factor-alpha induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. *Neuroscience*. (1997) Nov;81(1):255–62. doi: 10.1016/s0306-4522(97)00147-4
50. Jin X, Gereau IV RW. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor-alpha. *J Neurosci*. (2006) Jan 4;26(1):246–55. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3858-05.2006
51. Eltzschig HK, Sitkovsky M v., Robson SC. Purinergic signaling during inflammation. *N Engl J Med*. (2012) Dec 13;367(24):2322–2333. doi: 10.1056/NEJMra1205750

52. Deaglio S, Robson SC. Ectonucleotidases as Regulators of Purinergic Signaling in Thrombosis, Inflammation, and Immunity. *Adv Pharmacol.* (2011);61:301-32. doi: 10.1016/B978-0-12-385526-8.00010-2
53. Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, Onoue M, et al. ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation. *Nature.* (2008) Oct 9;455(7214):808-12. doi: 10.1038/nature07240
54. Burnstock G. Purinergic Mechanisms and Pain. *Adv Pharmacol.* (2016);75:91–137. doi: 10.1016/bs.apha.2015.09.001
55. Kuan YH, Shyu BC. Nociceptive transmission and modulation via P2X receptors in central pain syndrome. *Mol Brain.* (2016) May 26;9(1):1–9. doi: 10.1186/s13041-016-0240-4
56. Chen Y, Li GW, Wang C, Gu Y, Huang LYM. Mechanisms underlying enhanced P2X receptor-mediated responses in the neuropathic pain state. *Pain.* (2005) Dec 15;119(1–3):38–48. doi: 10.1016/j.pain.2005.09.007
57. North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* (2002) Oct;82(4):1013–67. doi: 10.1152/physrev.00015.2002.
58. Guo C, Masin M, Qureshi OS, Murrell-Lagnado RD. Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol Pharmacol.* (2007) Dec;72(6):1447–56. doi: 10.1124/mol.107.035980
59. Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature.* (1995) Oct 5;377(6548):428–31. doi: 10.1038/377428a0.
60. Lewis C, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G, Surprenant A. Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature.* (1995) Oct 5;377(6548):432–5. doi: 10.1038/377432a0
61. Bland-Ward PA, Humphrey PPA. Acute nociception mediated by hindpaw P2X receptor activation in the rat. *Br J Pharmacol.* (1997) Sep;122(2):365–71. doi: 10.1038/sj.bjp.0701371

62. Hamilton SG, Wade A, McMahon SB. The effects of inflammation and inflammatory mediators on nociceptive behaviour induced by ATP analogues in the rat. *Br J Pharmacol.* (1999) Jan;126(1):326–32. doi: 10.1038/sj.bjp.0702258
63. Mañé Almero J. Modelos experimentales in vivo de enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorrectal. *Conceptos, modelos actuales y aplicabilidad. Nutr Hosp.* (2007) Abr;22(2):179–89. Available from: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-16112007000200007&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112007000200007&lng=es).
64. Morampudi V, Bhinder G, Wu X, Dai C, Sham HP, Vallance BA, et al. DNBS/TNBS colitis models: Providing insights into inflammatory bowel disease and effects of dietary fat. *J Vis Exp.* (2014) Feb 27;(84):e51297. doi: 10.3791/51297
65. Martín R, Chain F, Miquel S, Motta JP, Vergnolle N, Sokol H, et al. Using murine colitis models to analyze probiotics-host interactions. *FEMS Microbiol Rev.* (2017) Aug 1;41(Supp\_1):S49-S70. doi: 10.1093/femsre/fux035
66. Melgar S, Karlsson A, Michaëlsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* (2005) Jun;288(6): G1328-38. doi: 10.1152/ajpgi.00467.2004
67. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology.* (1989) Mar;96(3):795–803. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2914642>
68. Beyak MJ, Vanner S. Inflammation-induced hyperexcitability of nociceptive gastrointestinal DRG neurones: the role of voltage-gated ion channels. *Neurogastroenterol Motil.* (2005) Apr;17(2):175–86. doi: 10.1111/j.1365-2982.2004.00596.x
69. Khoutorsky, A., Sorge, R. E., Prager-Khoutorsky, M, et al. eIF2 $\alpha$  phosphorylation controls thermal nociception. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2016) Oct 18; 113(42):11949-11954. doi:10.1073/pnas.1614047113.

70. Bradbury, E. J., Burnstock, G., & McMahon, S. B. The expression of P2X3 purinoreceptors in sensory neurons: effects of axotomy and glial-derived neurotrophic factor. *Mol Cell Neurosci.* (1998) Nov; 12(4-5), 256–68. doi: 10.1006/mcne.1998.0719
71. Vulchanova, L., Riedl, M. S., Shuster, S. J., Stone, L. S., et al. P2X3 is expressed by DRG neurons that terminate in inner lamina II. *Eur J Neurosci.* (1998) Nov;10(11):3470–8. doi: 10.1046/j.1460-9568.1998.00355.x
72. Bennett, D. L., Michael, G. J., Ramachandran, N., et al. A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury. *J Neurosci.* (1998) Apr 15;18(8),3059–72. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-08-03059.1998
73. Wynn, G., Ma, B., Ruan, H. Z., & Burnstock, G. Purinergic component of mechanosensory transduction is increased in a rat model of colitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.* (2004) Sep;287(3),G647–G657. Available from: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00020.2004>.
74. Ishiguro Y. Mucosal proinflammatory cytokine production correlates with endoscopic activity of ulcerative colitis. *J Gastroenterol.* (1999) Feb;34(1):66–74. doi: 10.1007/s005350050218
75. Moore, B. A., Stewart, T. M., Hill, C., & Vanner, S. J. TNBS ileitis evokes hyperexcitability and changes in ionic membrane properties of nociceptive DRG neurons. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.* (2002) Jun;282(6),G1045–G1051. Available from: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00406.2001>
76. Beyak, M. J., Ramji, N., Krol, K. M., Kawaja, M. D., & Vanner, S. J. Two TTX-resistant Na<sup>+</sup> currents in mouse colonic dorsal root ganglia neurons and their role in colitis-induced hyperexcitability. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.* (2004) Oct;287(4),G845–G855. Available from: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00154.2004>.
77. Ozaktay, A. C., Kallakuri, S., Takebayashi, T., Cavanaugh, J. M., Asik, I., DeLeo, J. A., & Weinstein, J. N. Effects of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor

on sensitivity of dorsal root ganglion and peripheral receptive fields in rats. *Eur Spine J.* (2006) Oct;15(10),1529–37. doi: 10.1007/s00586-005-0058-8

78. Schäfers, M., Lee, D. H., Brors, D., Yaksh, T. L., & Sorkin, L. S. Increased sensitivity of injured and adjacent uninjured rat primary sensory neurons to exogenous tumor necrosis factor-alpha after spinal nerve ligation. *J Neurosci.* (2003) Apr1;23(7):3028–38. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-07-03028.2003
79. Czeschik, J. C., Hagenacker, T., Schäfers, M., & Büsselberg, D. TNF-alpha differentially modulates ion channels of nociceptive neurons. *Neuroscience letters.* (2008) Apr 4; 434(3):293–8. doi: 10.1016/j.neulet.2008.01.070
80. Liu, B. G., Dobretsov, M., Stimers, J. R., & Zhang, J. M. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Suppresses Activation of Sustained Potassium Currents in Rat Small Diameter Sensory Neurons. *Open Pain J.* (2008) Jan 1; 1(1) 1-15. doi: 10.2174/1876386300801010001
81. Wirkner, K., Sperlagh, B., & Illes, P. P2X3 receptor involvement in pain states. *Molecular neurobiology.* (2007) Oct;36(2):165–83. doi: 10.1007/s12035-007-0033-y
82. Teixeira, J. M., Bobinski, F., Parada, C. A., Sluka, K. A., & Tambeli, C. H. P2X3 and P2X2/3 Receptors Play a Crucial Role in Articular Hyperalgesia Development Through Inflammatory Mechanisms in the Knee Joint Experimental Synovitis. *Mol Neurobiol.* (2017) Oct;54(8):6174–6186. doi: 10.1007/s12035-016-0146-2.
83. Jin, Y., Wei, S., Liu, T. T., Qiu, C. Y., & Hu, W. P. Acute P38-Mediated Enhancement of P2X3 Receptor Currents by TNF- $\alpha$  in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *J Inflamm Res.* (2021) Jun 29;14:2841–2850. doi: 10.2147/JIR.S315774
84. La, J. H., Feng, B., Kaji, K., Schwartz, E. S., & Gebhart, G. F. Roles of isolectin B4-binding afferents in colorectal mechanical nociception. *Pain.* (2016) Feb;157(2):348–354. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000380

13. ANEXOS



**ANEXO A:**

Se presento el trabajo en el congreso 2021 de la Sociedad Argentina de Fisiología, donde se obtuvo el 1er lugar del Premio ELSEVIER ALACF 2021 a Excelencia en Investigación en Fisiología.

**Abstract del congreso**



**Vol. 14, Special Issue, October 2021**  
ISSN 1669-5410 (Online)  
[pmr.safisiol.org.ar](http://pmr.safisiol.org.ar)





## Section 5: ALACF Best Work Award Poster Modality

### Jury:

**Cecilia Larocca** • Institute of Experimental Physiology, Rosario (Argentina)  
**Patricia Rocco** • Laboratory of Pulmonary Investigation, Carlos Chagas, Rio de Janeiro (Brasil)  
**Ma. Del Carmen Cortés** • Institute of Physiology Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (México)

7

### Involvement of the P2X3 receptor in neuronal hyperexcitability in a colitis model in C57BL/6 mice

Sánchez-Navarro CA<sup>1</sup>, Valdez-Morales EE<sup>2</sup>, Barragán-Iglesias P<sup>3</sup>, Barrios-García T<sup>3</sup>, Guerrero-Alba R<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Master's Student in Biomedical Research, Department of Medicine, Health Sciences Center, Autonomous University of Aguascalientes, Ciudad Universitaria, Aguascalientes, Mexico. <sup>2</sup> Cátedras CONACYT. Autonomous University "Benito Juárez" of Oaxaca, Department of Medicine and Surgery. <sup>3</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Basic Sciences Center, Autonomous University of Aguascalientes, Ciudad Universitaria, Aguascalientes, Mexico.

**Introduction:** Previous studies have been shown that acute colitis enhances the excitability of colonic nociceptive dorsal root ganglia (DRG) neurons<sup>1</sup>. However, the molecular mechanisms involved in this hyperexcitability are not fully understood. Extracellular adenosine 5'-triphosphate (eATP) has been established as a key sensory signaling molecule in inflammatory pain through activation of P2X3 receptors<sup>2</sup>, which are highly expressed in nociceptive DRG neurons<sup>3</sup>. **Aim:** To determine if P2X3 receptors participate in neuronal hyperexcitability during an inflammatory process. **Methods:** Colitis was induced by intrarectal administration of Dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS) 200 mg/kg in ethanol 50% in C57BL/6 mice. The severity of colitis was assessed by weight loss and macroscopic and microscopic scores of damaged colonic tissues. The neuronal excitability of T8-L2 Dorsal Root Ganglia (DRG) neurons was evaluated by measure changes in rheobase and action potential firing using the perforated patch clamp technique. The role of the P2X3 receptor was studied using a selective P2X3 antagonist, A-31749, and its expression was evaluated by western blot and immunofluorescence. **Results:** Colonic sections collected 4 days post-DNBS treatment showed focal ulceration, crypt destruction, goblet cell depletion, and mucosal infiltration of immune cells. DRG neurons from DNBS-treated mice showed increased P2X3 expression and hyperexcitability (rheobase decreased 51%,  $P < 0.05$ , unpaired *t*-student test,  $n = 7$ ). TNF- $\alpha$  expression levels are significantly higher in the colonic tissues of DNBS-treated mice compared to the control samples ( $P < 0.05$ , unpaired *t*-student test,  $n = 8$ ) and the incubation of DRG neurons with TNF- $\alpha$  recapitulated the hyperexcitability effect of DNBS- treated mice on rheobase and this effect was blocked with the selective P2X3 antagonist receptor (A-31749). **Conclusions:** These results suggest that the release of proinflammatory mediators during colitis, such as TNF- $\alpha$ , enhanced excitability of sensory DRG neurons innervating the colon through modulation of activity P2X3 receptors.

<sup>1</sup>Stemkowski, P.L., et al. *J Physiol*, 2015. 593(16): p. 3739-55. <sup>2</sup>Deiteren, A., van der Linden, L., de Wit, A., Ceuleers, H., Buckinx, R., Timmermans, J.-P., De Winter, B. Y. (2015). *PLoS ONE*, 10(4), e0123810. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0123810>

<sup>3</sup>Burnstock, G., P2X receptors in sensory neurones. *Br J Anaesth*, 2000. 84(4): p. 476-88.

**ANEXO B**

Reconocimiento al 1er lugar del Premio ELSEVIER ALACF 2021 a Excelencia en Investigación en Fisiología



**CERTIFICAMOS QUE:**

Ah sido otorgado el

**Premio ELSEVIER ALACF 2021 a Excelencia en Investigación en Fisiología**

**PREMIO COMPARTIDO**

**ID: 113**

The Adenosine receptor A2B regulates the cytoskeletal remodeling of podocytes. Mendoza-Soto P, Torres A, Jara C, Cappelli C, Tellez A, San-Martín R. Laboratorio de Patología Molecular, Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

**ID: 7**

Involvement of the P2X3 receptor in neuronal hyperexcitability in a colitis model in C57BL6 mice. Sánchez-Navarro C.A., Valdez-Morales E.E., Barragán-Iglesias P., Barrios-García T., Guerrero-Alba R. Department of Medicine, Health Sciences Center, Autonomous University of Aguascalientes, Ciudad Universitaria, Aguascalientes, Mexico. Catedras CONACYT. Autonomous University "Benito Juárez" of Oaxaca, Department of Medicine and Surgery. Department of Physiology and Pharmacology, Basic Sciences Center, Autonomous University of Aguascalientes, Ciudad Universitaria, Aguascalientes, Mexico.

