

eman ta zabal zazu



Universidad Euskal Herriko  
del País Vasco Unibertsitatea

**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA**  
**MEDIKUNTZA ETA ODONTOLOGIA FAKULTATEA**  
**Dpto Fisiología Fisiologia Saila**

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CENTROS DE  
UNIÓN PARA PURINAS EN MEMBRANA PLASMÁTICA DE  
CÉLULAS AISLADAS DE GLÁNDULAS GÁSTRICAS**

**Tesis Doctoral**

**Carmen Asurabarrena Iraola**

**Leioa, 2004**



***Etxekoei***



## **AGRADECIMIENTOS**

*Agradezco a todas las personas que integran el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la UPV/EHU la ayuda y el apoyo prestado en la realización de este trabajo.*

*A Ana Isabel Vallejo por su labor como Directora de la presente Tesis Doctoral, sus consejos y la confianza depositada en mi trabajo.*

*A Merche Carou, codirectora de la misma, por su agradable compañía, dedicación constante y decisivo apoyo.*

*A Fernando Ainz por su buena disposición y sus siempre valiosas sugerencias.*

*A Loly Campos por su cercanía, interés e inestimable ayuda.*

*A Carmen Salgado por los buenos momentos compartidos, su ánimo y colaboración.*

*Rosa Maria Arini eskatutako bakoitzean eskeinitako arretagatik.*

*Así mismo, quiero expresar mi gratitud al Gobierno Vasco/Eusko Jaurlaritza, UPV/EHU y Caja Guipúzcoa San Sebastián/Gipuzkoa Donostia Kutxa por las ayudas económicas concedidas.*



## ABREVIATURAS

$\beta, \gamma$ - <b>meATP</b>	$\beta, \gamma$ -metiladenosina-5'-trifosfato
$\alpha, \beta$ - <b>meATP</b>	$\alpha, \beta$ -metiladenosina-5'-trifosfato
$\mu\text{g}$	microgramo
$\mu\text{M}$	micromolar
[ <sup>35</sup> S] <b>dATP<math>\alpha</math>S</b>	[ <sup>35</sup> S]-2'-desoxiadenosina-5'-O-(3- $\alpha$ tiotrifosfato)
[ <sup>3</sup> H] <b>MRS 2279</b>	[ <sup>3</sup> H]2-cloro-N <sup>6</sup> -metil-(N)-metanocarba-2'-desoxiadenosina-3'-5'-bifosfato
<b>2-MeSADP</b>	2-metiltioadenosina-5'-difosfato
<b>2-MeSAMP</b>	2-metiltioadenosina-5'-monofosfato
<b>2-MeSATP</b>	2-metiltioadenosina-5'-trifosfato
<b>A2P5PS</b>	adenosina-2'-fosfato-5'-fosfosulfato
<b>A3P5PS</b>	adenosina-3'-fosfato-5'-fosfosulfato
<b>ABC</b>	proteínas transportadoras de ATP
<b>AC</b>	adenilato ciclasa
<b>Ach</b>	acetilcolina
<b>ADP</b>	adenosina-5'-difosfato
<b>ADP<math>\beta</math>S</b>	adenosina-5'-O-(2- $\beta$ tiodifosfato)
<b>AE</b>	intercambiador de aniones
<b>AMP</b>	adenosina-3, 5'-monofosfato
<b>AMPc</b>	adenosina monofosfato cíclico
<b>AMPc</b>	adenosina-3, 5'-monofosfato cíclico
<b>ANAPP<sub>3</sub></b>	3'-O-(3-[4-azido-2-nitrofenil]amino]-propionil)ATP
<b>AP</b>	aminopirina
<b>Ap4A</b>	diadenosina tetrafosfato
<b>AR-C69931MX</b>	ácido N <sup>6</sup> -[2-metiltio)etil]-2-[3,3,3-trifluoropropiltio]-5'-adenílico, monoanhídrico con ácido diclorometilenbifosfónico
<b>ARNm</b>	ácido ribonucleico mensajero
<b>ATP</b>	adenosina-5'-trifosfato
<b>ATP<math>\gamma</math>S</b>	adenosina-5'-O-(3- $\gamma$ tiotrifosfato)
<b>ATP<math>\alpha</math>S</b>	adenosina-5'-O-(3- $\alpha$ tiotrifosfato)
<b>B<sub>max</sub></b>	unión máxima
<b>BSA</b>	seroalbúmina bovina
<b>CaMKII</b>	proteína quinasa II dependiente de Ca <sup>2+</sup> / calmodulina
<b>CCK</b>	colecistoquinina
<b>CTP</b>	citidina-5'-trifosfato
<b>DAG</b>	diacilglicerol
<b>dATP</b>	2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato
<b>DTT</b>	ditiotreitól
<b>EC</b>	enterocromafin
<b>ECL</b>	símil enterocromafin

<b>EDTA</b>	ácido etilen diamina tetraacético
<b>EGF</b>	factor de crecimiento epidérmico
<b>EGTA</b>	ácido etilenglicol <i>bis</i> (β-aminoetiléter) tetraacético
<b>ERK</b>	proteína quinasa regulada por mediadores extracelulares
<b>GDP</b>	guanosina-5´-difosfato
<b>GIP</b>	polipéptido inhibidor gástrico
<b>GLP-1</b>	péptido similar glucagon 1
<b>GLP-2</b>	péptido similar glucagon 2
<b>GTP</b>	guanosina-5´-trifosfato
<b>HEPES</b>	ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N´-(2-etanosulfónico)
<b>IP<sub>3</sub></b>	inositol trifosfato
<b>ITP</b>	inosina-5´-trifosfato
<b>k<sub>+1</sub></b>	constante cinética de asociación
<b>k<sub>-1</sub></b>	constante cinética de disociación
<b>K<sub>d</sub></b>	constante de disociación en el equilibrio
<b>MAPK</b>	proteína quinasa activada por mitógenos
<b>mg</b>	miligramo
<b>min</b>	minuto
<b>mm</b>	milímetro
<b>mM</b>	milimolar
<b>MRS 2179</b>	2´-desoxi-N <sup>6</sup> -metiladenosina-3´-5´-bifosfato
<b>NECA</b>	5´-N-etil-carboxamidoadenosina
<b>NHE</b>	intercambiador de Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup>
<b>nm</b>	nanómetro
<b>nM</b>	nanomolar
<b>NT</b>	neurotensina
<b>PACAP</b>	polipéptido hipofisario activador de adenilato ciclasa
<b>PBS</b>	tampón fosfato salino
<b>PGE1</b>	prostaglandina E <sub>1</sub>
<b>PGE2</b>	prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PI</b>	fosfatidilinositol
<b>PIP<sub>2</sub></b>	fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
<b>PIPES</b>	ácido piperazina-N,N´-bis(2-etanosulfónico)
<b>PKA</b>	proteína quinasa A
<b>PKC</b>	proteína quinasa C
<b>PLC</b>	fosfolipasa C
<b>pmol</b>	picomol
<b>PMS</b>	solución de tinción múltiple
<b>PMSF</b>	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PPADS</b>	ácido piridoxal fosfato-6-azofenil-2´-4´-disulfónico
<b>PYY</b>	péptido YY
<b>RB-2</b>	reactivo blue 2
<b>Ro 31-8220</b>	2-{1-[3-(amidinotio)propil]-1H-indol-3-il}-3-(1-metilindol-3-il)maleimida metanosulfonato



<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>SST</b>	somatostatina
<b>TRIS</b>	tri(hidroximetil)aminometano
<b>UDP</b>	uridina 5´-difosfato
<b>UTP</b>	uridina 5´-trifosfato
<b>UTP<math>\gamma</math>S</b>	uridina-5´-O-(3- $\gamma$ tiotriofosfato)
<b>VAMP</b>	proteína de membrana asociada a vesículas
<b>VIP</b>	péptido intestinal vasoactivo



# ÍNDICE



<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. ESTRUCTURA DEL ESTÓMAGO.....	3
1.1.1. La mucosa gástrica.....	5
1.1.2. La célula parietal u oxíntica.....	8
1.2. SECRECIÓN GÁSTRICA DE ÁCIDO.....	15
1.2.1. Transporte de iones en la membrana apical de la célula parietal.....	16
1.2.2. Transporte de iones en la membrana basolateral de la célula parietal y homeostasis.....	20
1.2.3. Secreción funcional de ácido.....	21
1.3. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN GÁSTRICA DE ÁCIDO.....	21
1.3.1. Mecanismos de control que actúan sobre la célula parietal.....	23
1.3.2. Mediadores intracelulares en la célula parietal.....	27
1.4. ATP EXTRACELULAR Y SECRECIÓN GÁSTRICA DE ÁCIDO.....	32
1.4.1. ATP extracelular y receptores P2Y.....	32
1.4.2. Influencia del ATP extracelular en la secreción gástrica de ácido.....	44
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	47
2.1. ANTECEDENTES.....	49
2.2. OBJETIVOS.....	50
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	53
3.1. MATERIAL.....	55
3.1.1. Productos químicos.....	55
3.1.2. Animales de experimentación.....	56
3.1.3. Composición de las disoluciones empleadas.....	56

3.2. MÉTODOS.....	60
3.2.1. Aislamiento de las células de la mucosa gástrica de conejo.....	60
3.2.2. Separación de la fracción de células parietales de la mucosa gástrica.....	62
3.2.3. Aislamiento de las fracciones apical y basolateral de la membrana plasmática de las células parietales.....	65
3.2.4. Análisis del enriquecimiento de las fracciones de membrana plasmática.....	67
3.2.5. Estudio de la unión de [ <sup>35</sup> S]dATP $\alpha$ S a las fracciones de membrana plasmática.....	71
3.2.6. Medida de la actividad adenilato ciclasa.....	77
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>79</b>
4.1. ANÁLISIS DEL ENRIQUECIMIENTO Y SEPARACIÓN DE LAS FRACCIONES APICAL Y BASOLATERAL DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LAS CÉLULAS PARIETALES.....	81
4.2. UNIÓN DE [ <sup>35</sup> S]dATP $\alpha$ S A LAS FRACCIONES DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE LAS CÉLULAS PARIETALES.....	90
4.2.1. Características cinéticas de la unión de [ <sup>35</sup> S]dATP $\alpha$ S a las fracciones enriquecidas en membrana plasmática basolateral.....	90
4.2.2. Características de la unión de [ <sup>35</sup> S]dATP $\alpha$ S a las fracciones de membrana plasmática en el equilibrio.....	93
4.2.3. Desplazamiento por diversos ligandos de los receptores P2 de la unión de [ <sup>35</sup> S]dATP $\alpha$ S a las fracciones enriquecidas en membrana plasmática basolateral.....	96
4.2.4. Sensibilidad a los nucleótidos de guanina.....	104
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>107</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>123</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>127</b>

# **1. INTRODUCCIÓN**



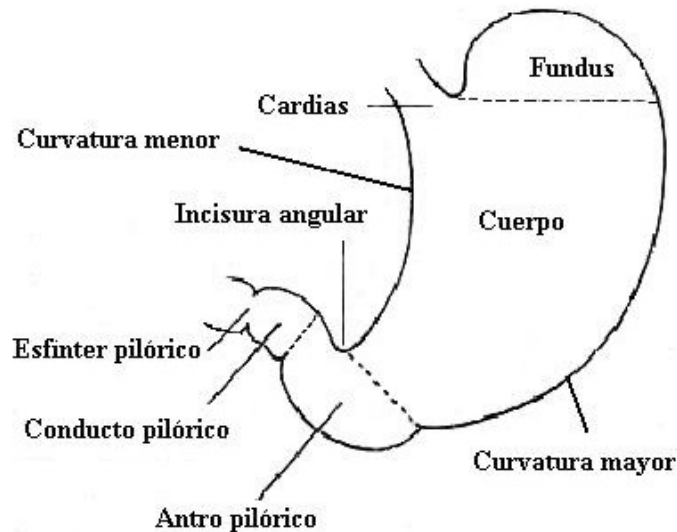


### 1.1. ESTRUCTURA DEL ESTÓMAGO

El estómago es la parte más ensanchada del tracto digestivo y comunica el esófago con el intestino delgado. Tiene forma de J y sus paredes son distensibles, por lo que constituye un amplio reservorio dinámico, de unos 2 litros de capacidad, gracias al cual se pueden espaciar las comidas e ingerir una cantidad abundante de alimentos.

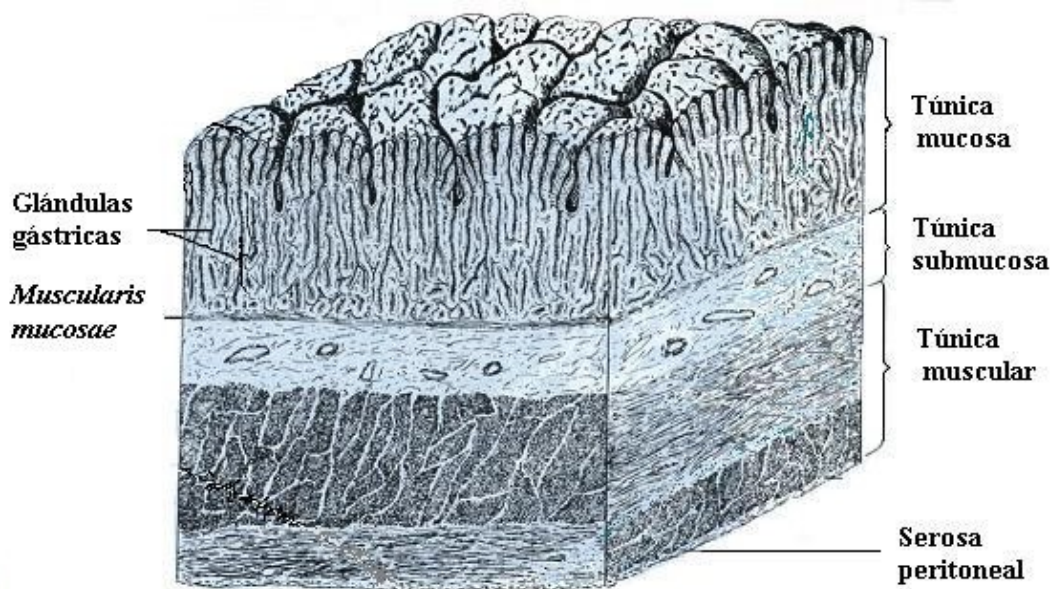
Durante su estancia en el estómago, el bolo alimenticio es sometido a la acción mecánica de las contracciones de la pared muscular gástrica y a la acción química del ácido y los enzimas secretados por la mucosa del estómago. Como consecuencia, se transforma en una masa pastosa semilíquida llamada quimo, que, intermitentemente, es vaciado hacia el duodeno. El estómago, además, secreta el factor intrínseco, necesario para la absorción de la vitamina B<sub>12</sub>, produce varias hormonas, absorbe determinadas sustancias tales como sales, agua, glucosa, alcohol y fármacos, y ayuda en la protección del organismo al destruir las bacterias patógenas ingeridas con la comida o con el moco del tracto respiratorio.

En el estómago humano, aunque no existen cámaras separadas, se pueden diferenciar varias zonas anatómicas (Figura 1). La estrecha región de 2 a 3 cm que rodea el orificio esofágico se denomina cardias o esfínter cardial. La región en forma de cúpula que sobresale en la parte izquierda del estómago por encima del nivel de la unión esófago-gástrica es el *fundus*. La espaciosa región central es el cuerpo. La porción más distal es la zona pilórica, la cual puede subdividirse en tres secciones: una primera sección más ensanchada, el antro pilórico, una segunda más angosta, el conducto o canal pilórico, y una tercera sección, el esfínter pilórico, que rodea el orificio gastroduodenal. Los bordes del estómago, derecho cóncavo e izquierdo convexo, se denominan curvatura menor y curvatura mayor, respectivamente. La curvatura menor forma una hendidura, la incisura angular, que separa el cuerpo de la porción pilórica.



**Figura 1.** Esquema de la morfología externa del estómago.

Al igual que en el resto del tubo digestivo, en la estructura histológica de la pared del estómago (Figura 2) distinguimos cuatro tunicas o capas básicas, cualquiera que sea la región considerada. La primera túnica es la más próxima a la luz, la mucosa gástrica, formada a su vez por tres subcapas: el epitelio superficial cilíndrico simple constituye la subcapa interna y se invagina para formar las glándulas gástricas; la lámina propia, de tejido conjuntivo, forma la subcapa media; en la subcapa externa se halla la *muscularis mucosae*, constituida por células musculares lisas. La segunda túnica es la submucosa, formada por tejido conectivo denso y rica en vasos sanguíneos y nervios. Más externamente se ubica la túnica muscular, integrada por células musculares lisas dispuestas en tres subcapas: la interna oblicua, la media circular y la externa longitudinal. La última de las tunicas, la más externa, es la serosa peritoneal, formada por una fina capa de tejido conectivo cubierta por una capa de células escamosas, el mesotelio.



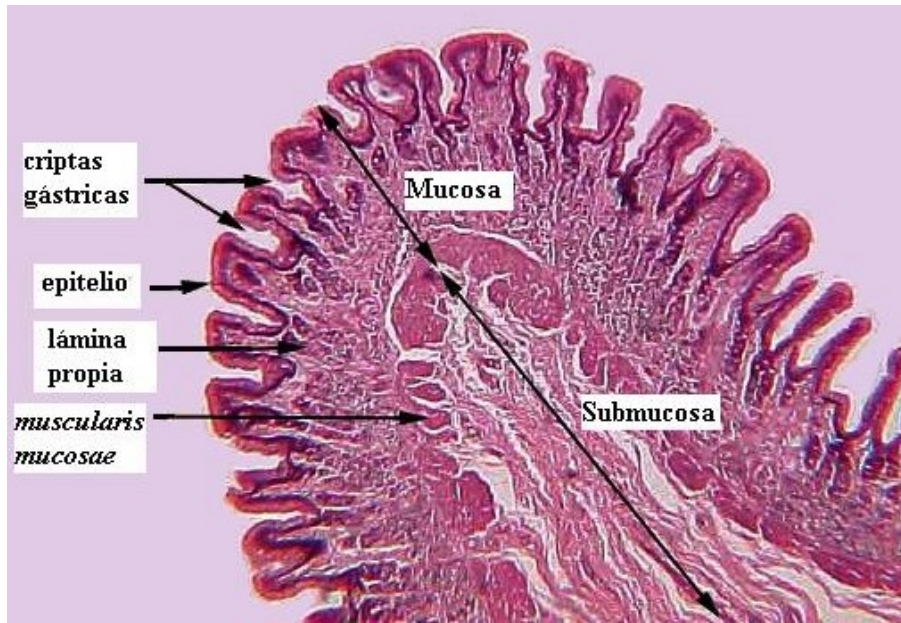
**Figura 2.** Esquema de la constitución histológica de la pared del estómago. Tomado de Geneser (52)

### 1.1.1. La mucosa gástrica.

La mucosa gástrica (Figura 3), capa más interna de la pared del estómago, de aproximadamente 1 mm de espesor, posee una superficie blanda aterciopelada cubierta por una capa lubricante de moco. Al estado fresco presenta un color rosado, que se aclara cerca del cardias y del píloro. En el estómago vacío y contraído la superficie forma numerosos pliegues longitudinales, las arrugas gástricas, que desaparecen cuando el estómago se llena. Una red de cisuras divide la superficie mucosa en pequeños campos convexos, las áreas gástricas, cuyas dimensiones son de 1-6 mm. Con una lupa pueden observarse en cada área pequeños orificios que conducen a cavidades en forma de embudo, las foveolas, fositas o criptas gástricas.

En los cortes histológicos se observa que las criptas están tapizadas por un epitelio cilíndrico simple, al igual que las glándulas que se abren en el fondo de las mismas. Las glándulas gástricas son tubulares simples o ramificadas, se profundizan hasta la *muscularis mucosae* y entre ellas está la lámina propia,

difícil de identificar como entidad independiente porque se divide para ocupar los espacios entre las criptas y las glándulas.



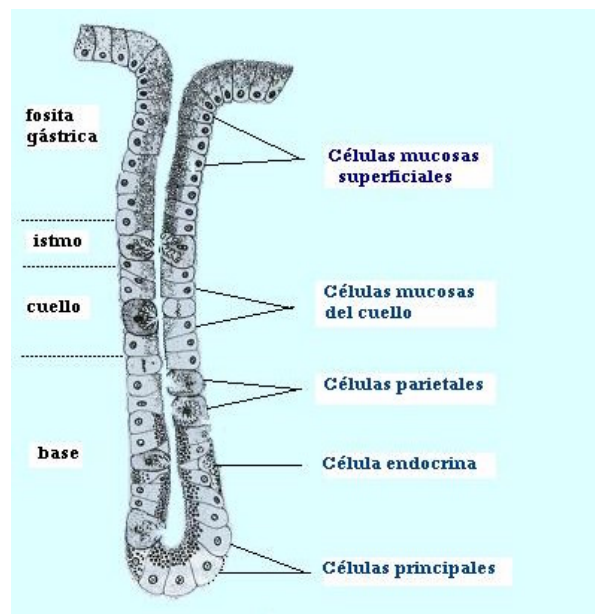
**Figura 3.** Fotografía de un corte histológico de la mucosa gástrica. Modificado de <http://www.sunyniagara.cc.ny.us/val/stomach.html> (157)

En las glándulas corpofúndicas del estómago (Figura 4), denominadas también glándulas oxínticas, distinguimos tres regiones (61): la zona más superficial de confluencia con las foveolas se denomina istmo, el cuello es el estrecho segmento intermedio y, a continuación, más profundamente, se encuentra la base, que constituye la mayor parte de la longitud de la glándula.

Los principales tipos celulares que encontramos en el epitelio de estas glándulas son células parietales u oxínticas que secretan HCl, células principales, pépticas o zimógenas que secretan pepsinógeno, y células mucosas superficiales y células mucosas del cuello que secretan una glucoproteína mucosa. El factor intrínseco es secretado por las células parietales en el hombre, y por las células principales en el ratón (35). El epitelio glandular contiene además células endocrinas que regulan la secreción de ácido a través de mecanismos paracrinos; las más importantes son las

células ECL secretoras de histamina, las células D secretoras de somatostatina y las células EC secretoras de serotonina (15, 71).

En las glándulas de la región antral del estómago las células parietales y las células ECL están ausentes, pero existe un tipo adicional de célula endocrina, la célula G secretora de gastrina (15).



**Figura 4.** Dibujo esquemático de una glándula oxíntica. Modificado de Ito (68).

Una única clase de célula madre multipotencial genera los diferentes tipos celulares del epitelio glandular (35). Las células proliferativas se localizan en la región ístmica de la glándula. Algunas células migran hacia las criptas, convirtiéndose en células superficiales secretoras de moco que sobreviven 2-3 días; otras células de la zona proliferativa se diferencian en células parietales, células principales o células ECL y migran hacia la base de la glándula donde sobreviven 50-190 días.

Separada del epitelio glandular por una delicada membrana basal se encuentra la lámina propia, de tejido conectivo laxo. Contiene vasos

sanguíneos, nervios, células musculares lisas y diferentes células del tejido conectivo (fibroblastos, células plasmáticas, linfocitos, leucocitos polimorfonucleares y mastocitos o células cebadas).

En contacto con la lámina propia se halla la *muscularis mucosae*, una fina capa de células musculares lisas dispuestas en dos o tres subcapas que separa la mucosa gástrica de la submucosa.

### 1.1.2. La célula parietal u oxíntica

El jugo gástrico es extraordinariamente ácido, son posibles incluso valores de pH inferiores a 1. Este ambiente intragástrico se consigue mediante la secreción de un fluido primario de HCl 160 mM por parte de la célula oxíntica o célula parietal (64) localizada en las glándulas de la mucosa gástrica de los mamíferos.

El término célula parietal es el más comúnmente utilizado. Se denomina así a estas células debido a que a menudo protruyen hacia el exterior de las glándulas gástricas y ocupan una posición parietal dentro de las mismas. Sin embargo, el término célula oxíntica, referido a su capacidad de secretar ácido, aunque más apropiado es menos utilizado (102).

En el hombre, las células oxínticas están ampliamente distribuidas en las glándulas del cuerpo del estómago, excepto en la región próxima a la curvatura menor, donde son algo menos numerosas (61). En el *fundus* y en la zona cardial no son tan abundantes como en el cuerpo, y en la región pilórica hay muy pocas células parietales.

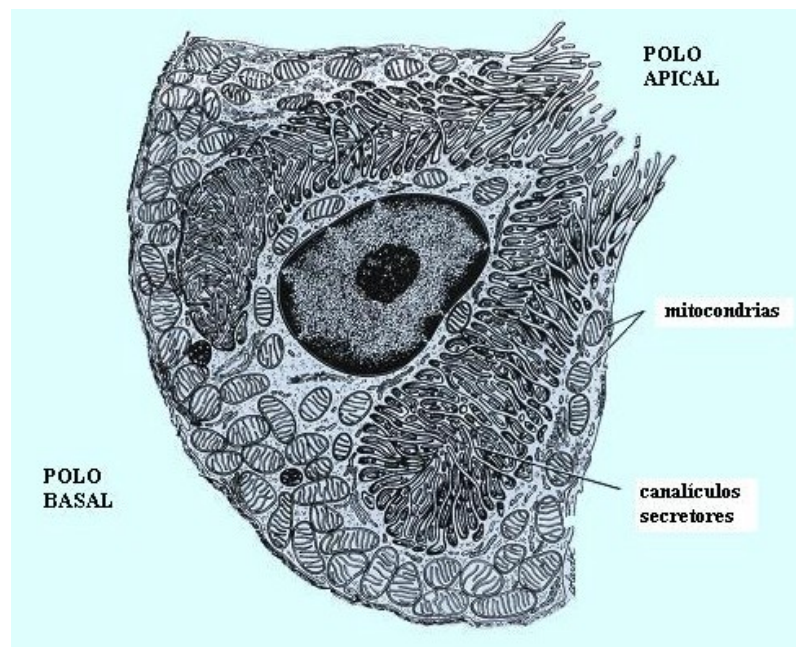
Mediante estudios de microscopía óptica realizados en mucosa oxíntica de ratón, se ha observado que el 13,4% de las células epiteliales presentes en las glándulas son células parietales (63).

Las células parietales de los mamíferos son células grandes ovaladas o piramidales que miden hasta 25  $\mu\text{m}$  de diámetro, y sus bases protruyen en la lámina propia de la mucosa gástrica (68). Están recluidas en concavidades hemisféricas de tejido conjuntivo en las regiones media y basal de las

glándulas oxínticas (102).

Las células oxínticas se tiñen característicamente con colorantes ácidos, tales como la eosina; sin embargo, no son realmente células "acidófilas", y esta coloración no es indicadora directa de actividad secretora de ácido. La gran cantidad de mitocondrias presentes en estas células parece ser la responsable de esta coloración (68).

La célula parietal es una célula epitelial polarizada (Figura 5), por lo tanto distinguimos en su membrana plasmática dos zonas claramente diferenciadas: la región en contacto directo con la luz glandular es la membrana apical, la superficie en contacto con el resto de los tejidos de la mucosa es la membrana basolateral. En ambos casos se trata de una membrana con la típica estructura trilaminar y un grosor aproximado de 10 nm en el caso de la membrana apical y de 7,5 nm en el de la membrana basolateral (61).



**Figura 5.** Dibujo de una célula parietal u oxíntica en estado secretor. Modificado de Ito (68).

La superficie basal y lateral de la membrana plasmática es a veces denominada superficie nutriente y se ha estimado que en mucosa gástrica de rata tiene una extensión aproximada de  $1000 \mu\text{m}^2$  por célula. No obstante, tras la estimulación al máximo de la secreción de ácido en ratón se produce un incremento del 50% en el área de esta membrana (61).

Los bordes laterales de la membrana plasmática están ligeramente interdigitados con las células adyacentes y están unidos a las mismas por diversos mecanismos especializados. El borde basal puede ser liso, pero es más frecuente que forme pliegues de un grosor cercano a 100 nm. Se desconoce el significado funcional de esta especialización basal pero puede que represente una amplificación del área de superficie asociada a la liberación de bicarbonato hacia el sistema circulatorio (68).

En un sentido estricto, la membrana apical de la célula oxíntica es a menudo poco extensa, pero por invaginaciones tubulares que se introducen profundamente en el citoplasma el área de membrana total que rodea la luz glandular, denominada también superficie secretora, consigue adquirir una gran extensión. Las invaginaciones forman los llamados canaliculos intracelulares o canaliculos secretores (61). En ratas mantenidas en ayunas, el área de la membrana secretora se ha estimado en  $900 \mu\text{m}^2$  (61).

Tanto la superficie apical como la canalicular de la membrana está tapizada por numerosas y delgadas microvellosidades (61), que a menudo ocluyen la luz de los canaliculos (104). Cuando se observan desde el lado citoplásmico mediante el microscopio electrónico de barrido, en las células parietales en reposo los canaliculos parecen un sistema arborizado de estructuras semejantes a cactus con numerosos agujeros de 100 nm que representan las bases bulbosas de las microvellosidades (102). Por medio de técnicas de inmunolocalización, se ha demostrado la presencia del enzima transportador de hidrogeniones  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPasa en las microvellosidades apicales y canaliculares de las células parietales (120). La matriz de estas microvellosidades contiene numerosos filamentos de actina (68).

Se ha observado que la superficie provista por las microvellosidades aumenta por lo menos cuatro veces en las células parietales en estado



secretor (102).

La superficie externa de la membrana secretora está recubierta por una delgada capa polisacárida, que representa el glucocáliz. La gran peculiaridad de este glucocáliz es que está compuesto de mucosubstancias neutras y no ácidas, hecho que no se ha visto en ningún otro tipo de célula (68). Se ha propuesto que en realidad tal glicoconjugado sería la subunidad  $\beta$  de la  $H^+,K^+$ -ATPasa (63). Parece ser que el glucocáliz de la membrana plasmática protege a las células parietales del medio ácido presente en la luz glandular (63).

En el citoplasma de la célula oxíntica en reposo existe un característico sistema de membranas denominadas membranas tubulovesiculares o tubulovesículas (102). Estas membranas se localizan principalmente en el citoplasma supranuclear y pericanalicular (61).

La membrana que rodea las tubulovesículas es trilaminar y simétrica. La mayoría de los investigadores están de acuerdo en que tiene un grosor similar a la de la membrana secretora, mientras que en la opinión de otros es ligeramente más fina (61).

La morfología de este sistema membranoso ha sido descrita de forma distinta por unos u otros autores y se ha visto que estas variaciones son debidas a los distintos métodos empleados en la preparación de los tejidos. Algunos métodos de preparación favorecen la presencia de vesículas y otros preservan predominantemente los perfiles tubulares, perfil este último que se sospecha es el más probable en el estado en vivo. En este sentido se ha constatado que cuando se van a procesar las células parietales de mamíferos para su observación al microscopio electrónico un factor crucial a tener en cuenta es la osmolalidad del tampón empleado en las soluciones de fijación. Sólo soluciones fijadoras que contienen tampones de osmolalidad igual o superior a 290 miliosmoles/kg  $H_2O$  consiguen que se retenga una configuración predominantemente tubular; cuando se utilizan tampones de menor osmolalidad predominan las vesículas y las vacuolas (104). Si se utilizan métodos de congelación rápida del tejido vivo y fijación del mismo por congelación-substitución estas membranas citoplásmicas son normalmente de configuración tubular. De esta forma, Pettitt *et al.* (111) han descrito la

presencia de numerosos túbulos helicoidalmente enrollados y densamente empaquetados en el citoplasma de células parietales no estimuladas de rata preparadas mediante el método de congelación rápida. Los enrollamientos helicoidales están unidos entre sí mediante túbulos conectivos relativamente rectos. Estos autores piensan que los túbulos conectivos rectos también se extienden desde enrollamientos adyacentes hasta la superficie apical y canalicular y terminan en las membranas canaliculares apicales, aunque ellos no consiguen demostrar la continuidad de los dos sistemas de membrana. Ogata y Yamasaki (104) aunque no han encontrado enrollamientos helicoidales sí han observado la presencia de túbulos de 100-400 nm y cisternas de 100-600 nm interconectados mediante túbulos de 30-60 nm; además, han demostrado que, en determinadas localizaciones, es claramente visible la continuidad membranosa entre los túbulos y los canaliculos intracelulares.

Diferencias entre las especies animales estudiadas representan otra fuente de variación tanto en el tamaño como en la cantidad de tubulovesículas. En ratones no estimulados las tubulovesículas ocupan entre el 19% y el 40% del volumen citoplásmico, en perros mantenidos en ayunas ocupan el 18% y en humanos en ayunas el 6% (61).

Durante la estimulación de la secreción de ácido, existe una marcada disminución de la superficie tubulovesicular que es cuantitativamente equivalente al incremento en el área de superficie de la membrana apical (61, 65). Después de que la estimulación de la secreción de ácido ha cesado, hay una pérdida en membrana secretoria que es aproximadamente igual a la ganancia en membrana tubulovesicular.

Se ha especulado con que el incremento en el área de superficie de la membrana apical en la célula parietal estimulada ocurre por la expansión osmótica de estructuras tubulovesiculares colapsadas (12) o enrolladas (112). Según esta hipótesis las membranas tubulovesiculares estarían siempre en continuidad física tanto entre sí como con la membrana plasmática apical. En el periodo no secretor, el compartimiento tubulovesicular permanecería en un estado supercolapsado o superenrollado, pero fácilmente se expandiría por las fuerzas osmóticas que acompañan al transporte de HCl y agua en el periodo secretor.

Otra hipótesis alternativa (46, 47) sugiere que durante la estimulación se produce un reclutamiento de membranas a partir de un depósito tubulovesicular hacia la membrana plasmática apical y, posteriormente, cuando cesa el estímulo secretor, son recuperadas o recicladas hacia el compartimiento citoplásmico.

El principal obstáculo que encuentra la teoría de la expansión osmótica para ser aceptada es que existen numerosas evidencias experimentales en su contra. Se han diseñado experimentos en los que se promueve la acumulación de sal y agua en el interior de las tubulovesículas; la respuesta morfológica a esta fuerza osmótica consiste en la formación de grandes vacuolas, pero no ocurre ni aumento de la superficie apical ni disminución del compartimiento tubulovesicular. Por lo que se deduce que la expansión osmótica, *per se*, no conduce a la comunicación entre las tubulovesículas y los canalículos intracelulares (102) En este mismo sentido, Agnew *et al.* (3) observan que la eliminación o reducción de las fuerzas osmóticas de expansión no impide la traslocación de membranas citoplásmicas ricas en  $H^+,K^+$ -ATPasa (tubulovesículas) en la membrana apical.

Por el contrario, existen numerosos datos que apoyan la hipótesis del reclutamiento/reciclaje de las membranas. Se ha publicado que los dos compartimientos membranosos muestran similares propiedades. En este sentido, estudios inmunocitoquímicos localizan el enzima  $H^+,K^+$ -ATPasa tanto en membrana tubulovesicular como en membrana plasmática (104). Además, imágenes de criofractura de estos dos grupos de membrana muestran una distribución similar de partículas intramembrana (104). Recientemente se ha demostrado que el compartimiento tubulovesicular de la célula parietal contiene los importantes componentes de la maquinaria esencial que regula el tráfico de la  $H^+,K^+$ -ATPasa entre los dos sistemas de membrana (105), tales como las pequeñas ATPasas rab11 y rab25, y proteínas implicadas en la separación/fusión vesicular, tales como syntaxina 3 y proteína de membrana asociada a vesículas (VAMP).

Sin embargo, el mecanismo de la transformación de la membrana tubulovesicular en membrana plasmática sin una conexión demostrable entre

ambos sistemas de membrana ha sido un enigma, hasta que Ogata y Yamasaki (103, 104) han verificado la existencia de tal vínculo.

En el momento actual, por lo tanto, la opinión más generalizada es que aunque la hipótesis de la expansión osmótica presenta rasgos interesantes, faltan todavía evidencias experimentales convincentes que la demuestren (102). Por el contrario, la teoría del reclutamiento/reciclaje de las membranas es la más universalmente aceptada (3, 65, 103, 104, 155).

Otra característica fundamental de la morfología de la célula parietal es la presencia en su citoplasma de una gran cantidad de mitocondrias ovas, adyacentes a la membrana plasmática. Estos orgánulos tienen un tamaño aproximado de  $0,5 \times 1 \mu\text{m}$  y ocupan el 22-47% del volumen citoplásmico. El extraordinario gran número de mitocondrias y el hecho de que presenten una membrana interna fuertemente plegada sugieren el alto metabolismo oxidativo de las células parietales (61). Las mitocondrias generan las grandes cantidades de ATP necesarias para el proceso de secreción de ácido (63). La estimulación de la secreción de ácido parece que no induce cambios en la morfología de la mitocondria (68).

El aparato de Golgi está escasamente desarrollado, tal como era de esperar en células que no producen una cantidad significativa de gránulos secretores. Sin embargo, no puede excluirse que desempeñe una función en la síntesis del glucocáliz (61).

Una pequeña cantidad de retículo endoplásmico liso y rugoso se observa frecuentemente en la porción basal del citoplasma. Las membranas del retículo endoplásmico son más finas que las de las tubulovesículas y las de la membrana plasmática. En estudios llevados a cabo en biopsias gástricas humanas se ha localizado el factor intrínseco en la membrana perinuclear, membrana tubulovesicular y en el retículo endoplásmico rugoso (61).

Los lisosomas (cuerpos densos) normalmente se encuentran en pequeño número en las células parietales. Hay a menudo unos pocos cuerpos multivesiculares (cuerpos que contienen vacuolas) en las células parietales a los que se les ha atribuido un papel en la degradación de las mitocondrias

(61).

Los microtúbulos son frecuentemente observados en el citoplasma entre las tubulovesículas, normalmente orientados perpendicularmente a la superficie secretoria (61). Se ha sugerido que pueden desempeñar una función, junto con los microfilamentos de actina, en la conformación de los cambios morfológicos experimentados por la célula parietal durante el proceso de la secreción de ácido (102). Se ha observado que en la formación de las microvellosidades que se proyectan hacia la luz del canalículo secretor están implicadas proteínas del citoesqueleto, principalmente actina y ezrina (85).

Gotas lipídicas, partículas catalasa positivas, partículas de glucógeno, ribosomas libres y polisomas también se encuentran en el citoplasma, pero normalmente en poca cantidad (61). La función de los ribosomas no es conocida, pero es posible que algunos estén implicados en la producción de factor intrínseco (68).

El núcleo es redondo, a menudo con un destacado nucleolo. En algunas especies, incluido el hombre, se observan muchas veces células parietales con varios núcleos (61). Se ha visto que las células parietales que presentan dos núcleos son el doble de grandes que las que tienen sólo uno (62). En mucosa gástrica humana, la estimulación de la secreción de ácido produce una ligera disminución del tamaño medio de la célula parietal y un incremento relativo del volumen nuclear (62).

## **1.2. SECRECIÓN GÁSTRICA DE ÁCIDO**

Tras la estimulación en la célula oxíntica se produce la activación de diversos mecanismos intracelulares, procesos de transformación morfológica y de transporte iónico como consecuencia de los cuales se produce la secreción de una gran cantidad de ácido clorhídrico (HCl).

Este ácido asegura funciones tanto digestivas como de otro orden. Ataca a las fibras del tejido conjuntivo y fibras musculares de los alimentos ricos en proteínas, así como a las cubiertas celulósicas que recubren a polisacáridos como el almidón. Inicia la transformación de pepsinógeno en

pepsina y presta, además, el pH adecuado para la actividad de este enzima. Coadyuva a la regulación de la apertura y cierre del esfínter pilórico. Favorece la absorción de sustancias como el ácido ascórbico y el hierro alimentario. Interviene en la regulación del equilibrio ácido-básico del organismo, pues la producción de ácido clorhídrico entraña la sustracción de valencias ácidas a la sangre. Además, posee un poder bactericida notable.

### **1.2.1. Transporte de iones en la membrana apical de la célula parietal**

#### **La bomba ácida gástrica o $H^+,K^+$ -ATPasa gástrica, y canales iónicos asociados**

La  $H^+,K^+$ -ATPasa presente en las células parietales (oxínticas) gástricas intercambia  $K^+$  luminal por  $H^+$  citoplásmico y es el principal enzima responsable de la acidificación de la luz gástrica (96, 123).

Este enzima es miembro de la familia de las ATPasas tipo P, donde se incluyen, además, otras ATPasas transportadoras de iones tales como  $Na^+,K^+$ -ATPasa y  $Ca^{2+}$ -ATPasa. La denominación "P" significa que para el transporte iónico es necesaria la formación de un intermediario fosforilado.

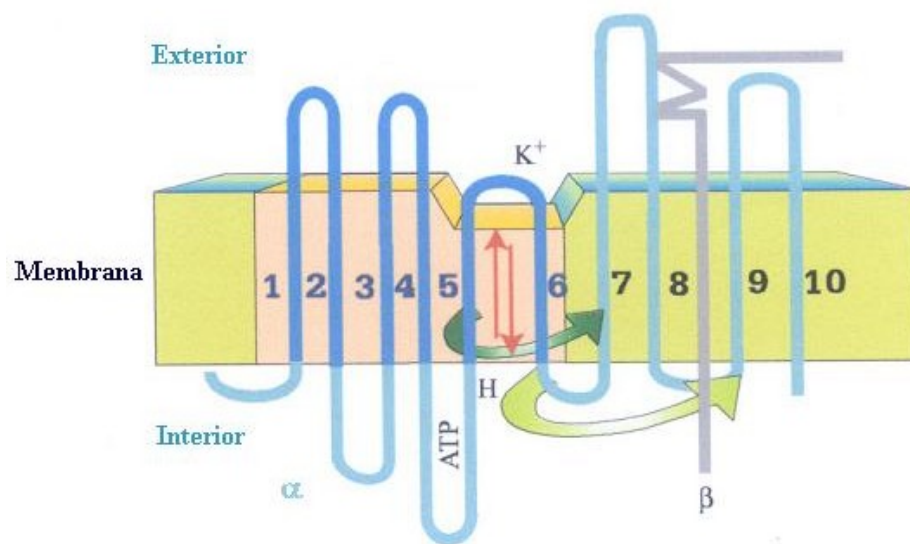
La  $H^+,K^+$ -ATPasa gástrica (Figura 6) está compuesta por dos subunidades unidas de forma no covalente, una  $\alpha$  y otra  $\beta$ , de 95 y 60-90 kilodaltons, respectivamente (96, 123).

La subunidad  $\alpha$  es la responsable de la actividad catalítica (85, 96). Consiste en una secuencia de 1034 aminoácidos anclados en la membrana luminal mediante 8 ó 10 segmentos transmembrana, con el extremo N-terminal dentro del citoplasma. El bucle intracelular contiene el sitio de unión para el ATP. El primer bucle extracitosólico contiene varios ácidos carboxílicos probablemente implicados en la unión al  $K^+$ .

La subunidad  $\beta$  posee 291 aminoácidos y atraviesa la membrana sólo una vez (85, 96). Su extremo extracelular es largo y está plegado cubriendo la subunidad  $\alpha$  parcialmente. Scarff *et al.* (123) han demostrado que, además

de para la normal secreción de ácido de las células parietales en vivo, es fundamental para el buen desarrollo y homeostasis celular de la mucosa gástrica y para la correcta estructuración de las membranas secretorias de las células parietales.

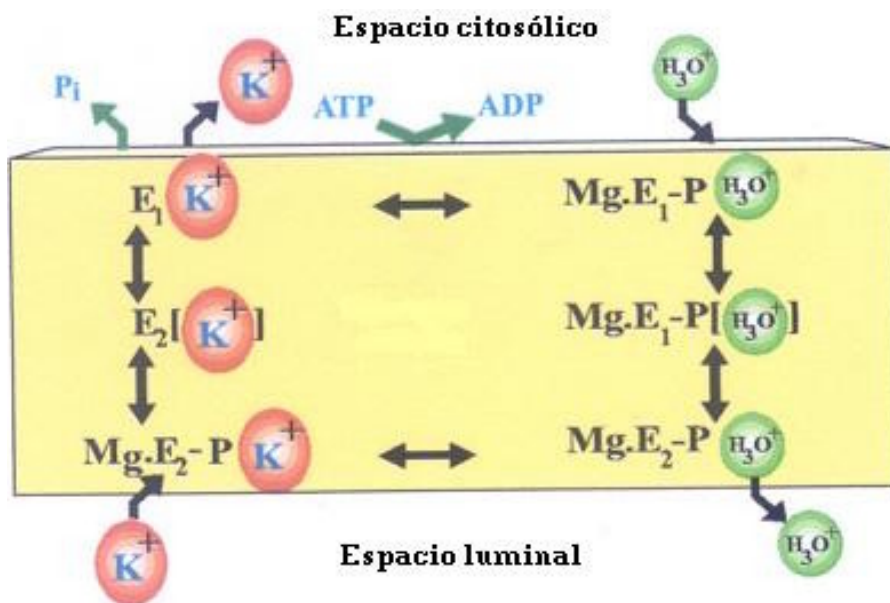
Estudios bioquímicos y estructurales sugieren que la  $H^+,K^+$ -ATPasa es un heterodímero dimérico  $(\alpha\beta)_2$  (74).



**Figura 6.** Diagrama de la topografía y de la estructura de la  $H^+,K^+$ -ATPasa gástrica. Tomado de Munson (96).

La  $H^+,K^+$ -ATPasa regula el transporte de  $H^+$  a través de la membrana del canalículo secretor utilizando como fuente de energía la hidrólisis del ATP. Esquemáticamente, el proceso del ciclo catalítico (Figura 7) es como sigue (85, 96): 1) en su forma defosforilada,  $E_1$ , el enzima reacciona con el espacio citosólico para unir  $H^+$  y ATP (junto con  $Mg^{2+}$ ); 2) el enzima adquiere la forma fosforilada,  $E_2$ , que reacciona con el espacio luminal para liberar  $H^+$  y unir  $K^+$ ; 3) la unión del  $K^+$  inicia la defosforilación del enzima, el cual retorna a la forma  $E_1$  y libera  $K^+$  en el citosol. Como se ha apuntado anteriormente, la célula parietal es especialmente rica en mitocondrias y por lo tanto produce gran cantidad de ATP mediante la fosforilación oxidativa. El ión  $H^+$  que va a ser transportado se origina tras la escisión de una molécula de agua en  $H^+$  y  $OH^-$  como consecuencia de la hidrólisis del ATP (aunque en realidad es el ión

hidronio  $\text{H}_3\text{O}^+$  el que es preferiblemente transportado en vez del  $\text{H}^+$ ). El  $\text{OH}^-$  restante es carbonatado por el  $\text{CO}_2$  que proviene de la respiración mitocondrial y transformado en  $\text{H}_2\text{CO}_3^-$ , subsiguientemente liberado en el polo basal en intercambio con  $\text{Cl}^-$ . El ión  $\text{K}^+$  luminal requerido como ión para contrarrestar el  $\text{H}^+$  es transportado desde el citosol de la célula parietal hacia la luz canalicular a través de un canal funcionalmente acoplado al canal del  $\text{Cl}^-$ . Por lo tanto, ya que el  $\text{K}^+$  es reciclado dentro de la célula por la reacción de transporte de  $\text{H}^+$ , el proceso en conjunto es electroneuro y conduce a la secreción neta de  $\text{H}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , es decir  $\text{HCl}$ , en el estómago (Figura 8).



**Figura 7.** Esquema del ciclo catalítico de la  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPasa gástrica. Tomado de Munson (96).

La bomba ácida gástrica es como se ha dicho electroneutra, es decir, se intercambian igual número de iones hidrógeno e iones potasio y no hay movimiento neto de carga. Se ha debatido, sin embargo, sobre el número de iones hidrógeno e iones potasio transportados por cada ATP hidrolizado. En condiciones fisiológicas, la bomba ácida gástrica puede mover iones hidrógeno en contra de un gradiente superior a un millón de veces desde el citosol de la célula parietal (pH 7) a la luz glandular gástrica (pH 0,8). Un menor gradiente de potasio, aproximadamente multiplicado por 30, se opone a la captación de potasio hacia el interior de la célula. Sólo la energía libre disponible en una



molécula de ATP es suficiente para mover un ión hidrógeno y un ión potasio en contra de estos gradientes. Sorprendentemente, se han publicado evidencias experimentales de  $2\text{H}^+/\text{ATP}$  y  $2\text{K}^+/\text{ATP}$  (115, 133). En estos experimentos *in vitro*, sin embargo, el gradiente de ión hidrógeno en contra era mucho menor que el presente *in vivo*. Por consiguiente, parece que la bomba ácida gástrica puede alterar su estequiometría de transporte dependiendo de los gradientes de ión opuestos. No obstante, otros estudios *in vitro* han informado una estequiometría de  $1\text{H}^+/1\text{K}^+/\text{ATP}$  (99, 117). Por lo tanto, hasta que las diferencias entre estos hallazgos experimentales puedan explicarse, parece que la cuestión de la estequiometría variable permanece abierta.

La secreción de ácido es un proceso discontinuo cuya velocidad es determinada por su necesidad tras una comida (64).

A diferencia de la regulación de la mayoría de otros enzimas, aparte de la disponibilidad de los substratos necesarios ( $\text{Mg}^{2+}$ -ATP,  $\text{H}^+$  y  $\text{K}^+$ ) no hay evidencia de que otros factores químicos influyan directamente en la actividad de la  $\text{H}^+,\text{K}^+$ -ATPasa. Debido a que en el interior de la célula parietal la disponibilidad de protones y  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP probablemente no está limitada, se deduce que el mayor, si no el único, factor que controla el transporte de protones es la disponibilidad de  $\text{K}^+$  en la superficie extracitosólica de la  $\text{H}^+,\text{K}^+$ -ATPasa. Existen evidencias sustanciales indicadoras de que la activación de la bomba de protones resulta de la asociación de la  $\text{H}^+,\text{K}^+$ -ATPasa con una permeabilidad  $\text{K}^+$  en la membrana del canalículo secretorio (64).

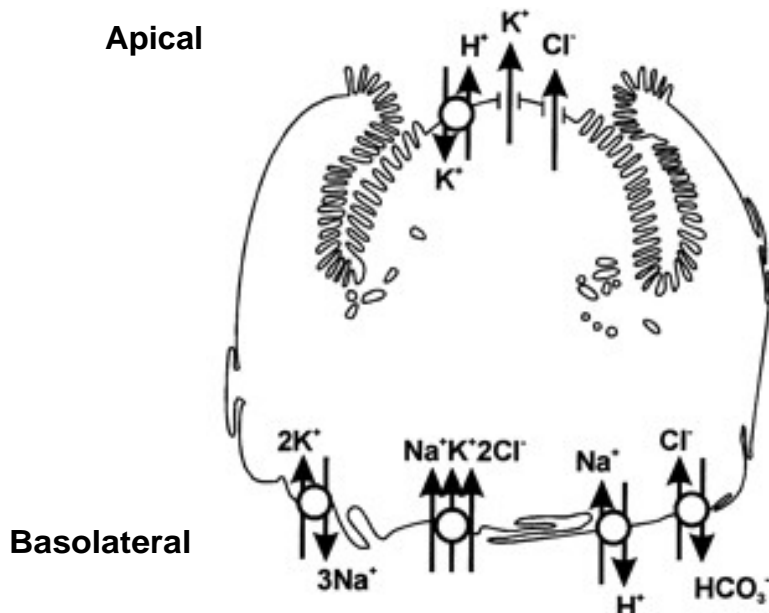
### **La anhidrasa carbónica**

Para proveer de una fuente de iones hidrógeno a la bomba ácida, la célula parietal contiene cantidades significativas del enzima anhidrasa carbónica. Este enzima cataliza la interconversión de agua y dióxido de carbono en iones hidrógeno ( $\text{H}^+$ ) y bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ). Por cada ión hidrógeno formado y secretado a través de la membrana apical, un ión bicarbonato es formado en el citoplasma. Estudios citoquímicos han mostrado que la anhidrasa carbónica está localizada tanto en la membrana basolateral como en la membrana secretora de ácido de la célula parietal, particularmente en el centro de las microvellosidades que se proyectan hacia los canalículos

secretores (63).

### 1.2.2. Transporte de iones en la membrana basolateral de la célula parietal y homeostasis

En ausencia de otros mecanismos, la actividad combinada de los transportadores del polo apical de la célula parietal conduciría a la rápida alcalinización de la célula y a la pérdida de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$  celular. Estos potenciales trastornos en el balance electrolítico se previenen mediante la actividad de los transportadores presentes en la membrana basolateral. Entre estos se incluyen un intercambiador de aniones (AE), un intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE), y la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (64, 132, 134). Un modelo general que representa los componentes implicados en el mantenimiento de la homeostasis de la célula parietal se representa en la Figura 8.



**Figura 8.** Transportadores apicales y basolaterales requeridos para la secreción de HCl y mantenimiento de la homeostasis en la célula parietal. Tomado de Shull (134).

### **1.2.3. Secreción funcional de ácido**

Cuando la secreción de ácido se estimula, la bomba ácida gástrica se inserta en la membrana secretoria y se activan los canales del potasio y del cloro. Esto le permite al KCl fluir al canalículo secretorio a favor de un gradiente de concentración. Después los iones potasio se intercambian con iones hidrógeno por la bomba, conduciendo a la secreción neta de HCl (63). No se ha encontrado una activación directa de la bomba ácida gástrica asociada a la estimulación de la secreción de ácido. La actividad de la bomba parece estar regulada simplemente por la disponibilidad de potasio en su superficie extracelular.

Una vez que la concentración global de iones en el canalículo secretorio excede a la del citoplasma, el agua es osmóticamente arrastrada hacia el canalículo. De esta manera, se inhibe la secreción de la célula parietal para que ésta sea isotónica con el citoplasma. Asumiendo un intercambio completo de iones hidrógeno e iones potasio, se produciría una secreción de HCl 160 mM.

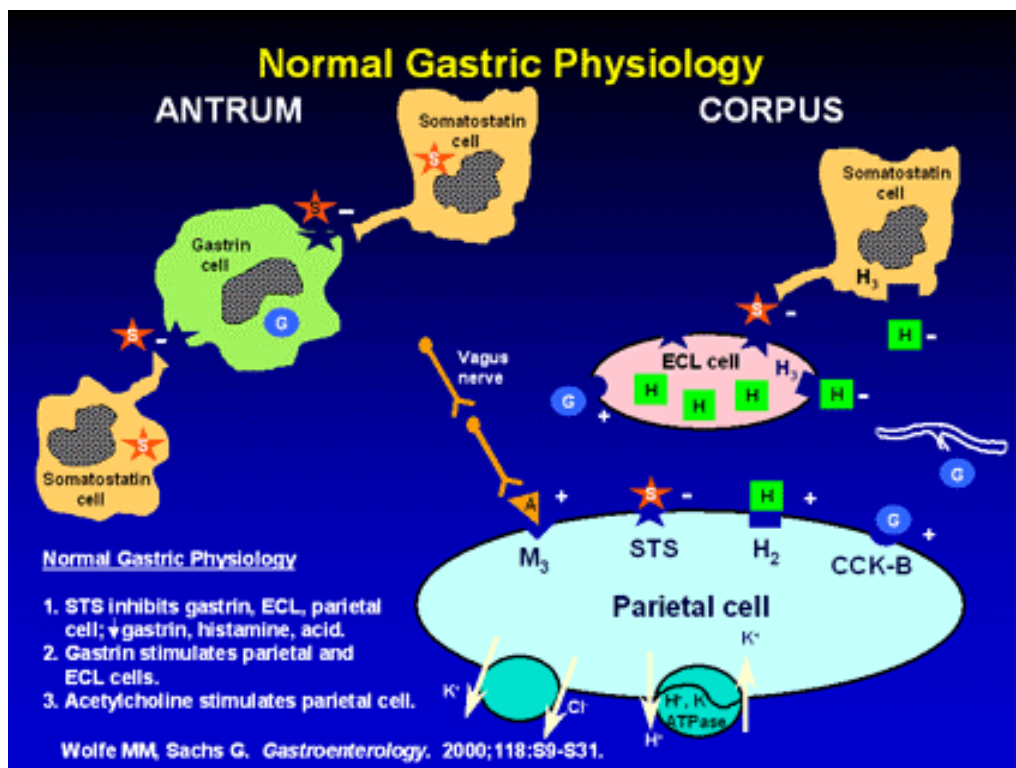
El transporte de potasio por la bomba hacia el interior de la célula mantiene el gradiente de concentración a través de la membrana secretoria por lo que el cloruro potásico puede fluir. El flujo incesante de agua hacia el canalículo aumenta la presión hidrostática, lo que a su vez conduce al flujo de secreciones hacia la luz de la glándula gástrica y hacia la luz del estómago.

### **1.3. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN GÁSTRICA DE ÁCIDO**

La regulación de la secreción gástrica de ácido es un proceso muy complejo en el que están implicados factores de regulación internos y externos que producen estimulación o inhibición directa o indirecta de la secreción de ácido. El método más tradicional de análisis consiste en dividir este proceso en tres fases: una "fase cefálica", que representa la iniciación de la secreción a través de mecanismos centrales, una "fase gástrica", cuando el alimento llega al estómago, y una "fase intestinal", que describe los sucesos que acontecen cuando el alimento predigerido y ácido entra en el duodeno. Estas fases no ocurren de una forma estrictamente secuencial puesto que los elementos de

control nervioso central y los de control periférico están integrados a todos los niveles durante el proceso entero de la ingesta del alimento. Por lo tanto, actualmente la descripción de tres fases separadas no se considera enteramente apropiada para describir los complejos mecanismos que regulan la secreción de ácido (128).

En lo que sí se está de acuerdo es en que la etapa crucial en el proceso de la secreción gástrica es la activación de las células parietales productoras del ácido gástrico. Por ello serán descritos, a continuación, los mecanismos de regulación más relevantes que actúan sobre esta célula (Figura 9) (128, 152).



**Figura 9.** Esquema de los principales mecanismos que intervienen en la regulación de la secreción gástrica de ácido. Tomado de Wolfe y Sachs (152).

### 1.3.1. Mecanismos de control que actúan sobre la célula parietal

Las células oxínticas expresan en la membrana basolateral diferentes receptores acoplados a la proteína G que modulan su actividad (128), los más importantes de los cuales son el receptor  $H_2$  de histamina, el receptor  $CCK_2$  (ó CCK-B) de gastrina/colecistoquinina, el receptor  $M_3$  de acetilcolina y el receptor  $sst_2$  de somatostatina.

**Gastrina.** *La estimulación de la secreción de ácido por la gastrina está mediada por la liberación de histamina en las células ECL.* La gastrina cumple todos los criterios de una hormona gastrointestinal clásica. Es liberada por las células G, pasa a la circulación, y es transportada hasta su principal célula diana, la célula ECL, donde activa el receptor  $CCK_2$ . Esta activación desencadena la liberación de histamina, la cual activa el receptor  $H_2$  de la célula parietal (130). Por una vía alternativa, la gastrina activa directamente el receptor  $CCK_2$  de la célula parietal, estimulando así directamente la secreción de ácido (130). Aunque esta activación directa de la célula parietal ocurre en diversas especies, incluida la humana, su papel fisiológico es probablemente poco importante (128).

**Histamina.** *La histamina es el principal mediador de la estimulación de la secreción de ácido en humanos.* Distintos secretagogos fisiológicos y farmacológicos convergen en la activación de las células ECL, produciendo así la liberación de histamina (128). Aunque las células ECL solamente suponen el 0,5-1% de todas las células de la mucosa oxíntica, representan el tipo de célula endocrina/paracrina principal del cuerpo y fundus gástrico (128, 131). La activación de estas células se considera el paso más importante de la transducción de la señal desde la célula G hasta su célula blanco final, la célula parietal (128).

*Fuentes de histamina.* Los dos tipos de células que sintetizan, almacenan, y secretan histamina en la mucosa oxíntica son los mastocitos o células cebadas y las células ECL. Aunque los mastocitos contienen gran cantidad de histamina en la mucosa fúndica en humanos y perros (más del 50% de la cantidad extraíble total) y median una vía secretoria en algunas especies, no parece que desempeñen un papel importante en la estimulación

de la secreción de ácido en condiciones fisiológicas normales en humanos. No obstante, es posible que participen en la modulación de la secreción de ácido en caso de inflamación de la mucosa, como ocurre en la gastritis por *Helicobacter pylori*, u otros estados inflamatorios o alérgicos (128).

Las células ECL son, por lo tanto, la fuente principal de histamina en respuesta a estímulos fisiológicos (128).

*Receptores en la célula ECL.* Las células ECL aisladas de rata expresan el receptor CCK<sub>2</sub> de gastrina/CCK que representa la vía secretagoga más importante en la célula ECL (128). La gastrina, actuando a través de estos receptores CCK<sub>2</sub>, libera histamina, activa la enzima histidina decarboxilasa implicada en la síntesis de histamina a partir de histidina, e induce la proliferación de las células ECL (131). En la célula ECL existen además otros receptores que participan en la regulación de la liberación de histamina (128, 131). Entre los receptores que estimulan la liberación de histamina están el receptor muscarínico tipo M<sub>1</sub> que es activado por acetilcolina y agonistas M<sub>1</sub>, un subtipo de receptor β-adrenérgico que responde a la adrenalina, y el receptor PCA1 del polipéptido hipofisario activador de la adenilato ciclasa (PACAP). Entre los receptores acoplados a vías inhibitorias están el receptor de somatostatina subtipo sst<sub>2</sub> y el receptor de histamina H<sub>3</sub>.

El principal inhibidor fisiológico de la célula ECL parece ser la somatostatina (SST). El lugar de origen más probable de la somatostatina que actúa en la mucosa oxíntica es la célula D fúndica, que segrega somatostatina de forma paracrina. Una segunda fuente de somatostatina la constituyen las fibras nerviosas submucosas fúndicas que pueden secretar este péptido como regulador local neurocrino. Una tercera fuente de la somatostatina que actúa en la mucosa oxíntica es la célula D antral, que secreta el péptido a la circulación sanguínea local o sistémica, alcanzando la mucosa fúndica, por lo tanto, a través de la circulación como una hormona (vía endocrina). La microanatomía de las células D, tanto en el antro como en el cuerpo del estómago, sugiere que predomina el modo de acción paracrino, ya que estas células han desarrollado pequeñas prolongaciones parecidas a axones que proyectan a las células vecinas, entre ellas células ECL y células parietales en el *fundus* y células G en el antro (128).

Además, parece que la célula ECL ha desarrollado un mecanismo de retroinhibición autocrino que limita la liberación de histamina por medio de la histamina misma. La histamina activa el receptor de histamina  $H_3$  localizado en la célula ECL, lo que inhibe la liberación de histamina inducida por la gastrina, mientras que los antagonistas del receptor  $H_3$  la aumentan (128, 129).

Aunque las prostaglandinas no modifican la liberación basal de histamina en células ECL aisladas de rata, la prostaglandina  $E_1$  ( $PGE_1$ ) y la prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) inhiben la liberación de histamina estimulada por gastrina y por PACAP. El orden de potencia de distintos análogos de prostaglandina sugiere que el receptor de prostaglandina presente en la célula ECL es del subtipo  $EP_3$  (130).

*La histamina es el mediador final común de la secreción de ácido mediante la activación del receptor  $H_2$  presente en la célula parietal.* De los cuatro receptores de histamina conocidos ( $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$  y  $H_4$ ), el receptor  $H_2$  es crucial en la regulación de la secreción gástrica de ácido (128, 130). Se han desarrollado potentes antagonistas  $H_2$  para inhibir la secreción de ácido basal y estimulada por comida en humanos. Entre 1970 y 1990 estas drogas revolucionaron rápidamente la terapia de las enfermedades pépticas relacionadas con el ácido debido a que proporcionaban una potente inhibición temporal de la secreción de ácido. El hallazgo de que los antagonistas del receptor  $H_2$  casi abolían la secreción de ácido estimulada por gastrina o comida mediante el bloqueo del receptor presente en la célula parietal, proporcionaba un gran apoyo a la teoría de que la histamina es el mediador final común de la estimulación de la secreción de ácido (128).

**Acetilcolina (ACh).** La acción de la ACh sobre la secreción gástrica de ácido en la mucosa oxíntica del estómago humano es compleja y no está completamente dilucidada. Se ha debatido sobre si la acetilcolina, liberada por las neuronas intramurales en el fundus gástrico, actúa predominantemente a través de receptores muscarínicos  $M_3$  presentes en la célula parietal o a través de la liberación de histamina por las células ECL. El incremento en la secreción de ácido inducida por el agente muscarínico carbacol no se acompañaba de liberación de histamina o incremento del enzima histidina decarboxilasa en

ratas y en perros. Además, se ha visto que sólo una minoría de células ECL responden al carbacol, Estos datos en conjunto sugieren que la secreción de ácido inducida por acetilcolina es debida a un efecto directo sobre la célula parietal y no depende de la liberación de histamina por las células ECL (130).

**Somatostatina fúndica.** *La somatostatina es un potente inhibidor de la secreción gástrica de ácido en la mucosa oxíntica.* La somatostatina secretada por las células D antrales y fúndicas ejerce una inhibición dual: en la liberación de gastrina antral (interacción célula D-célula G) y en la secreción de la célula parietal fúndica (interacción célula D-célula P). Al contrario que en el antro, las células D fúndicas son del tipo cerrado, no estableciendo contacto con la luz gástrica. Puesto que estas células son incapaces de detectar la acidez real del jugo gástrico, su principal acción es ejercer una inhibición tónica de la liberación de histamina en las células ECL y de la secreción de ácido en las células parietales, mediante la activación de los receptores  $sst_2$  presentes en dichas células (128, 131). Las células D fúndicas expresan distintos receptores en su superficie, la mayoría de los cuales son receptores colinérgicos de los subtipos  $M_2$  y  $M_4$ , que inhiben la liberación de somatostatina, y el receptor  $CCK_1$  (CCK-A), al que se une específicamente con una alta afinidad la colecistoquinina (CCK) pero no la gastrina, que estimula la liberación de somatostatina (128).

*Las enterogastronas inhiben la secreción de ácido mediante la estimulación de la liberación de somatostatina.* El término "enterogastronas" fue introducido para describir el factor(es) intestinal indefinido responsable de la inhibición de la secreción gástrica de ácido tras la ingesta de grasa .

Entre los candidatos a enterogastronas se incluyen colecistoquinina (CCK), secretina, neurotensina (NT), péptido YY (PYY), péptido intestinal vasoactivo (VIP), polipéptido hipofisario activador de la adenilato ciclasa (PACAP), polipéptido inhibidor gástrico (GIP), péptidos símil-glucagon 1 y 2 (GLP-1, GLP-2) y enteroglucagon (128, 131).

La mayoría de las enterogastronas ejercen su acción inhibidora sobre la secreción de ácido indirectamente, mediante la estimulación de la liberación de somatostatina por las células D (128).



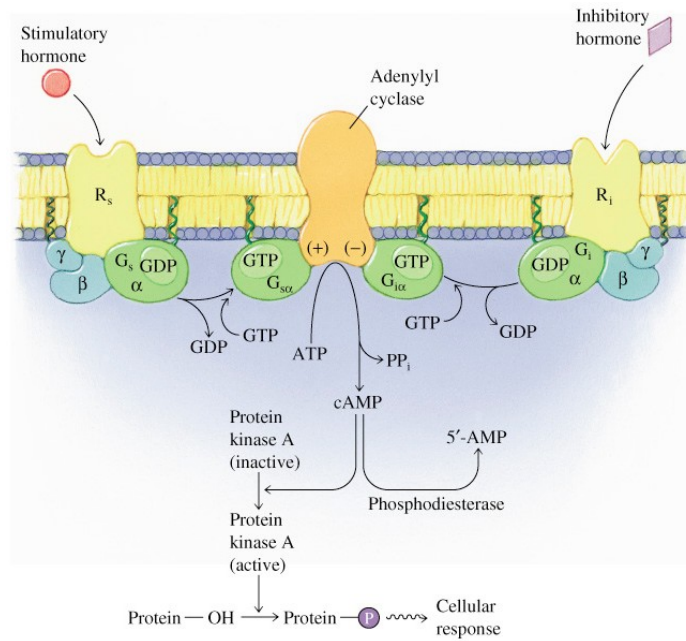
**Otros factores.** Las prostaglandinas, principalmente  $\text{PGE}_2$ , inhiben directa y específicamente la secreción gástrica de ácido estimulada por histamina, actuando posiblemente sobre un receptor  $\text{EP}_3$  presente en la membrana plasmática de la célula parietal (143). La adenosina estimula y el ATP inhibe la secreción gástrica de ácido en preparaciones de glándulas y en preparaciones de células parietales de mucosa gástrica de conejo (4, 5, 53-56).

### 1.3.2. Mediadores intracelulares en la célula parietal

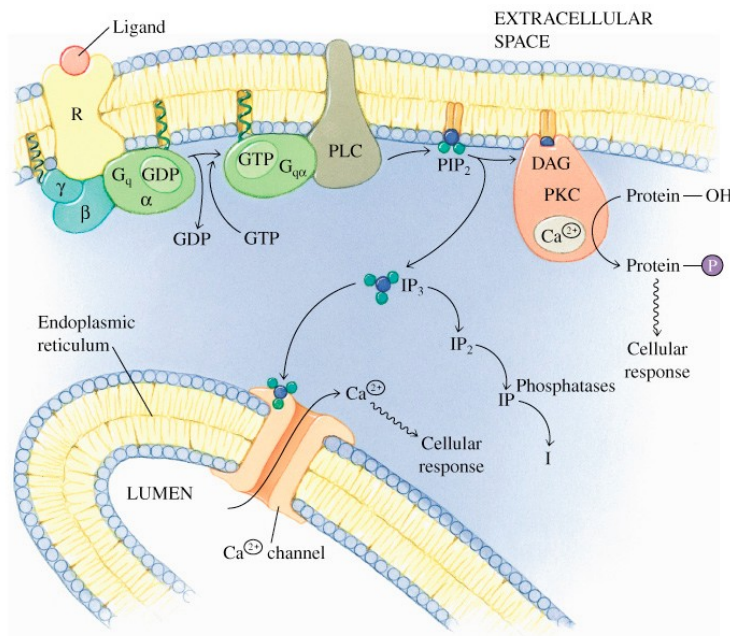
Como se ha descrito previamente, la célula parietal gástrica es una compleja estructura biológica controlada por una gran variedad de hormonas y neurotransmisores. Estos agentes interactúan con receptores específicos presentes en la superficie celular y, como consecuencia, se produce un flujo de información hacia el núcleo de la célula mediante muy complejas y organizadas vías de transducción. En el núcleo se activan procesos específicos de transcripción que conducen a la expresión de funciones celulares especializadas. Se han estudiado y caracterizado numerosas vías de transducción en las células parietales gástricas.

Una de ellas es la vía de los receptores asociados al enzima adenilato ciclasa (33). Tales receptores están acoplados a proteínas G que, en cada caso, inhiben ( $G_i$ ) o estimulan ( $G_s$ ) la actividad adenilato ciclasa. El incremento de la actividad de este enzima aumenta los niveles de AMPc citoplasmáticos (Figura 10). Como consecuencia, se produce la activación de proteína quinasa dependientes del AMPc, tales como proteína quinasa A (PKA), que fomentarán la fosforilación de diversas proteínas intracelulares: ezrina, canales de  $\text{Cl}^-$  y canales de  $\text{K}^+$ .

Una segunda cascada importante de transducción de mensajeros intracelulares es aquella en la que intervienen los fosfolípidos de membrana, especialmente los fosfolípidos inositol (33). Los receptores están unidos a esta vía a través de una proteína G ( $G_q$ , probablemente) cuya activación conduce a la hidrólisis del fosfatidilinositol bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ) (Figura 11); la reacción es catalizada por la fosfolipasa C y los productos de la misma son el diacilglicerol (DAG) y el inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ). El  $\text{IP}_3$  origina el incremento de los niveles



**Figura 10.** Esquema de la vía de la adenilato ciclasa. Tomado de [http://cwx.prenhall.com/horton/medialib/media\\_portfolio/text\\_images/FG09\\_43\\_90201.JPG](http://cwx.prenhall.com/horton/medialib/media_portfolio/text_images/FG09_43_90201.JPG) (158)



**Figura 11.** Esquema de la vía de los fosfolípidos inositol. Tomado de [http://cwx.prenhall.com/horton/medialib/media\\_portfolio/text\\_images/FG09\\_46\\_90202.JPG](http://cwx.prenhall.com/horton/medialib/media_portfolio/text_images/FG09_46_90202.JPG) (159)

de calcio citosólicos, y el DAG promueve la traslocación de una proteína quinasa  $\text{Ca}^{2+}$ -fosfolípido-dependiente (como la proteína quinasa C) desde el citoplasma hasta su sitio activo en la membrana celular. El incremento de la concentración intracelular de calcio ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) activa diversos enzimas calcio-dependientes, tales como calmodulina quinasa, y promueve la traslocación y activación de proteína quinasa C (PKC).

Aunque clásicamente se ha descrito que la activación del receptor está unida a una única cascada de transducción, es evidente que puede ocurrir una interacción entre las diversas vías mediadoras (33).

La estimulación de la secreción de ácido provocada por la histamina sería mediada principalmente por la activación de la adenilato ciclasa en las células parietales (143). No obstante, la estimulación del receptor de histamina  $\text{H}_2$  en células parietales de perro puede conducir, además, a un aumento de los niveles de  $\text{IP}_3$  y  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a través de una vía independiente (33).

La activación de los receptores  $\text{M}_3$  de acetilcolina y de los receptores  $\text{CCK}_2$  de gastrina incrementa la formación de  $\text{IP}_3$  y DAG en las células parietales (143). Como se ha comentado anteriormente, el aumento de  $\text{IP}_3$  elevaría la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, lo que conduciría a la activación de diversas cascadas enzimáticas, entre ellas la de la calmodulina quinasa; y el DAG, por su parte, activa la PKC.

Se ha demostrado que el carbacol puede conducir a la activación de la proteína quinasa II dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (CaMKII) en las células parietales (33). Debido a que CaMKII regula la función del citosqueleto, esta proteína quinasa podría jugar un papel en las dramáticas transformaciones morfológicas que sufren las células parietales durante su estimulación.

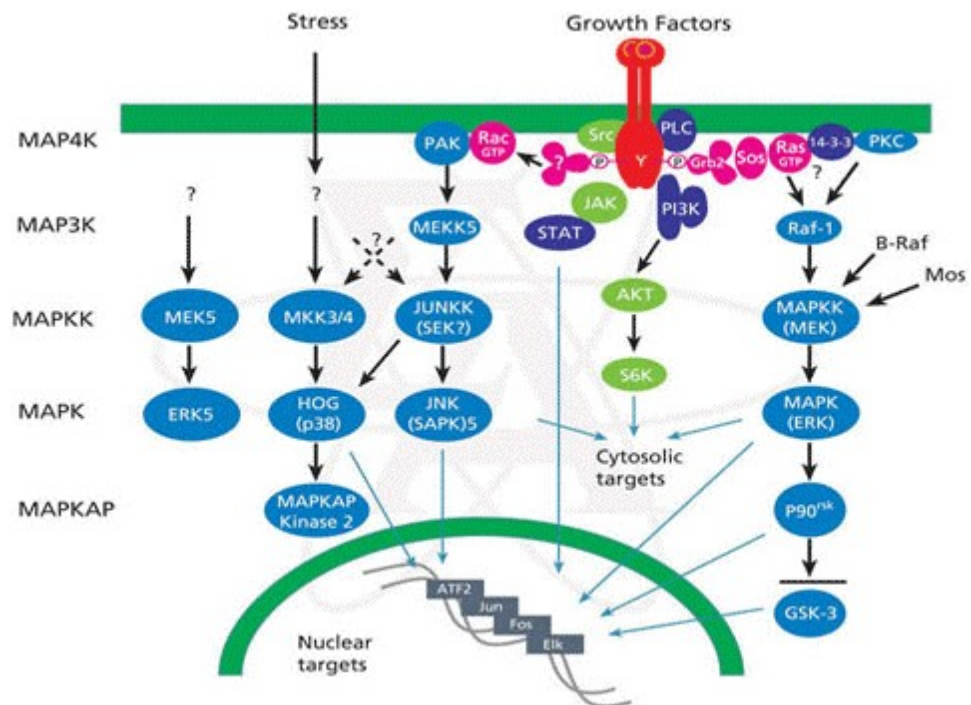
La acción de PKC en las células parietales es compleja (33). La activación directa del PKC por ésteres de forbol produce un aumento en la actividad secretora ácida. La inhibición del PKC por el inhibidor específico Ro 31-8220 bloquea la captación de aminopirina estimulada por el carbacol en células parietales aisladas de rata. Sin embargo, el pretratamiento de las

células parietales caninas con ésteres de forbol disminuye los efectos estimuladores del carbacol y la gastrina, mientras que Ro 31-8220 potencia la captación de  $^{14}\text{C}$ -aminopirina en glándulas gástricas de conejo estimuladas tanto por carbacol como por histamina. Numerosos factores pueden ser responsables de estas observaciones contradictorias. Uno de ellos es que la proteína quinasa C puede inducir la regulación de los receptores muscarínicos y de los receptores de gastrina en las células parietales; el mecanismo de este efecto no está claro pero puede deberse a la fosforilación del receptor. Además, debido a que PKC comprende una gran familia de proteínas con diferentes propiedades bioquímicas y funcionales, pueden existir diferencias específicas de especie tanto en la función como en la localización celular de las isoformas de la proteína quinasa C. Se han analizado los diferentes subtipos de proteína quinasas C presentes en las células parietales de conejo y se ha observado que abundan las isoformas PKC- $\epsilon$ , PKC- $\mu$ , PKC- $\iota$ , PKC- $\lambda$  y PKC- $\zeta$  y que las células parietales de conejo también expresan bajos niveles de las isoformas PKC- $\alpha$  y - $\beta$ . El PKC- $\epsilon$  se localiza en un compartimiento de la célula parietal que contiene filamentos de actina, por lo que se ha sugerido que la proteína quinasa C podría inhibir la secreción gástrica de ácido mediante la fosforilación y modificación de proteínas del citosqueleto.

Además de estas vías de transducción bien establecidas, estudios recientes han indicado que las células parietales de los mamíferos contienen múltiples miembros de una familia de proteínas recientemente descubierta y conocida como proteína quinasas activadas por mitógenos o proteína quinasas reguladas por mediadores extracelulares (MAPKs/ERKs) (129-131).

La activación de MAPKs/ERKs fue inicialmente descrita en la estimulación celular originada por el factor de crecimiento epidérmico (EGF). La activación del receptor EGF por el ligando específico induce la dimerización del receptor y la autofosforilación de sus residuos de tirosina, lo cual conduce al ensamblaje de un complejo multiproteico capaz de activar distintas moléculas mediadoras, entre ellas las proteína quinasas de la familia Raf. Estas proteínas Raf activan las quinasas MAPK, las cuales fosforilan y activan las MAPKs. Las MAPKs/ERKs son proteína quinasas que fosforilan numerosas proteínas celulares, entre las que se incluyen quinasas finales (quinasa S6 de 90-kd) y factores de transcripción (Elk-1, Sap-1) que regulan la transcripción

del gen *c-fos* (Figura 12). La activación de la función genética y de las proteína quinasas finales conduce al crecimiento, a la proliferación y a la diferenciación celular.



**Figura 12.** Esquema de la vía de las MAPKs. Tomado de [http://www.sigmaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/Life\\_Science/Cell\\_Signaling/Pathway\\_Slides\\_and\\_Charts/Mitogen\\_activated\\_Protein\\_Kinase\\_Cascades.html](http://www.sigmaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cell_Signaling/Pathway_Slides_and_Charts/Mitogen_activated_Protein_Kinase_Cascades.html) (160)

Los secretagogos del ácido gástrico pueden regular la actividad ERK (33). El carbacol es el más potente inductor de la actividad ERK2 en células parietales gástricas de perro, la gastrina y EGF tienen efectos estimuladores más débiles, y la histamina no produce ningún efecto. Tanto el carbacol como EGF inducen las ERKs en células parietales aisladas de conejo.

Se ha explorado el mecanismo por el cual la somatostatina inhibe la secreción de ácido en las células parietales. Por un lado, parece ser que la somatostatina inhibe la generación de AMPc a través de una proteína G inhibidora que regula la actividad de la adenilato ciclasa. Por otra parte, la somatostatina actuaría en un sitio distal de la activación de las cascadas de transducción intracelulares. En este sentido, se ha observado que la

somatostatina inhibe la inducción de la transcripción del gen *c-fos* en células parietales de perro estimuladas tanto por carbacol como por histamina (33).

### **1.4. ATP EXTRACELULAR Y SECRECIÓN GÁSTRICA DE ÁCIDO**

#### **1.4.1. ATP extracelular y receptores P2Y**

Las purinas (adenosina, ADP, y ATP) y pirimidinas (UDP y UTP) extracelulares son importantes moléculas transductoras que median diversos efectos biológicos a través de receptores de superficie celular denominados en un principio "purinoceptores" (116).

Los receptores "purinérgicos" fueron reconocidos oficialmente en primer lugar por Burnstock en 1978 (21), cuando propuso que éstos podían ser divididos en los denominados "purinoceptores P<sub>1</sub>", en los cuales la adenosina es el principal ligando natural, y los "purinoceptores P<sub>2</sub>", que reconocen ATP y ADP. Para esta división se basaba en diversos criterios, principalmente en las potencias relativas de ATP, ADP, AMP, y adenosina, el antagonismo selectivo de los efectos de la adenosina por las metilxantinas, la activación de la adenilato ciclasa por la adenosina, y la estimulación de la síntesis de prostaglandinas por ATP y ADP. Esta división sigue constituyendo una parte fundamental de la clasificación de los receptores de purinas; no obstante, actualmente los receptores de adenosina/P1 y los receptores P2 se caracterizan principalmente teniendo en cuenta sus distintas estructuras moleculares, además de sus distintos sistemas efectores, perfiles farmacológicos, y distribuciones tisulares. Los receptores de pirimidinas se incluyen hoy dentro de la familia de los receptores P2 (48, 49). Se ha recomendado que "receptor P1" y "receptor P2" reemplace a la terminología "purinoceptor-P<sub>1</sub>/P<sub>2</sub>" (49). Los términos "receptor de adenosina" y "receptor P1" son sinónimos.

Los receptores de adenosina/P1 se han subdividido posteriormente en cuatro subtipos, A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, y A<sub>3</sub>, basándose en sus distintas estructuras moleculares, distribución tisular y perfiles farmacológicos. Todos están acoplados a proteínas G.

En 1985, Burnstock y Kennedy (22) propusieron la clasificación de los receptores P2 en "purinoceptores P<sub>2X</sub>" y "purinoceptores P<sub>2Y</sub>", basándose en los distintos perfiles farmacológicos y las diferentes distribuciones tisulares encontrados. Se observó que el "purinoceptor P<sub>2X</sub>" era activado más eficazmente por  $\alpha,\beta$ -meATP y  $\beta,\gamma$ -meATP, ambos análogos estables del ATP. En el "purinoceptor P<sub>2Y</sub>" 2-MeSATP era el agonista más potente, y  $\alpha,\beta$ -meATP y  $\beta,\gamma$ -meATP eran agonistas débiles o inactivos. Posteriormente, se observó que el "purinoceptor P<sub>2X</sub>" era desensibilizado selectivamente por  $\alpha,\beta$ -meATP y antagonizado por ANAPP<sub>3</sub>. Las distintas funciones y distribuciones tisulares encontradas reforzaron esta división: se observó que los "purinoceptores P<sub>2X</sub>" estaban presentes en vasos deferentes, vejiga urinaria y musculatura lisa vascular, donde producían contracción; y que los "purinoceptores P<sub>2Y</sub>" estaban presentes en *taenia coli* de cobaya y en células endoteliales vasculares, donde originaban relajación.

Otros receptores P2 identificados en tejidos biológicos, principalmente por sus perfiles farmacológicos, eran el receptor P<sub>2U</sub> (activado igualmente por ATP y por UTP; ampliamente distribuido), el receptor P<sub>2T</sub> (receptor de ADP presente en plaquetas; que media agregación), y el receptor P<sub>2Z</sub> (encontrado en mastocitos y linfocitos; y media citotoxicidad y degranulación) (57, 101). Se propusieron también receptores P<sub>2S</sub> (151), P<sub>2R</sub> (145), P<sub>2D</sub> (113), receptores específicos de nucleótidos de uridina ("pirimidinoceptores") (145), receptor P3 (114) y P4 (45).

A raíz de la evidencia de que el ATP extracelular actuaba a través de dos mecanismos de transducción diferentes, a saber, canales iónicos intrínsecos y receptores acoplados a proteínas G, y debido a la clonación de los primeros receptores de este grupo se suscitó la revisión de la nomenclatura de los receptores P2. Además, estaba cada vez más claro que existía una significativa heterogeneidad en los receptores P2 nativos, tal y como se reflejaba en la diversidad creciente de sus perfiles farmacológicos, de modo que no podían acomodarse fácilmente dentro del sistema de clasificación de receptores existente. Por ello, en 1994 se sugirió oficialmente que los receptores P2 debían dividirse en dos grandes grupos, denominados P2X y P2Y, basándose en si se trataba de canales iónicos o de receptores acoplados a

proteínas G, respectivamente; y que los subtipos se definirían según las diferentes estructuras de los receptores P2 de mamíferos (1, 9, 48).

Hasta la fecha, en mamíferos se han clonado, caracterizado farmacológicamente y aceptado como miembros válidos de la familia de receptores P2 siete receptores P2X (P2X<sub>1-7</sub>) (116) y ocho receptores P2Y (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub>) (39). El salto en la secuencia de la numeración de la familia de receptores P2Y es debido al reconocimiento de que ciertos receptores han sido erróneamente identificados como pertenecientes a esta familia y posteriormente han sido retirados (116); es el caso de los receptores P2Y<sub>5</sub> y P2Y<sub>7</sub>. Los receptores P2Y<sub>9</sub> y P2Y<sub>10</sub> clonados tampoco son receptores de nucleótidos.

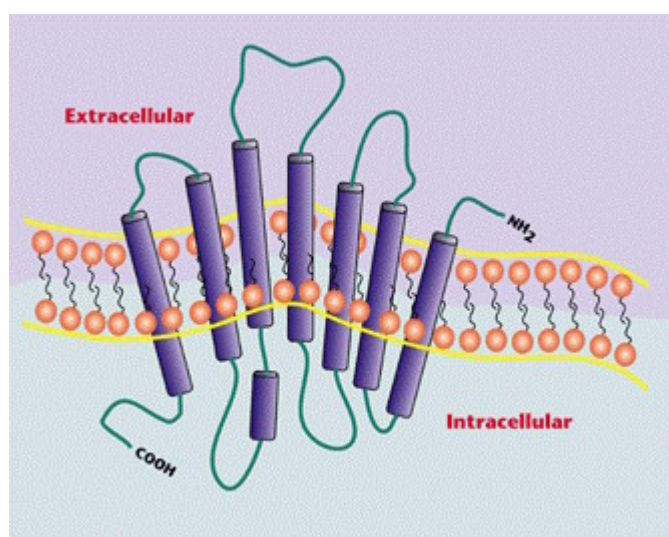
Actualmente se tiende a utilizar el nombre de los receptores clonados en preferencia a la nomenclatura clásica, siempre que sea posible la conversión desde el sistema antiguo a la nueva terminología (116). Sin embargo, debido a que en la mayoría de los casos esta caracterización es todavía ambigua, se emplea el término "-like". Por lo tanto, "receptor P2X<sub>1</sub>-like" reemplaza al clásico "purinoceptor P<sub>2x</sub>" del músculo liso, "receptor P2X<sub>7</sub>-like" es utilizado en vez de "purinoceptor P<sub>2z</sub>", "receptor P2Y<sub>1</sub>-like" es utilizado en preferencia al clásico "purinoceptor P<sub>2y</sub>", y "receptor P2Y<sub>2</sub>-like" reemplaza a "purinoceptor P<sub>2u</sub>". No obstante estas recomendaciones, a lo largo de la presente memoria cuando así lo hemos creído conveniente hemos respetado la nomenclatura utilizada en cada caso por los autores que se han citado tal y como la publicaron originalmente en sus artículos.

### **Receptores P2Y clonados**

Hasta el momento, han sido clonados y demostrado que actúan como receptores de los nucleótidos extracelulares en distintos sistemas fisiológicos once receptores P2Y. Se trata de proteínas receptoras con las características típicas de los receptores acoplados a proteínas G, entre las que se incluye el poseer siete dominios transmembrana hidrofóbicos (Figura 13). Constan de 328 a 538 aminoácidos y poseen una masa molecular de aproximadamente 40-70 kDa tras su glicosilación. De todos los receptores P2Y clonados, solo ocho se expresan en tejidos humanos; son los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>,



P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub> (Tabla 1). El resto de los receptores se han encontrado exclusivamente en especies no mamíferas, y podrían ser homólogos de los receptores P2Y de mamíferos (Tabla 1). En este sentido, el receptor P2Y<sub>3</sub> (ó p2y<sub>3</sub>) de ave se asemeja en la secuencia de los aminoácidos y en las propiedades farmacológicas al receptor P2Y<sub>6</sub> de mamífero y el receptor tp2y de pavo y el receptor p2y<sub>8</sub> expresado en la placa neural de *Xenopus laevis* parecen ser similares al receptor P2Y<sub>4</sub> de rata (146).



**Figura 13.** Diagrama de la estructura y la topología de los receptores P2Y.  
Tomado de <http://www.upstate.com/features/gprotein.asp> (161)

### Activación por agonistas de los receptores P2Y

Las potencias agonistas determinadas en experimentos funcionales para los receptores P2 nativos y recombinantes son a menudo difíciles de interpretar. Los errores pueden ocurrir debido principalmente a: 1) la existencia de nucleótidos contaminantes en las muestras comerciales suministradas, 2) la liberación de nucleótidos endógenos, o 3) la hidrólisis o conversión de los nucleótidos exógenos y endógenos por la acción de ectoenzimas. Estos efectos pueden ser minimizados mediante la purificación de las muestras, la realización de mediciones rápidas, o la adición de enzimas como la hexoquinasa y apirasa (para remover nucleótidos trifosfato

contaminantes o nucleótidos endógenos liberados por las células).

Respecto a los perfiles de los agonistas que activan los receptores P2Y, se distinguen dos características importantes (Tabla 1). La primera de ellas se refiere a la selectividad respecto a la base del nucleótido: los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub> y P2Y<sub>13</sub> son selectivos para los nucleótidos de adenina, mientras que el resto de los receptores P2Y pueden ser activados por nucleótidos uracilo. La segunda característica está relacionada con la preferencia por los nucleótidos difosfato (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>3</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub>) o nucleótidos trifosfato (Tabla 1).

### **Receptores P2Y selectivos de nucleótidos de adenina**

*P2Y<sub>1</sub>*: El receptor P2Y<sub>1</sub> (Tabla 1) fue primeramente clonado a partir de cerebro de embrión de pollo (149). Más tarde fue detectado en varias especies de mamíferos, incluido el hombre. En todas las especies estudiadas, el receptor es selectivo para los nucleótidos de adenina. Es activado por nucleótidos difosfato y trifosfato de adenina tales como ADP, ATP, 2-MeSADP, 2-MeSATP y ATP $\alpha$ S, y no es activado por nucleótidos de uracilo. El 2-MeSADP parece ser un agonista extremadamente potente. Los receptores P2Y<sub>1</sub> de humanos y de rata prefieren los nucleótidos difosfato a los nucleótidos trifosfato. Se ha encontrado que, dependiendo de las condiciones de ensayo y, posiblemente, de la densidad de receptores, los nucleótidos trifosfato pueden comportarse como agonistas plenos, como agonistas parciales o como antagonistas del receptor P2Y<sub>1</sub> humano (60, 81, 109). El receptor P2Y<sub>1</sub> clonado se trata muy probablemente del "purinoceptor P<sub>2Y</sub>" definido funcionalmente (116), el cual se ha demostrado que actúa en una gran variedad de tejidos, entre ellos en el músculo liso, endotelio y tejido neuronal. Media respuestas tales como relajación muscular y liberación de diversas sustancias tales como factores de relajación derivados del endotelio (óxido nítrico) y prostaglandinas. De acuerdo con ello, el ARNm del receptor P2Y<sub>1</sub> es expresado en el corazón, músculo esquelético, endotelio aórtico, páncreas, bazo, cerebro y médula espinal. El receptor P2Y<sub>1</sub> es expresado también en las plaquetas, donde juega un papel crucial en la agregación plaquetaria inducida por el ADP (42, 82).

*P2Y<sub>11</sub>*: El receptor P2Y<sub>11</sub> (Tabla 1) humano es el único receptor P2Y

clonado selectivo para el ATP. Es también activado por análogos del ATP tales como ATP $\gamma$ S. Se ha observado que este receptor puede actuar sobre la diferenciación de los inmunocitos (28).

*P2Y<sub>12</sub>*: El receptor P2Y<sub>12</sub> (Tabla 1), anteriormente denominado P<sub>2T</sub>, es activado por el ADP, y promueve la degranulación y agregación plaquetaria (98).

*P2Y<sub>13</sub>*: El receptor P2Y<sub>13</sub> (Tabla 1), anteriormente descrito como el receptor huérfano GPR86, tiene una alta afinidad por el ADP y se expresa predominantemente en bazo y cerebro humano (30).

### **Receptores P2Y activados por nucleótidos de uracilo**

*P2Y<sub>2</sub>*: Los receptores P2Y<sub>2</sub> (Tabla 1) han sido clonados a partir de tejidos y células de humanos, de rata y de ratón. Los nucleótidos trifosfato tales como UTP, ATP, Ap4A, UTP $\gamma$ S y ATP $\gamma$ S son agonistas plenos de este receptor. Cuando los ensayos se han llevado a cabo en condiciones en las que se impide la conversión enzimática de los nucleótidos, se ha observado que UDP y ADP no activan el receptor (97), lo que indica que este receptor es selectivo para los nucleótidos trifosfato. El ARNm del receptor P2Y<sub>2</sub> tiene una amplia distribución tisular y está presente en grandes cantidades en pulmón, corazón, músculo esquelético, bazo, riñón, hígado y epitelio (89, 110). No todos, pero sí algunos de los receptores P<sub>2U</sub> definidos funcionalmente probablemente correspondan a receptores P2Y<sub>2</sub>. Recientemente se ha comprobado en ratones deficientes en receptores P2Y<sub>2</sub> el importante papel desempeñado por este receptor en la regulación del transporte iónico en el epitelio respiratorio (31).

*P2Y<sub>4</sub>*: Originalmente se describió que el receptor P2Y<sub>4</sub> (Tabla 1) era altamente selectivo para los nucleótidos de uracilo. Más tarde se comprobó que esto era verdad en el caso de los receptores P2Y<sub>4</sub> de humanos, pero no en el caso del receptor P2Y<sub>4</sub> de rata. Cuando se testaron en los receptores P2Y<sub>4</sub> expresados en humanos bajo condiciones que aseguraban la estabilidad de los nucleótidos, el UTP y el ATP se comportaron como agonistas plenos, siendo el UTP 50 veces más potente que el ATP; los nucleótidos difosfato UDP y ADP

eran inactivos (97). A diferencia del homólogo humano, el receptor P2Y<sub>4</sub> de rata es activado aproximadamente por igual por UTP, ATP y otros nucleótidos trifosfato tales como Ap4A. Por lo tanto, el receptor P2Y<sub>4</sub> de rata explicaría otra porción de los receptores P<sub>2U</sub> definidos funcionalmente. El ARNm del receptor P2Y<sub>4</sub> tiene una distribución restringida; se expresa en la placenta y, ya en menor proporción, en pulmón y músculo liso vascular (40).

*tp2y*: el receptor *tp2y* (Tabla 1) de pavo tiene un perfil agonista similar a la del receptor P2Y<sub>4</sub> de rata. Tanto el UTP como el ATP son agonistas plenos de este receptor.

*P2Y<sub>6</sub>*: Los receptores P2Y<sub>6</sub> de humano y de rata pertenecen claramente a los receptores que prefieren los nucleótidos difosfato (Tabla 1). En el receptor P2Y<sub>6</sub> el UDP es aproximadamente 100 veces más potente que el UTP (97). El ADP, ATP y sus derivados 2-metilglicosil son casi inactivos. El ARNm del receptor P2Y<sub>6</sub> es detectado en abundancia en varios tejidos, entre los que se incluyen pulmón, corazón, aorta, tracto digestivo, bazo, placenta, timo y cerebro.

*P2Y<sub>3</sub> o p2y<sub>3</sub>*: El receptor P2Y<sub>3</sub> (Tabla 1) de ave responde tanto al UDP como al ADP cuando se expresa en oocitos de *Xenopus* o en células de mamíferos (86). Estudiando su secuencia de aminoácidos, se observa que este receptor está muy estrechamente relacionado con el receptor P2Y<sub>6</sub> de mamífero. Además, ambos receptores, el P2Y<sub>3</sub> de ave y el P2Y<sub>6</sub> de mamífero, tienen en común que pueden ser activados por UDP y muestran preferencia por los nucleótidos difosfato. El ARNm del receptor P2Y<sub>3</sub> se detecta en bazo, médula espinal, riñón y pulmón.

*p2y<sub>8</sub>*: El UTP, CTP, ATP, ITP y GTP son agonistas con la misma potencia del receptor *p2y<sub>8</sub>* (Tabla 1) expresado en los oocitos de *Xenopus*. El 2-MeSATP y el  $\alpha,\beta$ -meATP son inactivos. Se ha sugerido que este receptor desempeña una función en el desarrollo del sistema nervioso de *Xenopus laevis* (14).

*P2Y<sub>14</sub>*: El receptor P2Y<sub>14</sub> o receptor de UDP-glucosa (Tabla 1), anteriormente denominado GPR105 ó KIAA0001, ha sido recientemente clonado a partir de tejido humano. Responde específicamente a UDP-glucosa y

similares nucleótidos difosfato azucarados y no es activado por ATP, ADP, UTP ó UDP (2).

### **Bloqueo por antagonistas de los receptores P2Y**

El empleo de antagonistas es muy importante a la hora de dilucidar el papel fisiológico de los receptores. Desafortunadamente, no se dispone de antagonistas selectivos de los subtipos de receptores P2. No obstante, el uso combinado de los agonistas preferentes de subtipo y de algunos de los antagonistas que se analizarán más tarde puede permitir la caracterización del subtipo de receptor P2Y nativo (146).

*P2Y<sub>1</sub>*: En algunos casos el ATP actúa como antagonista del receptor P2Y<sub>1</sub> (60, 81, 109). Los análogos bifosfato de la adenosina tales como 3'-fosfato-5'-fosfato de adenosina y 3'-fosfato-5'-fosfosulfato de adenosina (A3P5PS) bloquean las respuestas mediadas por el receptor P2Y<sub>1</sub> con valores pA<sub>2</sub> de 5,7 y 6,5, respectivamente (16). Hasta la fecha, el derivado 2'-deoxi-N<sup>6</sup>-metiladenosina-3',5'-bifosfato (MRS 2179) es el antagonista más potente y selectivo del receptor P2Y<sub>1</sub> (25) (Tabla 1). Se ha demostrado que este derivado bifosfato actúa como antagonista competitivo del receptor P2Y<sub>1</sub> de pavo con un valor pA<sub>2</sub> de 6,99. En el receptor P2Y<sub>1</sub> humano se ha calculado para el MRS 2179 una valor de pK<sub>B</sub> aparente de 6,75. El reactivo blue 2, la suramina y el PPADS (75, 77) también actúan como antagonistas de los receptores P2Y<sub>1</sub>, con aproximadamente similares potencias antagonistas (Tabla 1).

*P2Y<sub>2</sub>*: La suramina bloquea las respuestas mediadas por el receptor P2Y<sub>2</sub> (Tabla 1); sin embargo, su afinidad por este receptor parece ser 10 veces menor que la encontrada para el receptor P2Y<sub>1</sub> (146). El PPADS y el MRS 2179 no actúan como antagonistas del receptor P2Y<sub>2</sub> (Tabla 1).

*P2Y<sub>4</sub>*: Un hecho que sirve para discriminar entre los receptores P2Y<sub>2</sub> y el P2Y<sub>4</sub> es que la suramina bloquea el primero de ellos pero no el segundo (Tabla 1). Se ha descrito que el "purinoceptor P<sub>2U</sub>" definido funcionalmente puede ser, según los casos, sensible o insensible a la suramina. Por lo tanto, el "purinoceptor P<sub>2U</sub>" sensible a la suramina podría ser el receptor P2Y<sub>2</sub> y el

insensible a la suramina el receptor P2Y<sub>4</sub> (146). El PPADS redujo la respuesta máxima en los receptores P2Y<sub>4</sub> humanos, por el contrario, no produjo ningún efecto en los receptores P2Y<sub>4</sub> de rata (Tabla 1). El reactivo blue 2 causa una modesta reducción de las respuestas inducidas por agonistas en los receptores P2Y<sub>4</sub> humanos, y suprime por completo las respuestas en el receptor P2Y<sub>4</sub> de rata (Tabla 1).

*P2Y<sub>6</sub>*: El receptor P2Y<sub>6</sub> es bloqueado por el reactivo blue 2, PPADS y suramina con potencias antagonistas aparentes decrecientes respectivamente (Tabla 1) (146).

*P2Y<sub>11</sub>*: La suramina es un antagonista del receptor P2Y<sub>11</sub> humano con un valor pA<sub>2</sub> de 6,09 (Tabla 1), por lo tanto, es ligeramente más potente que en el receptor P2Y<sub>1</sub> humano (146). Las respuestas mediadas por el receptor P2Y<sub>11</sub> son también inhibidas por el reactivo blue 2, pero no por PPADS (146) (Tabla 1). No se conoce si el MRS 2179 actúa como antagonista de los receptores P2Y<sub>11</sub>, sin embargo, se ha observado que otro derivado bifosfato, el A3P5PS se comporta como agonista parcial del receptor P2Y<sub>11</sub> (29).

*P2Y<sub>12</sub>*: El compuesto AR-C69931MX y el 2-MeSAMP son antagonistas del receptor P2Y<sub>12</sub> (147; Tabla 1).

*P2Y<sub>13</sub>*: Se ha observado que el MRS 2179 3μM no es capaz de bloquear el receptor P2Y<sub>13</sub> (147; Tabla 1).

*P2Y<sub>14</sub>*: No existen datos sobre compuestos que antagonicen las respuestas en el receptor P2Y<sub>14</sub> (147; Tabla 1).

*p2y<sub>3</sub> o P2Y<sub>3</sub>*: El receptor P2Y<sub>3</sub> es bloqueado por suramina y reactivo blue 2 (146; Tabla 1).

*tp2y*: La suramina, PPADS y A3P5PS, utilizados todos a la dosis de 100 μM, no actúan como antagonistas del receptor tp2y (18; Tabla 1).

*p2y<sub>8</sub>*: Se ha demostrado que la suramina suprime las respuestas mediadas por el receptor p2y<sub>8</sub> (Tabla 1).

**Tabla 1.** Subtipos de receptor P2Y clonados y funcionalmente expresados. Adaptada de von K ugelgen and Wetter (147).

Receptor Subtype	Species	Tissue Distribution	Cloned from	Principle Agonists	Principle Antagonists
P2Y <sub>1</sub>	Human	Wide including platelets, heart, skeletal muscle, neuronal tissue, digestive tract	Blood Platelets	2-MeSADP > ADP > 2-MeSATP > ATP	MRS2179 Reactive blue 2 Suramin PPADS
			Whole Blood		
			Erythro leukaemia cells		
			Genomic DNA		
			Placenta		
	Mouse	See above	Insulinoma cells	2-MeSATP > 2-Chloro-ATP > ATP	No data
			Embryonic stem cells		
	Rat	See above	Insulinoma cells	2-MeSADP = 2-MeSATP > ADP > ATP	PPADS
	Bovine	See above	Corpus Callosum, glial cells	2-MeSATP > ATP	No data
			Aortic endothelial cells		
Chicken	See above	Brain	2-MeSATP > ATP > ADP	Suramin Reactive blue 2	
Turkey	See above	Brain	2-MeSATP > ATP > ADP	MRS2179 PPADS Suramin	
P2Y <sub>2</sub>	Human	Wide including lung, heart, skeletal muscle, spleen, kidney	Airway epithelium, epithelial cell, CF/T43 cells	UTP = ATP > Ap4A > ATP	Suramin
	Mouse	See above	Neuro-blastoma cells, NG108-15 cells	UTP = ATP > Ap4A	No data
	Rat	See above	Pituitary	UTP = ATP	No data
			Alveolar type II cell		
		Smooth muscle cell cDNA library			
P2Y <sub>3</sub>	Chicken	Spleen, kidney, CNS	Brain	ADP > UTP > UDP	Reactive blue 2 Suramin
	Turkey	See above	Genomic DNA	UDP > 5-Bromo-UDP > 2-MeSADP > ADP	No data

## INTRODUCCIÓN

P2Y <sub>4</sub>	Human	Placenta, lung, vascular smooth muscle	Genomic DNA	UTP > UTP <sub>γ</sub> S >> ATP, UDP	PPADS Reactive blue 2
			Chromosome X		
			Pancreas		
	Rat	See above	Brain	UTP = ATP = ITP = Ap4A	Reactive blue 2
			Liver		
	Mouse	See above	N.I.	No data	No data

P2Y <sub>6</sub>	Human	Wide including lung, heart, aorta, spleen, placenta, thymus, intestine, brain	Placenta Stimulated T-lymphocyte	UDP = 5-Bromo-UDP >> UTP > 2-MeSADP	Reactive blue 2 PPADS
	Rat	See above	Aortic smooth muscle cells	UDP > UTP > ADP > 2-MeSATP	Reactive blue 2

p2y <sub>8</sub>	<i>Xenopus laevis</i>	Neural plate	Neural plate	UTP = CTP = ATP = ITP = GTP	Suramin
------------------	-----------------------	--------------	--------------	-----------------------------	---------

P2Y <sub>11</sub>	Human	Spleen, intestine, immunocytes	Placenta	ATP <sub>γ</sub> S = Benzoyl-Benzoyl-ATP > ATP > 2-MeSATP	Suramin Reactive blue 2
-------------------	-------	--------------------------------	----------	---	----------------------------

P2Y <sub>12</sub>	Human	Platelets, brain	Platelets	2-MeSADP > ADP	AR-C69931MX >> 2-MeSAMP
	Rat	See above	Platelets	See above	2-MeSAMP
P2Y <sub>13</sub>	Human	Spleen, leucocytes, bone marrow, placenta, liver, brain	Spleen, neutrophil granulocytes	2-MeSADP = ADP > ADPβS > IDP	No blockade by MRS2179 3 μM
	Mouse	Spleen, leucocytes, liver, brain	Spleen	2-MeSADP = ADP = ADPβS = IDP	No data

tp2y	Turkey	No data	Blood	UTP = ATP > Ap4A > ATP <sub>γ</sub> S	No data
------	--------	---------	-------	---------------------------------------	---------

P2Y <sub>14</sub>	Human	No data	Myeloblast	UDP-Glucose	No data
	Rat	No data	N.I.	UDP-Glucose	No data

N.I. (no information)



### Vías de transducción de los receptores P2Y

La mayoría de los receptores P2Y clonados y definidos funcionalmente se pueden acoplar a la vía del inositol trifosfato ( $IP_3$ ), que consiste en la activación de la fosfolipasa C, incremento de los inositol fosfatos y movilización del  $Ca^{2+}$  procedente de almacenes intracelulares (59, 124, 125) (Tabla 2). El  $Ca^{2+}$  intracelular controlará directamente la función celular. Además, se ha observado que secundariamente a la activación de la fosfolipasa C otras vías de transducción, tales como proteína quinasa C, fosfolipasa  $A_2$ , canales iónicos sensibles al  $Ca^{2+}$  y formación de factores de relajación derivados del endotelio están implicados en la mediación de las respuestas derivadas de la activación de los receptores P2Y nativos (116). La vía de transducción final específica parece depender no solo del subtipo de receptor P2Y sino también del tipo celular que expresa el receptor (116).

Las secuencias de las regiones implicadas en el acoplamiento a proteínas G varían muchísimo en los distintos receptores P2Y. Esto sugiere que los diferentes subtipos de receptores P2Y se acoplan a diversas subclases de proteínas G. En este sentido, el acoplamiento entre la fosfolipasa C y los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>11</sub> parece ser resistente a la toxina pertúsica (26, 28, 43, 94, 118). Por el contrario, se ha observado que las respuestas mediadas por los receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub> son parcialmente sensibles a la toxina pertúsica, lo que indica un acoplamiento de estos receptores tanto a proteínas G sensibles a la toxina pertúsica ( $G_{i/o}$ ) como a proteínas G insensibles a la toxina pertúsica ( $G_{q/11}$ ) (27, 69, 94, 110). La toxina pertúsica suprime totalmente la respuesta agonista en el receptor P2Y<sub>14</sub>, lo que confirma que este receptor está acoplado a proteínas G de la clase  $G_{i/o}$  (2).

Se ha descrito que varios receptores P2Y clonados se acoplan a la adenilato ciclasa (146) (Tabla 2). El receptor P2Y<sub>11</sub> humano media una estimulación de la actividad adenilato ciclasa (28). La activación de los receptores tp2y (17) y P2Y<sub>12</sub> (142) conduce a una inhibición de la adenilato ciclasa. La activación del receptor P2Y<sub>13</sub> por bajas concentraciones de ADP conduce a una inhibición de la adenilato ciclasa, mientras que la activación por altas concentraciones de este agonista estimula el enzima; esto sugiere que el receptor se acopla a dos proteínas G de efectos opuestos; no se conoce, sin

embargo el significado fisiológico de este acoplamiento simultáneo (30).

**Tabla 2.** Vías de transducción de los receptores P2Y. Adaptado de Dubyak (39)

Subtipo de receptor	Proteína G /vía de transducción
P2Y <sub>1</sub>	G <sub>q</sub> → PI-PLC
P2Y <sub>2</sub>	G <sub>q</sub> → PI-PLC
P2Y <sub>4</sub>	G <sub>q</sub> → PI-PLC
P2Y <sub>6</sub>	G <sub>q</sub> → PI-PLC
P2Y <sub>11</sub>	G <sub>q</sub> → PI-PLC y G <sub>s</sub> → AC
P2Y <sub>12</sub>	G <sub>i</sub> → AC/otras
P2Y <sub>13</sub>	G <sub>i</sub> → AC/otras
P2Y <sub>14</sub>	G <sub>i</sub> → AC/otras

Otras vías de transducción a las que probablemente se acoplan los receptores P2Y a través de las proteínas G son la vía de la quinasa dependiente de Rho, la vía de las proteína quinasas activadas por mitógenos y la vía de los canales iónicos (146).

#### 1.4.2. Influencia del ATP extracelular en la secreción gástrica de ácido

A pesar de la gran cantidad de estudios que se han publicado sobre los efectos biológicos del ATP extracelular, existe poca información respecto a la influencia de este nucleótido sobre la secreción gástrica de ácido.

La primera publicación en este sentido fue realizada por Kidder en 1971 (73), quien observó que el ATP inhibía la secreción de ácido en preparaciones de mucosa gástrica de rana.

Posteriormente se confirmó este mismo efecto antisecretor para el ATP en preparaciones de glándulas gástricas de conejo (4, 53-55).

En células parietales de mucosa gástrica de conejo estimuladas con histamina el ATP y el 2-MeSATP promueven un efecto inhibitor neto y significativo sobre la secreción de ácido, siendo más potente el efecto de 2-MeSATP que el de ATP. En contrapartida, el  $\beta,\gamma$ -meATP, agonista selectivo de "purinoceptores  $P_{2X}$ ", carece de efecto inhibitor sobre la producción de ácido en células parietales estimuladas con histamina. Por su parte, el nucleótido pirimidínico UTP tampoco induce inhibición significativa sobre la acumulación de aminopirina (AP) estimulada por histamina. El orden de potencia agonista de estos nucleótidos como inhibidores de la secreción de ácido en células parietales estimuladas con histamina es 2-MeSATP > ATP >>  $\beta,\gamma$ -meATP, UTP (56). Este patrón de actividad está de acuerdo con el convencionalmente descrito para "purinoceptores  $P_{2Y}$ " (48).

La ausencia de un efecto inhibitor detectable por parte del  $\beta,\gamma$ -meATP y del UTP, tanto en células parietales no estimuladas como en estimuladas con histamina u otros secretagogos, sugiere que no hay ni "purinoceptores  $P_{2X}$ " ni "receptores  $P_{2U}$ ", respectivamente, en las células parietales de conejo.

Puesto que los experimentos se han realizado utilizando preparaciones enriquecidas en células parietales, se puede deducir, además, que el ATP inhibe la acción estimuladora de la histamina actuando directamente sobre la célula parietal (56).

En este sentido, en un estudio autorradiográfico de secciones de fundus de conejo con [ $^{35}$ S]dATP $\alpha$ S, considerado como radioligando para receptores  $P_{2Y}$ , se observa que el radioligando se distribuye selectivamente en la mucosa gástrica (144). Paralelamente a esta distribución selectiva se aprecia una alta densidad de unión del radioligando en los ensayos de unión llevados a cabo con preparaciones de homogenados "crudos" de membrana plasmática obtenidos a partir de glándulas gástricas de conejo (144).

Al examinar y comparar la acción del ATP y análogos sobre las respuestas secretoras inducidas por distintos secretagogos de la célula parietal

gástrica, se puede apreciar que, mientras en las células parietales estimuladas con histamina el perfil inhibitor  $2\text{-MeSATP} > \text{ATP} \gg \beta,\gamma\text{-meATP}$  se mantiene, ninguno de los tres nucleótidos purínicos modifica de modo significativo las respuestas secretoras inducidas por carbacol, dibutilil-AMPc o el derivado de adenosina 5'-N-etil-carboxamido-adenosina (NECA). De estos resultados, compatibles con los observados previamente en glándulas gástricas, se deduce que el efecto antisecretor del ATP es "selectivo" para el secretagogo histamina (56).

Además, parece evidente que el mecanismo de acción del ATP no implica el bloqueo de algún proceso "alejado" dentro de la secuencia de acontecimientos que conducen al acoplamiento "estímulo-secreción"; puesto que de ser así, el ATP y su análogo 2-MeSATP inhibirían la secreción de ácido en la célula parietal con independencia del tipo de secretagogo utilizado.

Los resultados sobre la respuesta secretora de NECA, que estimula la secreción de ácido en las células parietales de conejo mediante la activación de receptores P1 subtipo  $A_{2B}$  acoplados a adenilato ciclasa y, subsecuentemente, a la producción de AMPc (5, 108), así como los obtenidos sobre la respuesta secretora a dibutilil-AMPc, que presumiblemente imita a la histamina (138), sugieren que el ATP inhibe la secreción de ácido estimulada por histamina en un nivel próximo a las etapas que conducen a la formación de AMPc.

Se ha observado que la indometacina, un conocido inhibidor de la biosíntesis de prostaglandinas, reduce de manera intensa y significativa la acción inhibitora del ATP sobre la acumulación de AP en células parietales estimuladas con histamina (56). No obstante, la preincubación de las células con indometacina  $10\mu\text{M}$  durante 10 minutos, concentración y tiempo suficientes para bloquear la ruta de síntesis de prostaglandinas, no se acompaña de un bloqueo completo del efecto del ATP. Estos hallazgos sugieren la existencia de, por lo menos, dos vías de transducción diferentes a través de las cuales el ATP inhibe la secreción gástrica de ácido en células parietales estimuladas por histamina. Por un lado el ATP activaría en estas células la vía de la producción de prostaglandinas y, por otro, estaría conectado a una proteína  $G_i$  de membrana que inhibe la adenilato ciclasa acoplada a receptores  $H_2$  de histamina en la célula parietal (56).

## **2. OBJETIVOS**



## 2.1. ANTECEDENTES

Tanto la adenosina como los nucleótidos derivados de adenina actúan como efectores extracelulares capaces de producir importantes acciones en un gran número de sistemas biológicos. La mayor parte de estas acciones son mediadas por receptores específicos denominados receptores de adenosina o receptores P1 y receptores de nucleótidos o receptores P2. (Para detalles y bibliografía ver revisión).

Un aspecto que ha suscitado interés es el referido a la posible participación de estas purinas en la regulación de las secreciones digestivas, en particular de la secreción gástrica de ácido. Así, a las primeras evidencias experimentales en este sentido que se conocieron en 1971 se han venido añadiendo en años posteriores publicaciones que apoyan fehacientemente que las purinas adenosina y ATP intervienen en la regulación del proceso de la secreción de ácido en el estómago (4, 5, 53-55, 73, 108).

Según las aportaciones derivadas de estas investigaciones es posible considerar que, en preparaciones obtenidas a partir de estómago de conejo, los compuestos de adenosina promueven la estimulación de la secreción gástrica de ácido y que los compuestos de ATP promueven su inhibición (4, 5, 53-55, 108).

Al estudiar las características del efecto inhibitor producido por el ATP se observa que en las preparaciones de glándulas gástricas de conejo y en las preparaciones enriquecidas en células parietales aisladas de mucosa gástrica de conejo el ATP inhibe de manera intensa y selectiva la secreción de ácido estimulada por histamina y que al menos una parte de dicho efecto tiene que ver con la estimulación de la producción endógena de prostaglandinas (56). Además, se sugiere que esta acción antisecretora del ATP es mediada por receptores P<sub>2Y</sub> que posiblemente estarían presentes en la membrana plasmática de las células parietales de conejo (56).

Un apoyo experimental de particular importancia en favor de la conclusión precedente se produce cuando se publica la caracterización de "purinoceptores P<sub>2Y</sub>" (P<sub>2Y</sub>-like) mediante estudios de unión con radioligandos en preparaciones de membrana plasmática obtenidas a partir de glándulas gástricas de conejo (144).

Siendo este el estado de los conocimientos existentes a propósito del tema, y con el fin, por un lado, de confirmar la presencia de receptores P2Y en la membrana plasmática de las células parietales gástricas y, por otro, de estudiar el perfil cinético y la densidad de estos receptores, en el presente trabajo se encuadra la identificación y caracterización de receptores P2Y en preparaciones de membrana plasmática de células parietales de mucosa gástrica de conejo mediante estudios de unión con radioligandos específicos.

### 2.2. OBJETIVOS

Los objetivos prioritarios del presente trabajo doctoral fueron básicamente los siguientes:

*1.- Aislar y separar las fracciones apical y basolateral de la membrana plasmática de las células parietales, y caracterizar el grado de purificación de cada tipo de membrana en cada fracción correspondiente, basándonos en el contenido enzimático característico para cada una de ellas: 5´-nucleotidasa, H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa y glucosa-6-fosfatasa.*

La membrana plasmática de la célula parietal de la mucosa gástrica presenta dos dominios perfectamente diferenciados, uno apical (luminal) y otro basolateral (contraluminal). Ambas fracciones difieren en su ultraestructura (61, 102), actividades enzimáticas (64), mecanismos de transporte (64), propiedades electrofisiológicas (34), composición de proteínas (24, 58) y composición lipídica (87). Teniendo en cuenta esta polaridad, consideramos interesante para estudios posteriores separar las dos fracciones de la membrana plasmática de la célula parietal.

Para analizar el enriquecimiento de las referidas fracciones de membrana plasmática se ensayaron varios enzimas marcadores: 5´-nucleotidasa como indicador de recuperación de membrana plasmática (41), H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa como marcador específico de membrana plasmática apical de célula parietal de mucosa gástrica (64, 120), Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa como marcador de membrana plasmática basolateral de célula parietal de mucosa gástrica (32, 64, 139) y glucosa-6-fosfatasa como marcador de contaminación por retículo endoplásmico (41).



2.- *Determinar la presencia de receptores P<sub>2</sub>Y en las fracciones de membrana plasmática mediante el estudio de la existencia de unión específica del radioligando [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S a las fracciones de membrana plasmática. Y, a continuación, realizar los experimentos cinéticos, de saturación y de competición de la unión de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S a las fracciones de membrana plasmática para la caracterización de dichos receptores.*

El ligando [<sup>35</sup>S]2'-desoxiATP $\alpha$ S ([<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S) ha sido considerado un instrumento útil para caracterizar los receptores P<sub>2</sub>Y-like (o purinoceptores P<sub>2</sub> metabotrópicos, o receptores P<sub>2</sub>Y nativos) en diferentes tejidos (126, 135, 136, 144).

Está establecido que en la caracterización de un receptor mediante estudios de unión con radioligandos se deben llevar a cabo cuatro tipos de experimentos prototipos (92): a) experimentos iniciales de determinación de la unión específica, b) experimentos cinéticos, c) experimentos de saturación y d) experimentos de competición.

Por lo tanto y de acuerdo con ello, se estudió inicialmente la existencia de unión específica del radioligando [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S a las fracciones de membrana plasmática.

A continuación, se realizaron los experimentos cinéticos y de saturación de la unión de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S a las fracciones de membrana plasmática. Estos experimentos nos permitieron calcular las constantes cinéticas de asociación y disociación, la constante de disociación en el equilibrio y la densidad de los sitios de unión.

En los ensayos de competición se determinó el desplazamiento de la unión de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S a la fracción de membrana plasmática ocasionado por la presencia en el medio de incubación de concentraciones crecientes de diferentes agonistas y antagonistas de los receptores P<sub>2</sub>Y. El orden de potencia de los agonistas y antagonistas obtenido nos orientaría sobre el subtipo/s de receptor P<sub>2</sub>Y presente en las fracciones de membrana plasmática de la célula parietal de la mucosa gástrica.

3.- *Estudiar el efecto que ejerce el GDP en la unión de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S a las fracciones de membrana plasmática.*

Los receptores P2Y son receptores de nucleótidos de purina y pirimidina acoplados a proteínas G. Es característico de los receptores acoplados a proteínas G el que su afinidad por los agonistas puede ser modulada por los nucleótidos de guanina tales como GDP y GTP (13, 91, 126). Para examinar si la unión de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S a las fracciones de membrana plasmática está mediada por receptores acoplados a proteínas G se estudió el efecto que ejercía sobre esa unión el GDP, conocido inhibidor del mecanismo de acción de las proteínas G (13, 91).

4.- *Medir la actividad adenilato ciclasa*

En estudios realizados para poder dilucidar el mecanismo de acción del ATP en la inhibición de la secreción gástrica de ácido estimulada por histamina en preparaciones de células parietales aisladas de conejo se ha sugerido la posibilidad de que, además de activar la producción endógena de prostaglandinas, el ATP actuaría directamente sobre la célula parietal vía "purinoceptores P<sub>2Y</sub>" conectados a una proteína G<sub>i</sub> de membrana que, probablemente, promovería la inhibición de la adenilato ciclasa acoplada a receptores H<sub>2</sub> de histamina.

Se ha descrito que varios receptores P2Y clonados se acoplan a la adenilato ciclasa (39, 146). El receptor P2Y<sub>11</sub> humano media una estimulación de la actividad adenilato ciclasa (28, 39). La activación de los receptores tp2y y P2Y<sub>12</sub> conduce a una inhibición de la adenilato ciclasa (17, 39, 142). La activación del receptor P2Y<sub>13</sub> por bajas concentraciones de ADP conduce a una inhibición de la adenilato ciclasa, mientras que la activación por altas concentraciones de este agonista estimula el enzima; esto sugiere que el receptor se acopla a dos proteínas G de efectos opuestos (30).

Puesto que la determinación de la actividad adenilato ciclasa era un dato más a tener en cuenta en la caracterización del posible subtipo de purinoceptor P2Y presente en la membrana plasmática de la célula parietal procedimos a la medición de la actividad de este enzima, en presencia de agonistas de dicho tipo de receptores.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3.1. MATERIAL

#### 3.1.1. Productos químicos

Los reactivos y materiales utilizados fueron suministrados por diferentes compañías químicas y farmacéuticas:

SIGMA ALDRICH CO. suministró albúmina de conejo, colagenasa tipo I, benzamidina, inhibidor de tripsina, aprotinina, Na-AMP, glicina-NaOH, Na-glucosa-6-fosfato, L-histidina, dATP,  $\beta,\gamma$ -meATP, UTP, HEPES, Na-EDTA, albúmina bovina, fosfato de creatina, creatina quinasa, ADP $\beta$ S, GDP, azul de trypan, ATP $\gamma$ S, A2P5PS, EGTA, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), bacitracina, azul brillante de Coomasie G-250 y DTT.

BOEHRINGER MANNHEIM fue la proveedora de pronasa.

MERCK fue el suministrador de glucosa anhidra, sacarosa, Na<sub>2</sub>ATP, Tris-ATP, heptamolibdato amónico, sulfito sódico, L-amino-2-naftol-sulfónico, bisulfito sódico, TRIS, PIPES y NaN<sub>3</sub> (sodium azide)

[<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S (400 Ci/mmol) fue de AMERSHAM INTERNATIONAL.

2-MeSATP, suramina, RB-2, PPADS y 2-MeSADP los adquirimos de RESEARCH BIOCHEMICALS INCORPORATED.

LKB SCINTILLATION PRODUCTS suministró el líquido de centelleo OptiPhase "HiSafe" II.

El nembutal fue donado por el Dpto. de Biología Celular y Ciencias Morfológicas de la Universidad del País Vasco.

La solución de tinción múltiple (PMS) fue de POLYSCIENCES INCORPORATED (Warrington, PA, USA).

Los disolventes (metanol, etanol, ácido sulfúrico, ácido perclórico, propilenglicol) y demás productos fueron obtenidos de diferentes fuentes,

tratándose de reactivos de grado analítico.

### 3.1.2. Animales de experimentación

Se emplearon conejos de raza New Zealand, machos y hembras, de pesos comprendidos entre 2,5 y 4 Kg. Los animales se mantenían en condiciones ambientales adecuadas y con acceso libre a comida y bebida hasta el momento de su sacrificio.

### 3.1.3. Composición de las disoluciones empleadas

#### Preparación anestésica:

21,25 g hidrato de cloral + 49,4 ml etanol

81 ml nembutal (4,86 g)

198 ml propilenglicol

10,63 g  $Mg SO_4 \cdot 7H_2O$  en agua destilada

Añadir  $H_2O$  hasta 500 ml

#### Medio PBS (pH 7,4):

NaCl 149,6 mM

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  0,64 mM

$K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  3 mM

#### Disolución de pronasa (pH 7,4):

NaCl 130 mM

$NaHCO_3$  12 mM

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  3 mM

$Na_2HPO_4$  3mM

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  3 mM

$Mg SO_4 \cdot 7H_2O$  2 mM

Albúmina de conejo 1 mg/ml

Glucosa 2 mg/ml

Pronasa 9 U/ml

#### Disolución de colagenasa (pH 7,4):

NaCl 130 mM

NaHCO <sub>3</sub>	12 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	3 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
Albúmina de conejo	1 mg/ml
Glucosa	2 mg/ml
Colagenasa tipo I	90 U/ml

**Medio de resuspensión I (pH 7,4):**

NaCl	132,4 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 mM
KCl	5,4 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,2 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
Albúmina de conejo	1 mg/ml
Glucosa	2 mg/ml
HEPES	2,38 mg/ml

**Medio de elutriación (pH 7,4):**

NaCl	149,6 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,64 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3 mM
Glucosa	2 mg/ml

**Disolución tampón de homogenización (pH 7,4):**

Sacarosa	300 mM
TRIS-HCl	10 mM
DTT	1mM
NaN <sub>3</sub>	0,02%
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	0,1 mM

**Disolución de sacarosa 40% (pH 7,4):**

Sacarosa	400 mg/ml
----------	-----------

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

TRIS-HCl	10 mM
DTT	1mM
NaN <sub>3</sub>	0,02%
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	0,1 mM

### **Disolución de sacarosa 47% (pH 7,4):**

Sacarosa	470 mg/ml
TRIS-HCl	10 mM
DTT	1mM
NaN <sub>3</sub>	0,02%
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	0,1 mM

### Medio de resuspensión II (pH 7,4):

Sacarosa	250 mM
TRIS-HCl	20 mM

### Medio de resuspensión III (pH 7,4):

TRIS-HCl	50 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
Benzamidina	1 mM
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	0,1 mM
Bacitracina	0,001%
Inhibidor de tripsina	0,002%
Aprotinina	40 U/l

### **Mezcla de reacción para la determinación de la actividad 5' - nucleotidasa:**

Se preparaban las siguientes disoluciones:

- a) Na-AMP 50 mM (pH 7,0)
- b) Glicina-NaOH 500 mM (pH 9,1)
- c) MgCl<sub>2</sub> 100 mM

Y se preparaba una mezcla de reacción combinando las disoluciones a), b), c) y H<sub>2</sub>O en las proporciones 1:2:1:5. Esta mezcla se podía conservar congelada.



**Mezcla de reacción para la determinación de las actividades  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPasa y  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPasa:**

PIPES-TRIS	5 mM
$MgCl_2$	2 mM
Tris-ATP	2 mM

**Mezcla de reacción para la determinación de la actividad glucosa-6-fosfatasa:**

Se preparaban las siguientes disoluciones:

a) Na-glucosa-6-fosfato	100 mM (pH 6,5)
b) Histidina	35 mM (pH 6,5)
c) Na-EDTA	10 mM (pH 7,0)

Y se preparaba una mezcla de reacción combinando las disoluciones a), b), c) y  $H_2O$  en las proporciones 2:5:1:1. Esta mezcla se podía conservar congelada.

**Reactivo reductor:**

Sulfito sódico	5 mg/ml
L-amino-2-naftol-sulfónico	2,5 mg/ml
Bisulfito sódico	15%

**Medio de resuspensión IV (pH 7,4):**

Tris-HCl	50 mM
$MgCl_2$	5 mM
DTT	1 mM

**Sistema regenerador:**

BSA	1 mg/ml
Fosfato de creatina	10 mM
Creatina quinasa	1mg/ml

### 3.2. MÉTODOS

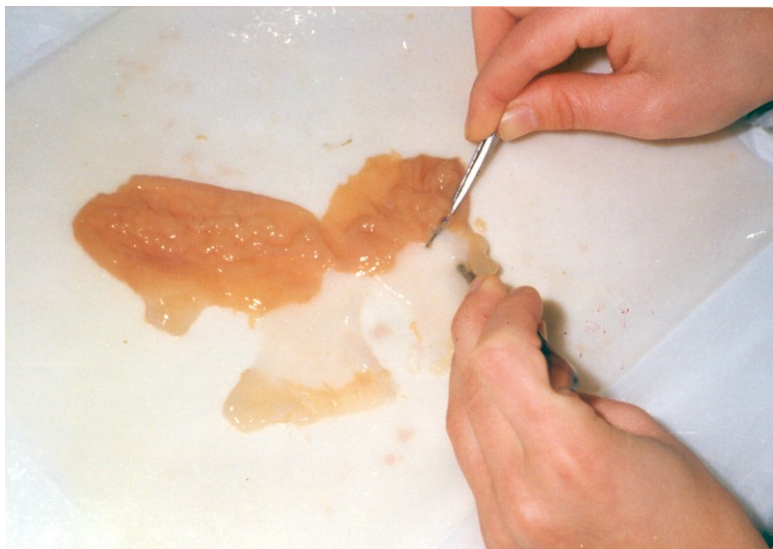
#### 3.2.1. Aislamiento de las células de la mucosa gástrica de conejo.

Al conejo se le inyectaba la preparación anestésica (0,2 ml/100 g de peso) en la vena superficial de la oreja y posteriormente era desangrado practicándole un corte en la vena yugular.

Seguidamente, se aislaba la mucosa gástrica según el método de Berglindh y Obrink (11). Se practicaba una incisión toracoabdominal, y se procedía a la perfusión del estómago del conejo con el medio PBS previamente oxigenado, atemperado a 37°C y a una presión de 600 mm Hg. Para ello, se ligaba la arteria aorta por encima del nivel del tronco celíaco y se canulaba la arteria gástrica, a través de la cual se introducía el líquido de perfusión; además, para dar salida al mismo, se procedía a seccionar la vena porta. La perfusión con PBS permitía la obtención de un estómago totalmente libre de restos sanguíneos, al tiempo que la alta presión a la que se practicaba producía la ruptura de pequeños vasos de alrededor de las glándulas, iniciándose de esta forma una separación glandular mecánica.

Cuando el estómago estaba suficientemente perfundido (600 ml de PBS aproximadamente), se extraía rápidamente, se abría a lo largo de la curvatura menor, se vaciaba y se lavaba con PBS. Una vez limpio, las regiones cardial y antral se desechaban. El cuerpo se volvía a lavar varias veces con el medio PBS oxigenado y se secaba con papel de filtro. Seguidamente, se eliminaba el moco mediante aspiración por vacío y, a continuación, se separaba la mucosa de las capas subyacentes mediante disección roma (Figura 14).

Los trozos de mucosa resultantes se colocaban en una placa que contenía PBS a 37°C, se cortaban finamente con unas tijeras y se sometían a dos nuevos lavados con el PBS.



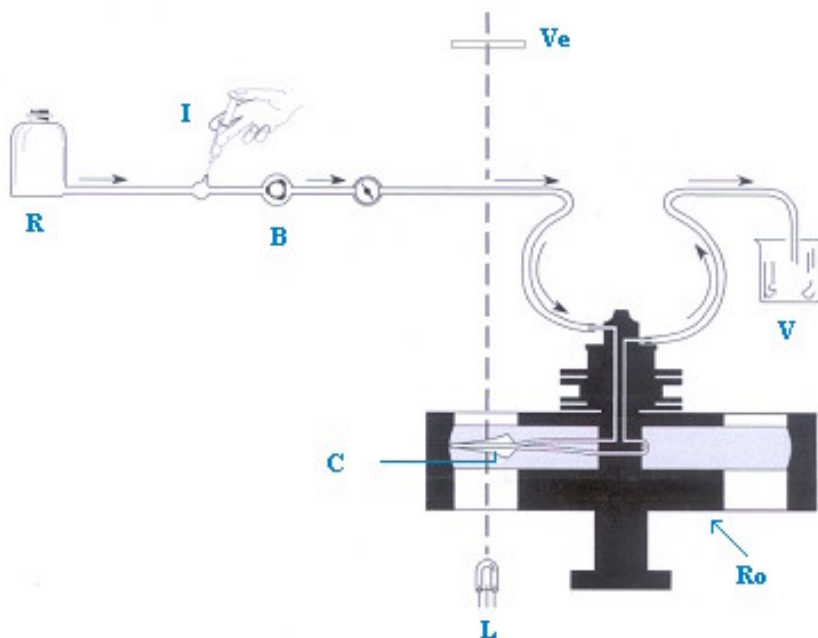
**Figura 14.** Fotografía que muestra la separación de la mucosa gástrica mediante disección roma.

La obtención de la fracción de células aisladas de la mucosa gástrica se llevaba a cabo siguiendo el método de Fryklund *et al.* (50) modificado por nosotros. Para ello, los fragmentos de mucosa se incubaban durante 15 minutos con la disolución de pronasa, oxigenada previamente, a 37°C y agitación constante. Tras dicha incubación, los fragmentos de mucosa se dejaban sedimentar y la disolución enzimática se aspiraba y desechaba. El material sedimentado se lavaba tres veces con el medio de resuspensión I previamente atemperado a 37°C y oxigenado, siendo utilizado este medio siempre en estas condiciones. Inmediatamente después, se procedía a la incubación con la disolución de colagenasa oxigenada previamente, durante 45 minutos, a 37°C. A fin de facilitar la digestión se mantenía el contenido del recipiente cerrado y con agitación continua. Concluidas las digestiones enzimáticas, se filtraba el contenido a través de una malla de nylon de 70  $\mu\text{m}$  y se vertía en unos tubos de centrifuga de polipropileno, con capacidad para 50 ml y fondo cónico, para proceder a su centrifugación, la cual se realizaba a 177 x g durante 5 minutos. El sobrenadante, que contenía células pequeñas y material digerido, se desechaba y las pastillas celulares eran resuspendidas suavemente en el medio de resuspensión I. Esta operación se repetía tres veces a temperatura ambiente.

### 3.2.2. Separación de la fracción de células parietales de la mucosa gástrica.

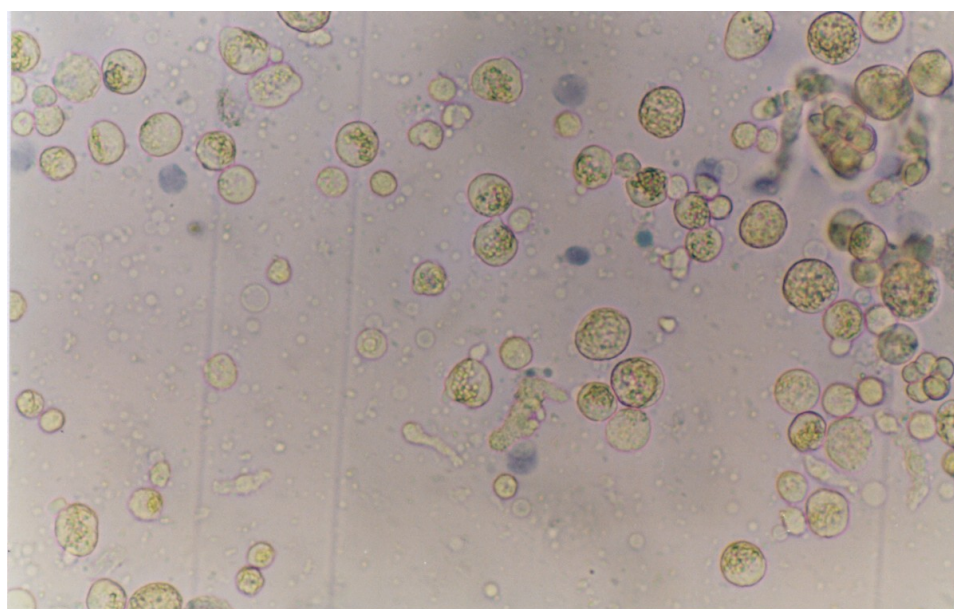
La separación y enriquecimiento de las células parietales se realizaba mediante elutriación centrífuga de la suspensión celular obtenida en el apartado anterior, siguiendo esencialmente el protocolo de separación descrito por Sanders y Soll (122).

Para ello, una vez realizado el montaje de todos los componentes del sistema de elutriación (Figura 15) se llenaba el circuito con el medio de elutriación, a 25°C, utilizando una bomba peristáltica ISMATEC a un flujo moderado (160 ml/min). Se efectuaba la purga de aire de todo el circuito y se cerraba la centrífuga (BECKMAN modelo J-6M/E). Se ponía en marcha el rotor (BECKMAN JE-5.0) a 2.000 rpm y se reducía el flujo de la bomba peristáltica a 75 ml/min.



**Figura 15.** Esquema de los componentes esenciales del sistema de elutriación: R (reservorio del medio de elutriación), I (inyección de la muestra a elutriar), B (bomba peristáltica), Ro (rotor JE-5.0), C (cámara de elutriación), L (lámpara estroboscópica), Ve (ventana en la tapa de la centrífuga) y V (vaso recolector). Modificado de Dorin (36).

En estas condiciones, se bombeaba la totalidad de las células aisladas de la mucosa gástrica de un conejo resuspendidas en un volumen de 250 ml hacia el interior de la cámara de elutriación a través de la cánula conectada a la misma y que sobresalía fuera de la centrífuga. Mediante el sistema estroboscópico de la centrífuga se visualizaba la llegada de las células a la cámara y su distribución en bandas de equilibrio. A fin de separar las distintas poblaciones celulares presentes en la muestra inicial (Figura 16), se variaban la velocidad del rotor y el flujo de la bomba peristáltica tal como se refleja en la Tabla 3. En esta tabla se muestran los valores de diámetro calculados empíricamente para las partículas elutriadas en las distintas condiciones según la expresión matemática  $F = D^2 \cdot X \cdot (\text{rpm}/1.000)^2$  (donde F = flujo de la bomba., D = diámetro de la partícula, X = constante que varía según las características geométricas de la cámara de elutriación, en nuestro caso se utiliza la cámara de gran capacidad, donde X = 0,173 y rpm = velocidad de centrifugación). Esta expresión permite correlacionar las condiciones de elutriación con el tamaño de las partículas, diámetros celulares en este caso, para que éstas queden en equilibrio en el límite de elución de la cámara. Recogíamos separadamente las distintas fracciones que eluían fuera de la cámara de elutriación.



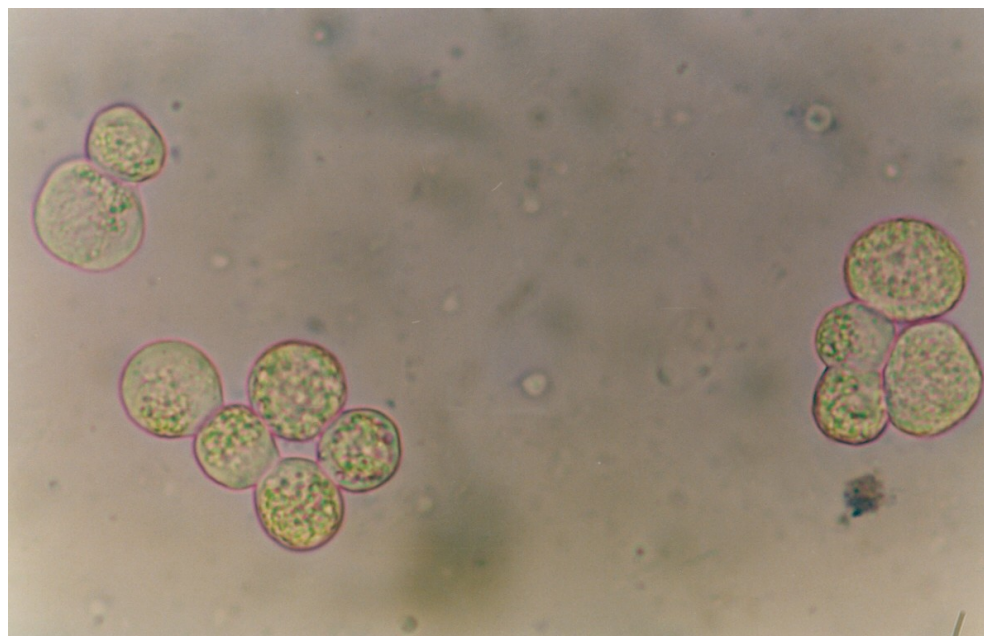
**Figura 16.** Imagen obtenida al microscopio óptico de la muestra de células totales aisladas de la mucosa gástrica de conejo. *Azul de trypan*.

**Tabla 3.** Protocolo de separación de las células aisladas de la mucosa gástrica de conejo.

Fracción	rpm	Flujo (ml/min)	Muestra recogida (ml)	Diámetro aproximado ( $\mu\text{m}$ )
0	2.000	75	500	10,41
1	2.000	160	1000	15,21
2	1.780	178	100	18,02
3	1.500	178	800	21,38
4	1.390	178	200	23,08

El porcentaje de enriquecimiento en células parietales de las muestras recogidas se examinaba mediante observación directa en un microscopio óptico de contraste de fases (NIKON OPTIPHOT), tras tinción de las células con una disolución de tinción múltiple (PMS) que tiñe de color rosa fuerte las células parietales y de color azul oscuro las células principales, dejando otras células incoloras o con un discreto color rosa pálido. Asimismo, se realizaba un análisis de la distribución de tamaños celulares en las fracciones de la elutriación con un monitor Coulter-Counter Multisizer II.

Así se comprobó que las fracciones 3 y 4 de la elutriación se correspondían con las enriquecidas en células parietales (70% de células parietales, con un diámetro celular de 19-22  $\mu\text{m}$ ) (Figura 17). La viabilidad de las células en ambas fracciones, estimada mediante tinción con azul de trypan, era superior al 90%.



**Figura 17.** Imagen obtenida al microscopio óptico de la muestra enriquecida en células parietales de la mucosa gástrica de conejo. *Azul de trypan*.

### **3.2.3. Aislamiento de las fracciones apical y basolateral de la membrana plasmática de las células parietales.**

La preparación de células parietales de la mucosa gástrica, constituida por el conjunto de las fracciones 3 y 4 de la elutriación, se centrifugaba a 177 x g durante 5 min, a 24°C. El sobrenadante se desechaba y el sedimento enriquecido en células parietales era resuspendido en tampón de homogenización hasta un volumen de unos 15 ml con una concentración aproximada de  $60 \times 10^6$  cel/ml y se transfería a un vaso de homogenización Potter-Elvehjem de fondo cónico para ser homogenizadas. La homogenización se realizaba a 2.000 rpm, mediante 35 pases en un homogenizador HEIDOLPH, a 4°C. Se monitorizaba la extensión de la lisis celular mediante la observación al microscopio óptico del número de células intactas tras el homogenado, y se observaba que este procedimiento de homogenización originaba una ruptura celular superior al 80% con la liberación de numerosos núcleos intactos. El homogenado se centrifugaba a 700 x g, durante 10 minutos, a 4°C, con el fin

de que sedimentaran los núcleos y se separaba el sobrenadante ( $S_1$ ). Con la finalidad de incrementar al máximo la recuperación de los fragmentos de membrana que pudieran haber quedado en el sedimento nuclear, éste se resuspendía de nuevo en tampón de homogenización y se homogenizaba y centrifugaba en las condiciones descritas anteriormente. El sedimento obtenido se desechaba y se recogía el nuevo sobrenadante ( $S_2$ ). Todo el procedimiento posterior se llevaba a cabo igualmente a 4°C.

Se preparaba un gradiente discontinuo de sacarosa colocando en el fondo de un tubo de centrifuga 10 ml de sacarosa 47% y sobre él 10 ml de sacarosa 40%. Encima de este gradiente se vertía con cuidado el combinado de los sobrenadantes  $S_1$  y  $S_2$  (S) y se centrifugaba en un rotor TST 28.38 a 100.000 x g, durante 45 minutos. Se obtenían dos fracciones de membrana plasmática, una de color blanco enriquecida en membrana apical en la interfase sobrenadante - banda de sacarosa 40% (MA), y la otra de un color marrón con membrana basolateral situada en la interfase de las bandas de sacarosa 40% y 47% (MBL). Cada fracción se recuperaba separadamente mediante aspiración y se resuspendía en medio de resuspensión II ó en medio de resuspensión III, según se destinara a los estudios de las actividades de los enzimas marcadores o a los estudios de unión con radioligandos, respectivamente. A fin de quelar cationes divalentes endógenos, destruir ligandos endógenos lábiles e inactivar trazas de proteasas, las fracciones de membrana se incubaban en reposo durante 30 minutos. A continuación, cada suspensión de membrana se centrifugaba a 120.000 x g, durante 30 minutos en un rotor TFT 55.38. Los sedimentos resultantes se resuspendían mediante homogenización suave en el medio adecuado antes referido según su destino. Todas las muestras se resuspendían a una concentración de 1 mg/ml y se almacenaban a -80°C hasta su utilización.

La concentración de proteína en las fracciones de membrana plasmática se determinaba mediante el método de Bradford (19), utilizando como estándar la albúmina de suero bovino.



### **3.2.4. Análisis del enriquecimiento de las fracciones de membrana plasmática.**

Como criterios de enriquecimiento de las fracciones de membrana plasmática se emplearon varios enzimas marcadores: 5'-nucleotidasa como indicador de la recuperación de membrana plasmática (41), H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa como marcador específico de membrana plasmática apical de célula parietal de mucosa gástrica (64, 120), Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa como marcador de membrana plasmática basolateral de célula parietal de mucosa gástrica (32, 64, 139), y glucosa-6-fosfatasa como marcador de retículo endoplásmico (41).

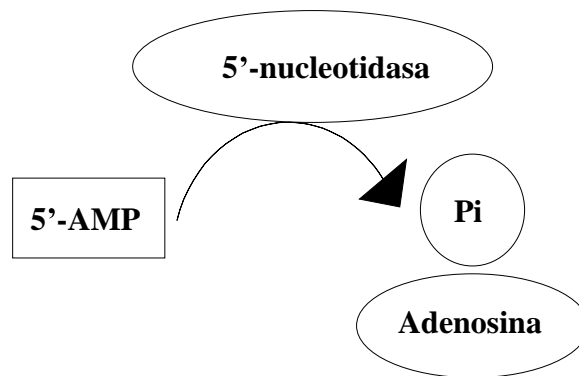
Las actividades enzimáticas se expresaban en  $\mu$ moles de fosfato inorgánico liberado por mg de proteína y por hora.

La cantidad de fosfato inorgánico liberado en las reacciones se determinaba por el método de Fiske y Subbarow (44). Para ello, tras parar la reacción enzimática mediante la inmersión de los tubos con las muestras en hielo y la adición de ácido perclórico, se agregaba a cada tubo de reacción 1ml de H<sub>2</sub>O, se añadía 0,5 ml de heptamolibdato amónico al 5% en ácido sulfúrico 5 N y se agitaba. A continuación se añadían 0,5 ml de reactivo reductor, se agitaba la mezcla y se incubaba durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Por último, se leían las absorbancias de cada muestra a 660 nm. La cantidad de fosfato inorgánico liberado se determinaba extrapolando los valores de absorbancia obtenidos en una recta patrón.

Los experimentos se llevaban a cabo por duplicado, y se repetían al menos tres veces ( $n \geq 3$ ). Todos los cálculos de actividades enzimáticas se hicieron con la ayuda de un programa de ordenador (GraphPad, Prism, USA). Los resultados se expresaban como la media  $\pm$  error estándar de la media.

### Medida de la actividad 5'-nucleotidasa.

La actividad 5'-nucleotidasa se determinaba midiendo la cantidad de fosfato inorgánico capaz de liberar el enzima a partir del sustrato 5'-AMP (8):

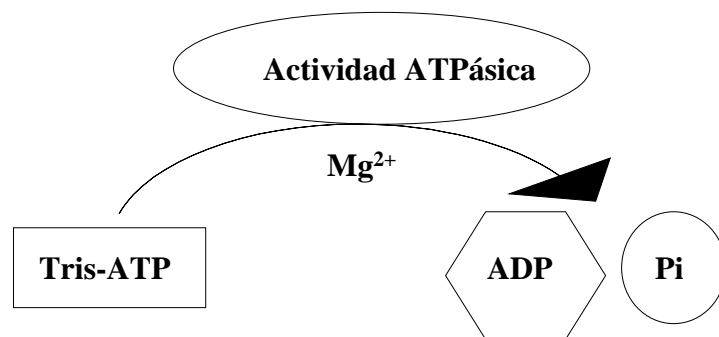


Se añadían 50  $\mu$ l de membrana plasmática (0,4 mg/ml) a 450  $\mu$ l de la mezcla de reacción y se incubaban en tubos de polipropileno en un baño con agitación, a 37°C, durante 30 minutos. La reacción se paraba colocando los tubos de ensayo en hielo y añadiendo a cada uno 2,5 ml de ácido perclórico 0,3 N frío. Se preparaban también dos blancos a los que se añadían los 50  $\mu$ l de membrana después de añadir el ácido perclórico.

Una vez parada la reacción, se añadía 1 ml de H<sub>2</sub>O al contenido de cada tubo. Después se determinaba la cantidad de fosfato inorgánico liberado por el método de Fiske y Subbarow (44).

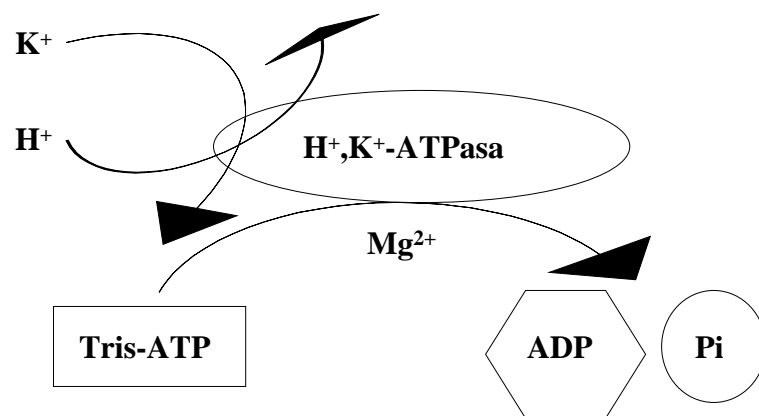
### Medida de la actividad de las ATPasas

Cuando una alícuota de membrana se incubaba en un medio de reacción con el sustrato 5'-AMP y Mg<sup>2+</sup> siempre tiene lugar una cierta liberación de fosfato inorgánico (Pi) debido a una cierta actividad ATPásica inespecífica, debida a cualquier tipo de ATP-asa presente en la membrana (51).



Por lo tanto, a la hora de calcular cuánto fosfato inorgánico ha sido liberado por una ATPasa concreta hay que tener en cuenta que el valor obtenido siempre será superior al real debido a la contribución de la acción inespecífica de las demás ATPasas presentes en la membrana.

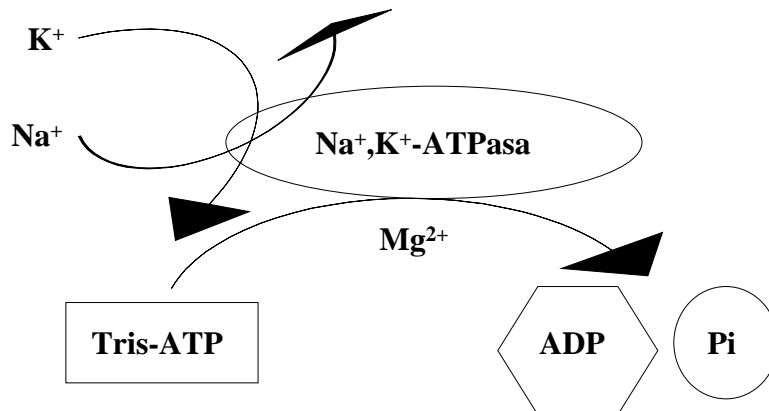
#### ***Actividad H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa***



La actividad H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa requiere de la presencia de iones Mg<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup> en el medio de incubación además de Tris-ATP como sustrato (64). Como la actividad ATPasa medida en el medio de reacción en presencia de iones Mg<sup>2+</sup> y en ausencia de iones K<sup>+</sup> se corresponde con la actividad Mg<sup>2+</sup>-ATPasa ó "ATPasa basal" (51), se definía la actividad H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa como la actividad presentada en el medio de incubación en presencia de KCl 10 mM menos la actividad que tenía lugar en el medio de incubación sin la presencia de KCl.

La reacción se iniciaba añadiendo 50  $\mu$ l de membrana (0,2 mg/ml) a 1.950  $\mu$ l del medio correspondiente. Se incubaba en un baño con agitación durante 15 minutos, a 37°C. La reacción se paraba colocando los tubos en hielo y añadiendo a cada uno 1 ml de ácido perclórico 0,75 N frío. Se añadía 1 ml de H<sub>2</sub>O al contenido de cada tubo, y, al igual que en el caso anterior, la determinación del fosfato inorgánico liberado en la reacción enzimática se llevaba a cabo mediante el método de Fiske y Subbarow (44).

### **Actividad Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa.**

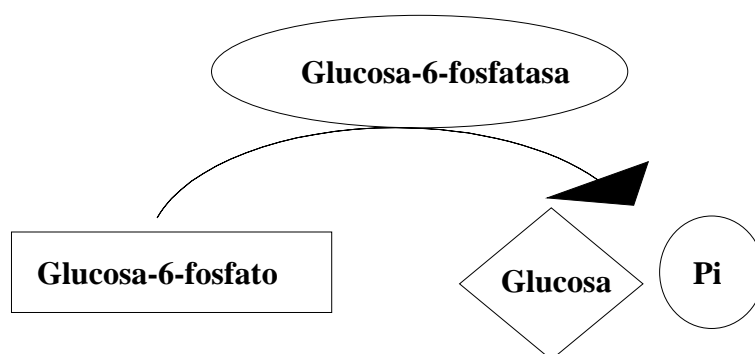


La actividad Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa depende de la presencia de iones Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> en el medio de incubación además del sustrato (Tris-ATP) (137). Por otro lado la actividad ATPasa medida en el medio de reacción en presencia de iones Mg<sup>2+</sup> e iones K<sup>+</sup> y en ausencia de iones Na<sup>+</sup> se corresponde con la suma de las actividades Mg<sup>2+</sup>-ATPasa e H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa, por lo tanto se definía la actividad Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa como la actividad en el medio de incubación en presencia de NaCl 100 mM y KCl 10 mM menos la actividad en el medio de incubación en presencia de KCl 10 mM.

Cada reacción se iniciaba añadiendo en los tubos de ensayo 50  $\mu$ l de membrana (0,2 mg/ml) a 1.950  $\mu$ l del medio correspondiente. El procedimiento posterior era el mismo que en el ensayo de la H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa.

### Medida de la actividad glucosa-6-fosfatasa.

La actividad glucosa-6-fosfatasa se medía determinando la liberación de fosfato inorgánico a partir de glucosa-6-fosfato (8):

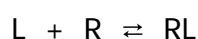


Se iniciaba la reacción añadiendo en los tubos de ensayo 50  $\mu$ l de membrana (2 mg/ml) a 450  $\mu$ l de la mezcla de reacción. Se incubaban en un baño con agitación, a 37°C, durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, la reacción se paraba colocando los tubos en hielo y añadiendo a cada uno 2,5 ml de ácido perclórico 0,3 N frío. Se preparaban dos blancos de la misma forma que en el ensayo de la 5'-nucleotidasa y todo el procedimiento posterior era el mismo.

### 3.2.5. Estudio de la unión de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S a las fracciones de membrana plasmática.

#### Caracterización de receptores mediante la unión de radioligandos

La interacción del radioligando con el receptor es una reacción de tipo bimolecular que conduce a la formación de una cierta cantidad de complejo radioligando-receptor, que con el tiempo puede representarse por el siguiente equilibrio:



donde L representa la concentración del radioligando, R la concentración del receptor y RL la concentración del complejo radioligando-receptor en el equilibrio. El equilibrio se establece cuando las velocidades de asociación y disociación se igualan. Este proceso es, por tanto, reversible, saturable y se rige por la ley de acción de masas, según la cual la concentración de radioligando unido [RL] es proporcional al producto de la concentración del radioligando libre [L] por la concentración del receptor libre [R]) según una constante ( $K_a$ ) que representa la constante de afinidad del radioligando por el receptor:

$$K_a = [RL] / [L] \cdot [R]$$

En la caracterización de un receptor mediante estudios de unión a radioligandos se llevan a cabo tres tipos de experimentos prototipos: a) experimentos cinéticos, b) experimentos de saturación y c) experimentos de competición.

Los experimentos de cinética consisten en el estudio tanto de la formación como de la disociación del complejo radioligando-receptor en función del tiempo. Estos dos procesos pueden ser descritos por dos constantes de velocidad que son  $k_{+1}$  para la asociación y  $k_{-1}$  para la disociación. El cociente de estas dos constantes ( $k_{+1}/k_{-1}$ ) es igual a  $K_a$ .

En los experimentos de asociación, las concentraciones del receptor y del radioligando son constantes y se determina la concentración del radioligando unido al receptor en función del tiempo. La curva que se obtiene nos permite obtener información acerca de la saturación del receptor, del tiempo de equilibrio de la reacción (lo que es imprescindible para diseñar correctamente los experimentos de saturación y de competición) y también se puede determinar la constante intrínseca de asociación  $k_{+1}$ .

En los experimentos de disociación una concentración fija del radioligando se incuba con una concentración también fija del receptor el tiempo suficiente para que se alcance el equilibrio. La disociación del complejo formado es inducida por la adición en el medio de incubación de un exceso de una molécula no radiactiva con afinidad por el receptor (competidor) que

desplace al radioligando de su unión reversible con el mismo. Este experimento nos permite, primero, calcular la constante intrínseca de disociación  $k_{-1}$  y, segundo, diferenciar la unión específica del ligando a su receptor, que es reversible y saturable, de la unión inespecífica del radioligando, que es una unión no saturable y puede tratarse de una interacción con un sistema proteico de la membrana plasmática, o bien una solubilización del radioligando en una estructura lipídica, o también una fijación en los filtros de fibra de vidrio. La tasa de unión inespecífica se define por la radiactividad retenida, no desplazada por el competidor no marcado utilizado en la disociación, ya que esta unión no es reversible.

En los estudios de saturación se incuban concentraciones crecientes del radioligando con una concentración fija del receptor el tiempo necesario hasta alcanzar el equilibrio. En estos experimentos el cálculo de la unión específica del radioligando al receptor se realiza de modo indirecto a partir de los cálculos de la unión total y de la unión inespecífica. Para ello se llevan a cabo paralelamente dos tipos de experimentos, uno que lleva únicamente concentraciones crecientes de ligando radiactivo, que nos proporciona los valores de la unión total (específica + inespecífica) y otro idéntico al anterior, pero añadiendo además una concentración fija de una molécula competidora no marcada, del que se obtiene la unión inespecífica. La unión específica se calcula mediante la diferencia entre la unión total y la unión inespecífica. Los parámetros obtenidos de este tipo de experimentos son la afinidad del radioligando por el receptor, generalmente expresada por la constante de disociación del equilibrio ( $K_d$ ), y el número o la densidad de sitios de unión ( $B_{max}$ ).

En los experimentos de competición son constantes la concentración del receptor, la concentración del radioligando y el tiempo de incubación, pero varía la concentración del competidor de la unión. En este tipo de experimentos se pretende obtener información sobre la interacción entre el competidor y el receptor a partir de la competición por la ocupación del receptor que se establece entre el radioligando y el competidor. Al incrementar la concentración del competidor, la competición que ejerce éste con el radioligando por el receptor es mayor, con lo cual disminuye el radioligando unido. Así se puede calcular la constante de inhibición ( $K_i$ ) del competidor, el

cual indica su afinidad por el receptor. Puede definirse también el parámetro  $IC_{50}$  (concentración inhibitoria 50%) como la concentración del fármaco competidor que inhibe el 50% de la unión específica del radioligando.

En todos los experimentos, la cuantificación de la unión exige la separación del radioligando unido del que queda libre en disolución. En los ensayos de unión a membranas, un método comúnmente utilizado es la filtración rápida a través de filtros de fibra de vidrio. El proceso de separación mediante este método puede completarse entre 15 y 20 segundos. Los fragmentos de membrana que contienen los complejos radioligando-receptor son retenidos por el filtro, mientras que el radioligando libre pasa a través del mismo. Para reducir la unión inespecífica, las membranas y el filtro se lavan con tampón. Además, pueden usarse los filtros previamente humedecidos con ciertas disoluciones, lo que disminuye la unión inespecífica al filtro.

### **Estudio cinético de la unión de [ $^{35}S$ ]dATP $\alpha$ S a las fracciones de membrana plasmática**

En los experimentos de asociación, se incubaba la fracción de membrana plasmática basolateral (25  $\mu$ g de proteína), a temperatura ambiente, con el radioligando [ $^{35}S$ ]dATP $\alpha$ S (60 nM), en un volumen final de 0,25 ml de medio de resuspensión III, y se determinaba la radiactividad unida tras diferentes tiempos de incubación (0-135 min). En los experimentos de disociación, las membranas se incubaban previamente durante 60 min (equilibrio) con el radioligando (60 nM) y se iniciaba la disociación de la unión mediante la adición de 2-MeSATP 100  $\mu$ M considerando este momento  $t = 0$  del desplazamiento de la unión específica de [ $^{35}S$ ]dATP $\alpha$ S y se determinaba a distintos tiempos (0-135 min).

### **Experimentos de saturación de la unión de [ $^{35}S$ ]dATP $\alpha$ S a las fracciones de membrana plasmática**

Las fracciones de membrana plasmática (5  $\mu$ g de proteína) se incubaban durante 1h, a temperatura ambiente, (135), en medio de resuspensión III, con concentraciones crecientes de [ $^{35}S$ ]dATP $\alpha$ S (1-100 nM) en un volumen final de 0,25 ml. La unión no específica se determinaba en las



mismas condiciones pero añadiendo un exceso de ATP (100  $\mu$ M).

### **Experimentos de competición de la unión de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S a las fracciones de membrana plasmática**

Se determinaba el desplazamiento de la unión de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S 10 nM a la fracción de membrana ocasionado por la presencia en el medio de incubación de concentraciones crecientes (1nM a 100  $\mu$ M) de diferentes agonistas (ATP, dATP, 2-MeSATP,  $\beta,\gamma$ -meATP, UTP, ADP $\beta$ S, ATP $\gamma$ S, 2-MeSADP) y antagonistas (suramina, RB-2, PPADS, A2P5PS) de los receptores P2Y.

### **Inhibición por GDP de la unión de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S a las fracciones de membrana plasmática**

Los receptores P2Y son receptores de nucleótidos de purina y pirimidina acoplados a proteínas G. Para examinar la implicación de estas proteínas en la unión de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S a la fracción de membrana plasmática basolateral se estudió el efecto que ejercía sobre esa unión el GDP, conocido inhibidor de las proteínas G (13, 91). Para ello, se incubaban las membranas con concentraciones crecientes del radioligando de forma similar a los experimentos de saturación, añadiendo al medio de incubación GDP 10  $\mu$ M, y se determinaban la  $K_d$  y la  $B_{max}$ . Estos experimentos eran llevados a cabo en presencia de MgSO<sub>4</sub> 5mM, ya que son necesarias concentraciones milimolares de cationes divalentes como el Mg<sup>2+</sup> para que los nucleótidos de guanina puedan desplegar su efecto inhibitor sobre las proteínas G acopladas a distintos receptores (91, 126, 135), entre ellos los receptores P2Y.

### **Cuantificación de la unión de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S a las fracciones de membrana plasmática**

La cantidad de radioligando unido a la membrana se calculó en todos los casos mediante la determinación de la radiactividad del complejo membrana plasmática-radioligando, transferido a filtros de fibra de vidrio GF/B (prehumedecidos en una disolución de pirofosfato sódico 20 mM) mediante filtración rápida de las muestras de ensayo a través de un "cell harvester" SKATRON INSTRUMENTS MICRO 96; durante la misma, los filtros se lavaban

con 5 ml de TRIS-HCl 50 mM frío y se secaban por aspiración. Seguidamente, los filtros se transferían a viales que contenían 3 ml de líquido de centelleo Optiphase HiSafe II, y la radiactividad de las muestras se determinaba en un espectrofotómetro  $\beta$  de centelleo líquido PACKARD 2500 TR.

### **Análisis de los datos**

Todos los estudios de unión a radioligandos se llevaban a cabo por triplicado, y se repetían al menos tres veces con material proveniente de animales diferentes ( $n \geq 3$ ).

El ajuste de la dispersión de puntos obtenidos experimentalmente a la función curva correspondiente (asociación, disociación, saturación y competición) se realizó mediante técnicas de regresión no lineal utilizando un programa de ordenador basado en procedimientos de cálculo iterativo (GraphPad, Prism, USA), que permite, además, la comparación de modelos de uno o más sitios de unión. Este programa fue utilizado para la obtención de los gráficos correspondientes, que aparecen en el capítulo de resultados, y para el cálculo de los parámetros que definen la unión: las constantes de velocidad de asociación ( $k_{+1}$ ) y de disociación ( $k_{-1}$ ) de los experimentos cinéticos, la capacidad máxima de unión ( $B_{\max}$ ) y la constante de disociación del complejo radioligando-receptor en el equilibrio ( $K_d$ ) de los experimentos de saturación, así como los valores  $IC_{50}$  de los experimentos de competición. Estos parámetros se calcularon directamente de la curva de regresión no lineal, evitando la necesidad de transformadas lineales (Scatchard, etc.) que resultan menos precisas y distorsionan el error experimental. No obstante, se realizó la gráfica de Scatchard para una mejor visualización del efecto inhibitor de GDP sobre la unión de [ $^{35}$ S]dATP $\alpha$ S a la fracción basolateral de la membrana plasmática. La dificultad en la estimación de la concentración libre de ligando se ha superado aplicando el procedimiento descrito por Swillens (140), que da mejores resultados que el cálculo tradicional a partir de la concentración de ligando añadida.

Se utilizaron criterios estadísticos objetivos (test F, principio de la suma de mínimos cuadrados,  $R^2$ ), para evaluar la curva óptima y para discriminar entre los modelos de unión a uno o más sitios.

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media.

### **3.2.6. Medida de la actividad adenilato ciclasa.**

La determinación de la actividad adenilato ciclasa en membranas plasmáticas de células parietales de mucosa gástrica se realizaba según el protocolo descrito por Malbon *et al.* (90) con algunas modificaciones. El ensayo se realizaba en un volumen final de 250  $\mu$ l. Las membranas (10-20  $\mu$ g/tubo de ensayo) se añadían al medio de resuspensión IV, el sistema regenerador y los correspondientes agentes (histamina, forskolina, ADP $\beta$ S, ATP $\gamma$ S, 2-MeSATP, 2-MeSADP, A2P5PS), incubándose a 30°C, durante 5-6 min. La reacción se iniciaba con la adición de ATP (200  $\mu$ M concentración final). Tras la incubación a 30°C durante 10 min, la reacción se paraba sometiendo las muestras a ebullición durante 3 min y centrifugando a 12.000 x g, 2 min. Se preparaban blancos para determinar la concentración de AMPc endógeno; éstos eran hervidos antes de añadir el ATP. Del sobrenadante se separaban 50  $\mu$ l para la posterior determinación del AMPc según lo descrito por Nordstedt y Fredholm (100) mediante la técnica del radioinmunoensayo, utilizando proteína quinasa dependiente de AMPc (PK A) purificada de corteza adrenal bovina como proteína de unión al AMPc.

Los experimentos se llevaban a cabo por duplicado, y se repetían al menos tres veces ( $n \geq 3$ ). Todos los cálculos de actividades enzimáticas se hicieron con la ayuda de un programa de ordenador (GraphPad, Prism, USA). Los resultados se expresaban como la media  $\pm$  error estándar de la media.



## **4. RESULTADOS**



#### **4.1. ANÁLISIS DEL ENRIQUECIMIENTO Y SEPARACIÓN DE LAS FRACCIONES APICAL Y BASOLATERAL DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LAS CÉLULAS PARIETALES.**

Con la finalidad de determinar el procedimiento óptimo a seguir para enriquecer y separar las fracciones apical y basolateral de la membrana plasmática de las células parietales de la mucosa gástrica de conejo se ensayaron diversas condiciones de procesamiento en las etapas de homogenización, centrifugación diferencial y centrifugación en gradiente a las que iba a ser sometida la preparación enriquecida en células parietales obtenida mediante elutriación.

Se midió en primer lugar el grado más adecuado de homogenización de la preparación de células parietales aisladas. Se realizaron ensayos aumentando escalonadamente las rpm del homogenizador y el número de pases, y se monitorizó la extensión de la lisis celular mediante la observación al microscopio óptico del número de células intactas tras el homogenado. El procedimiento finalmente elegido originaba una ruptura celular superior al 80% con la liberación de numerosos núcleos intactos.

Una vez obtenido el sedimento nuclear tras centrifugar el homogenado a 700 x g, durante 10 minutos, mediante el estudio de la distribución de los enzimas marcadores de membrana plasmática apical y basolateral, se testó la conveniencia o no de la adición de un segundo paso de homogenización del sedimento nuclear obtenido para así incrementar al máximo la recuperación de los fragmentos de membrana que pudieran haber sedimentado junto con dicha fracción.

La siguiente condición examinada fue la etapa de centrifugación en gradiente. Se probaron varios gradientes discontinuos de sacarosa y se determinaron la recuperación y separación de los marcadores enzimáticos de membrana plasmática apical y basolateral en las distintas bandas recogidas.

Así mismo se examinaron las condiciones del ensayo de los enzimas  $H^+,K^+$ -ATPasa y  $Na^+,K^+$ -ATPasa, y se comprobó si era necesario o no incluir inhibidores de los enzimas (ouabaína, omeprazol) en el medio de reacción.

## RESULTADOS

---

Después de numerosos experimentos se adoptó el procedimiento descrito en Material y Métodos y que consiste, brevemente, en lo siguiente: la suspensión enriquecida en células parietales gástricas se homogenizó a 2000 rpm, mediante 35 pases. El homogenado (H) se centrifugó a 700 x g durante 10 minutos, obteniéndose un primer sobrenadante (S<sub>1</sub>) y sedimento. Este sedimento se homogenizó y centrifugó de igual manera, obteniéndose un segundo sobrenadante (S<sub>2</sub>) y un nuevo sedimento. El combinado de los sobrenadantes S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub> (S) se colocó sobre un gradiente de sacarosa y se procedió a su centrifugación. Se recogieron dos fracciones, una en la interfase sobrenadante-sacarosa 40% (MA) y otra en la interfase sacarosa 40%-sacarosa 47% (MBL).

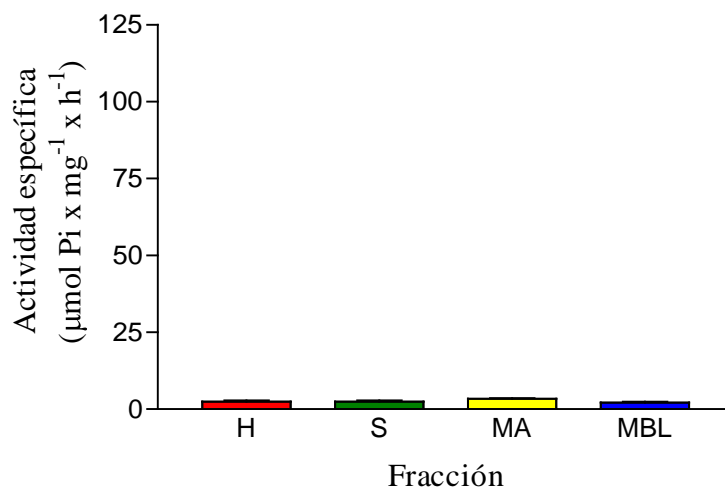
Para analizar el enriquecimiento en fracciones apical y basolateral de la membrana plasmática de las células parietales, se procedió al estudio de las actividades de conocidos enzimas marcadores en las distintas fracciones obtenidas.

El enriquecimiento y la recuperación de membrana plasmática apical se ensayó utilizando como marcador enzimático la H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa. El enriquecimiento y la recuperación de membrana plasmática basolateral fue medido utilizando el enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa como marcador. Además se ensayó la actividad 5'-nucleotidasa, enzima comúnmente utilizado como marcador de membrana plasmática.

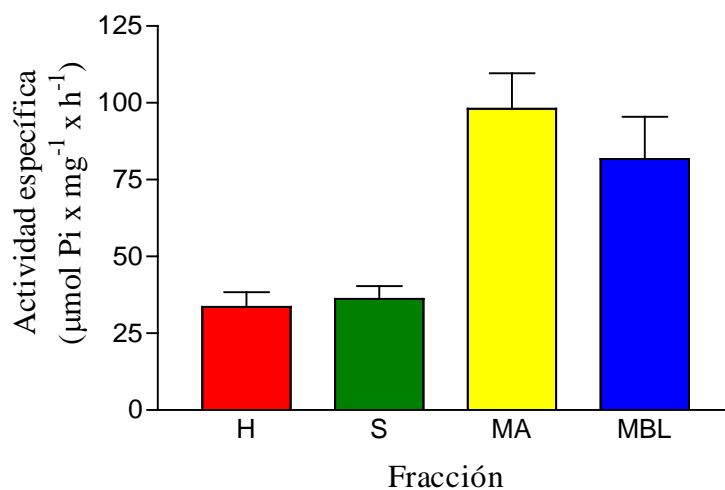
Para estudiar la contaminación de las fracciones de membrana plasmática por retículo endoplásmico se ensayó la actividad glucosa-6-fosfatasa, conocido marcador de esta fracción subcelular.

En las Figuras 18-21 se representan las distribuciones de las actividades específicas de los enzimas marcadores ensayados expresadas en  $\mu\text{moles}$  de fosfato inorgánico liberado por miligramo de proteína y por hora ( $\mu\text{mol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ ) en las distintas fracciones recogidas.

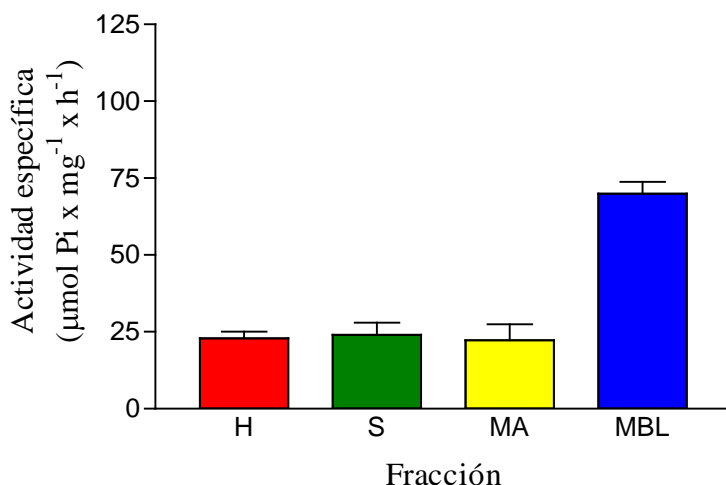




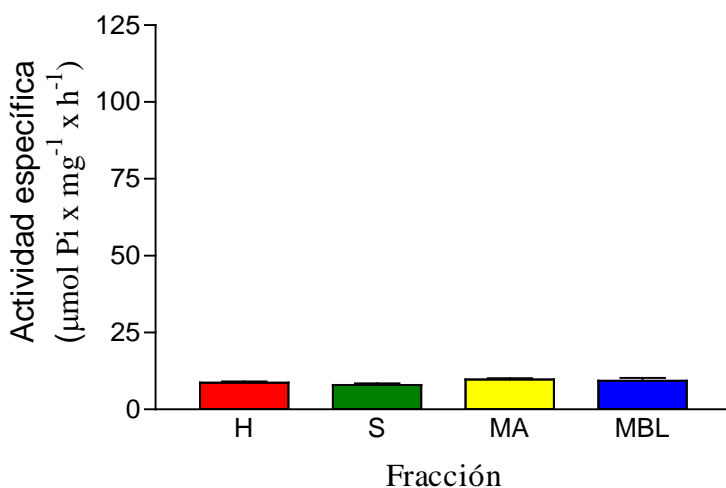
**Figura 18.** Distribución de las actividades específicas del enzima 5'-nucleotidasa ( $\mu$ moles de fosfato inorgánico liberado por miligramo de proteína y por hora) en las diferentes fracciones obtenidas durante el proceso de separación de las fracciones apical y basolateral de la membrana plasmática de las células parietales de la mucosa gástrica de conejo: homogenado (H), tras la centrifugación del homogenado a 700 x g (S) y la centrifugación de este sobrenadante en gradiente de sacarosa, obteniendo una fracción de membranas en la interfase sobrenadante-sacarosa 40% (MA) y otra en la interfase sacarosa 40%-sacarosa 47% (MBL). Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes donde las valoraciones se hicieron por duplicado.



**Figura 19.** Distribución de las actividades específicas del enzima  $H^+,K^+$ -ATPasa ( $\mu$ moles de fosfato inorgánico liberado por miligramo de proteína y por hora) en las diferentes fracciones obtenidas durante el proceso de separación de las fracciones apical y basolateral de la membrana plasmática de las células parietales de la mucosa gástrica de conejo: homogenado (H), tras la centrifugación del homogenado a 700 x g (S) y la centrifugación de este sobrenadante en gradiente de sacarosa, obteniendo una fracción de membranas en la interfase sobrenadante-sacarosa 40% (MA) y otra en la interfase sacarosa 40%-sacarosa 47% (MBL). Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes donde las valoraciones se hicieron por duplicado.



**Figura 20.** Distribución de las actividades específicas del enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa (µmoles de fosfato inorgánico liberado por miligramo de proteína y por hora) en las diferentes fracciones obtenidas durante el proceso de separación de las fracciones apical y basolateral de la membrana plasmática de las células parietales de la mucosa gástrica de conejo: homogenado (H), tras la centrifugación del homogenado a 700 x g (S) y la centrifugación de este sobrenadante en gradiente de sacarosa, obteniendo una fracción de membranas en la interfase sobrenadante-sacarosa 40% (MA) y otra en la interfase sacarosa 40%-sacarosa 47% (MBL). Los datos representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes donde las valoraciones se hicieron por duplicado.



**Figura 21.** Distribución de las actividades específicas del enzima glucosa-6-fosfatasa (µmoles de fosfato inorgánico liberado por miligramo de proteína y por hora) en las diferentes fracciones obtenidas durante el proceso de separación de las fracciones apical y basolateral de la membrana plasmática de las células parietales de la mucosa gástrica de conejo: homogenado (H), tras la centrifugación del homogenado a 700 x g (S) y la centrifugación de este sobrenadante en gradiente de sacarosa, obteniendo una fracción de membranas en la interfase sobrenadante-sacarosa 40% (MA) y otra en la interfase sacarosa 40%-sacarosa 47% (MBL). Los datos representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes donde las valoraciones se hicieron por duplicado.

En las Tablas 5-8 se muestra la escala de enriquecimiento enzimático obtenido tras el procesamiento del homogenado de células parietales de mucosa gástrica de conejo. La actividad enzimática total, expresada en  $\mu\text{moles}$  de fosfato inorgánico por hora, se ha calculado en cada fracción y para cada uno de los enzimas ensayados multiplicando el valor de la actividad enzimática específica correspondiente ( $\mu\text{mol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ ) por la cantidad de proteína (mg) obtenida en la fracción correspondiente. Para cada enzima y fracción, la actividad específica relativa se calcula dividiendo la actividad específica del enzima en la fracción entre la actividad del enzima en el homogenado; lo que da una aproximación de la purificación enzimática conseguida en cada fracción.

En las Figuras 22-25 se representan las actividades específicas relativas de los distintos enzimas marcadores en las fracciones H, S, MA y MBL.

Los datos mostrados en las Figuras 18-25 y en las Tablas 5-8 constataban que la fracción recogida en la interfase S-40% (MA), donde se recuperaba el 6,99% de la cantidad de proteína total presente en el homogenado, contenía aproximadamente el 23,90% de la actividad total inicial del marcador de membrana plasmática apical ( $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPasa) purificado 3,42 veces respecto al homogenado. Se observó que en esta fracción se recuperaba solamente el 6,81% de la actividad enzimática total de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa presente en el homogenado y que no existía enriquecimiento de este marcador de membrana plasmática basolateral, puesto que mostraba respecto al homogenado una actividad específica relativa de 0,97. En esta fracción (MA) se obtuvo una actividad específica de  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPasa ( $114,68 \pm 9,73 \mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ ) 5,15 veces mayor que la actividad específica de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa ( $22,26 \pm 5,22 \mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ ) en la misma. No obstante, se obtuvo solamente 1,87 veces más actividad específica  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPasa que en la fracción recogida en la interfase 40-47% (MBL). La actividad específica del enzima marcador de membrana plasmática 5'-nucleotidasa en la fracción MA era 1,44 veces superior respecto a la actividad encontrada en el homogenado. La actividad del enzima glucosa-6-fosfatasa en esta fracción no era significativamente diferente respecto a la actividad en el homogenado.

## RESULTADOS

**Tabla 5.** Escala de enriquecimiento de la 5'-nucleotidasa a partir de un homogenado de células parietales de mucosa gástrica de conejo.

Etapa de purificación	Actividad enzimática total ( $\mu\text{mol Pi / h}$ )	Proteína total (mg)	Actividad específica ( $\mu\text{mol Pi x mg}^{-1} \text{ x h}^{-1}$ )	Recuperación de la actividad enzimática total (%)	Actividad específica relativa
H	621	252,25 $\pm$ 11,82	2,46 $\pm$ 0,46	100,00	1,00
S	391	158,80 $\pm$ 12,73	2,46 $\pm$ 0,36	62,96	1,00
<b>MA</b>	63	17,64 $\pm$ 1,46	3,54 $\pm$ 0,29	10,00	1,44
MBL	67	25,01 $\pm$ 0,93	2,67 $\pm$ 0,20	10,79	1,09

**Tabla 6.** Escala de enriquecimiento de la H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa a partir de un homogenado de células parietales de mucosa gástrica de conejo.

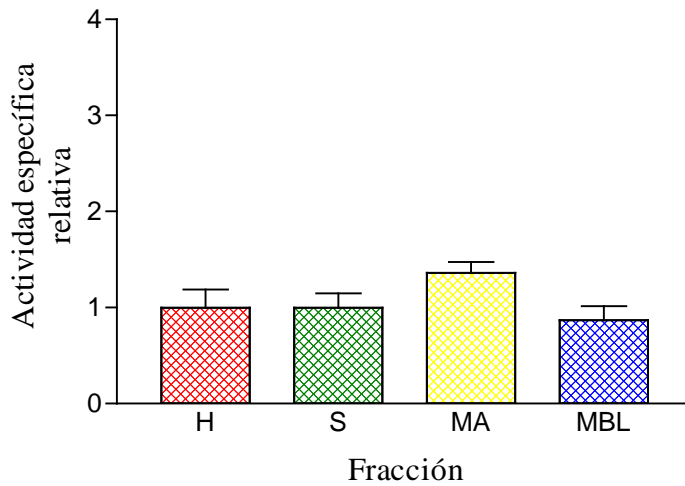
Etapa de purificación	Actividad enzimática total ( $\mu\text{mol Pi / h}$ )	Proteína total (mg)	Actividad específica ( $\mu\text{mol Pi x mg}^{-1} \text{ x h}^{-1}$ )	Recuperación de la actividad enzimática total (%)	Actividad específica relativa
H	8466	252,25 $\pm$ 11,82	33,56 $\pm$ 4,82	100,00	1,00
S	5749	158,80 $\pm$ 12,73	36,20 $\pm$ 4,12	67,91	1,08
MA	2023	17,64 $\pm$ 1,46	114,68 $\pm$ 9,73	23,90	3,42
MBL	1535	25,01 $\pm$ 0,93	61,37 $\pm$ 9,96	18,13	1,83

**Tabla 7.** Escala de enriquecimiento de la Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa a partir de un homogenado de células parietales de mucosa gástrica de conejo.

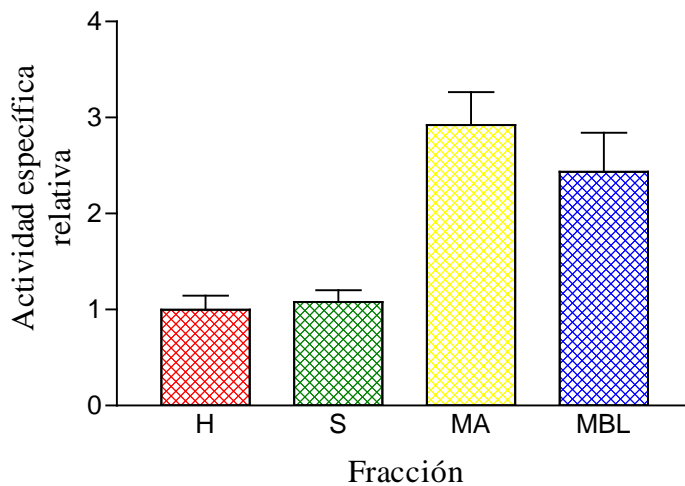
Etapa de purificación	Actividad enzimática total (μmol Pi / h)	Proteína total (mg)	Actividad específica (μmol Pi x mg <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup> )	Recuperación de la actividad enzimática total (%)	Actividad específica relativa
H	5769	252,25 ± 11,82	22,87 ± 2,22	100,00	1,00
S	3819	158,80 ± 12,73	24,05 ± 3,92	66,20	1,05
MA	393	17,64 ± 1,46	22,26 ± 5,22	6,81	0,97
MBL	1748	25,01 ± 0,93	69,90 ± 3,91	30,30	3,06

**Tabla 8.** Escala de enriquecimiento de la glucosa-6-fosfatasa a partir de un homogenado de células parietales de mucosa gástrica de conejo.

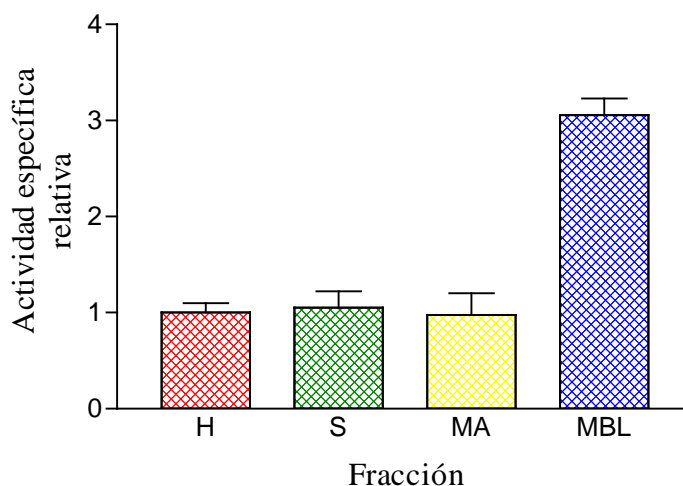
Etapa de purificación	Actividad enzimática total (μmol Pi / h)	Proteína total (mg)	Actividad específica (μmol Pi x mg <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup> )	Recuperación de la actividad enzimática total (%)	Actividad específica relativa
H	2184	252,25 ± 11,82	8,66 ± 0,50	100,00	1,00
S	1266	158,80 ± 12,73	7,97 ± 0,53	57,97	0,92
MA	173	17,64 ± 1,46	9,79 ± 0,32	7,92	1,13
MBL	217	25,01 ± 0,93	8,67 ± 0,67	9,94	1,00



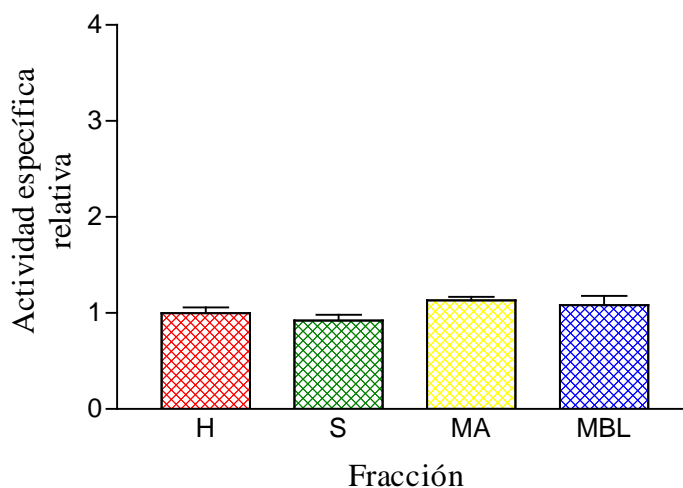
**Figura 22.** Distribución de las actividades específicas relativas del enzima 5'-nucleotidasa en las diferentes fracciones obtenidas durante el proceso de separación de las fracciones apical y basolateral de la membrana plasmática de las células parietales de la mucosa gástrica de conejo: homogenado (H), tras la centrifugación del homogenado a 700 x g (S) y la centrifugación de este sobrenadante en gradiente de sacarosa, obteniendo una fracción de membranas en la interfase sobrenadante-sacarosa 40% (MA) y otra en la interfase sacarosa 40%-sacarosa 47% (MBL). Los datos representan el enriquecimiento enzimático en las distintas fracciones respecto al homogenado.



**Figura 23.** Distribución de las actividades específicas relativas del enzima  $H^+,K^+$ -ATPasa en las diferentes fracciones obtenidas durante el proceso de separación de las fracciones apical y basolateral de la membrana plasmática de las células parietales de la mucosa gástrica de conejo: homogenado (H), tras la centrifugación del homogenado a 700 x g (S) y la centrifugación de este sobrenadante en gradiente de sacarosa, obteniendo una fracción de membranas en la interfase sobrenadante-sacarosa 40% (MA) y otra en la interfase sacarosa 40%-sacarosa 47% (MBL). Los datos representan el enriquecimiento enzimático en las distintas fracciones respecto al homogenado.



**Figura 24.** Distribución de las actividades específicas relativas del enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa en las diferentes fracciones obtenidas durante el proceso de separación de las fracciones apical y basolateral de la membrana plasmática de las células parietales de la mucosa gástrica de conejo: homogenado (H), tras la centrifugación del homogenado a 700 x g (S) y la centrifugación de este sobrenadante en gradiente de sacarosa, obteniendo una fracción de membranas en la interfase sobrenadante-sacarosa 40% (MA) y otra en la interfase sacarosa 40%-sacarosa 47% (MBL). Los datos representan el enriquecimiento enzimático en las distintas fracciones respecto al homogenado.



**Figura 25.** Distribución de las actividades específicas relativas del enzima glucosa-6-fosfatasa en las diferentes fracciones obtenidas durante el proceso de separación de las fracciones apical y basolateral de la membrana plasmática de las células parietales de la mucosa gástrica de conejo: homogenado (H), tras la centrifugación del homogenado a 700 x g (S) y la centrifugación de este sobrenadante en gradiente de sacarosa, obteniendo una fracción de membranas en la interfase sobrenadante-sacarosa 40% (MA) y otra en la interfase sacarosa 40%-sacarosa 47% (MBL). Los datos representan el enriquecimiento enzimático en las distintas fracciones respecto al homogenado.

La fracción recogida en la interfase 40-47% (MBL) contenía aproximadamente el 9,91% de la cantidad de proteína total en el homogenado y el 30% de la actividad total inicial del marcador de membrana basolateral purificado 3,06 veces respecto al homogenado. En esta fracción se recuperaba además el 18,13% de la actividad total inicial del marcador de membrana plasmática apical purificado 1,83 veces respecto al homogenado. Se obtuvo una actividad específica  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa ( $69,90 \pm 3,91 \mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ ) solamente 1,14 veces mayor que la actividad específica  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPasa ( $61,37 \pm 9,96 \mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ ). Pero, por otra parte, se consiguió 3,14 veces más actividad específica  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa que en la fracción MA. Las actividades específicas de los enzimas 5'-nucleotidasa y glucosa-6-fosfatasa en la fracción MBL fueron similares a las actividades respectivas detectadas en el homogenado.

Podemos considerar por lo tanto que la fracción de membrana plasmática apical de las células parietales es la recogida en la interfase S-40% (MA) y que la fracción enriquecida en membrana plasmática basolateral se halla en la interfase 40-47% (MBL).

### **4.2. UNIÓN DE [ $^{35}\text{S}$ ]dATP $_{\alpha}\text{S}$ A LAS FRACCIONES DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE LAS CÉLULAS PARIETALES**

En el presente trabajo estudiamos la unión del radioligando [ $^{35}\text{S}$ ]dATP $_{\alpha}\text{S}$  a fracciones de membrana plasmática de las células parietales de la mucosa gástrica de conejo, células en las que mediante estudios funcionales se había detectado la presencia de receptores P2Y-like (56).

#### **4.2.1. Características cinéticas de la unión de [ $^{35}\text{S}$ ]dATP $_{\alpha}\text{S}$ a las fracciones enriquecidas en membrana plasmática basolateral**

Los experimentos de asociación se llevaron a cabo mediante la incubación de 25  $\mu\text{g}$  de proteína de las fracciones enriquecidas en membrana plasmática basolateral (MBL), a temperatura ambiente, con el [ $^{35}\text{S}$ ]dATP $_{\alpha}\text{S}$  (60 nM), en un volumen final de 0,25 ml, y se determinó la radiactividad unida tras diferentes tiempos de incubación (0-135 min). En los experimentos de

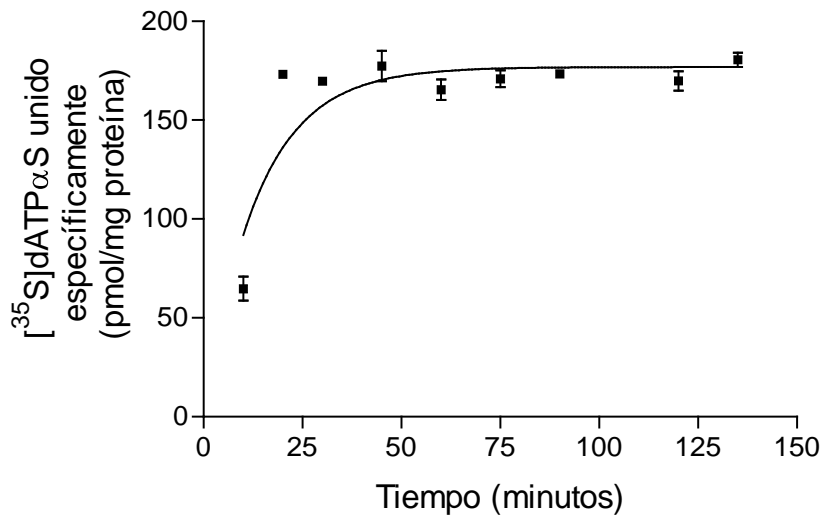


disociación, las membranas se incubaron durante 60 minutos con el radioligando (60 nM) y se inició la disociación de la unión mediante la adición de 2-MeSATP 100  $\mu\text{M}$  a  $t = 0$ ; el desplazamiento de la unión específica de [ $^{35}\text{S}$ ]dATP $\alpha\text{S}$  se determinó a distintos tiempos (0-135 min). En los experimentos de disociación la unión no específica representaba la unión que permanecía sin disociar tras 135 min de incubación en presencia de 2-MeSATP 100  $\mu\text{M}$ . Se hizo una determinación por triplicado y los resultados se muestran en la Tabla 9 y en las Figuras 26 y 27.

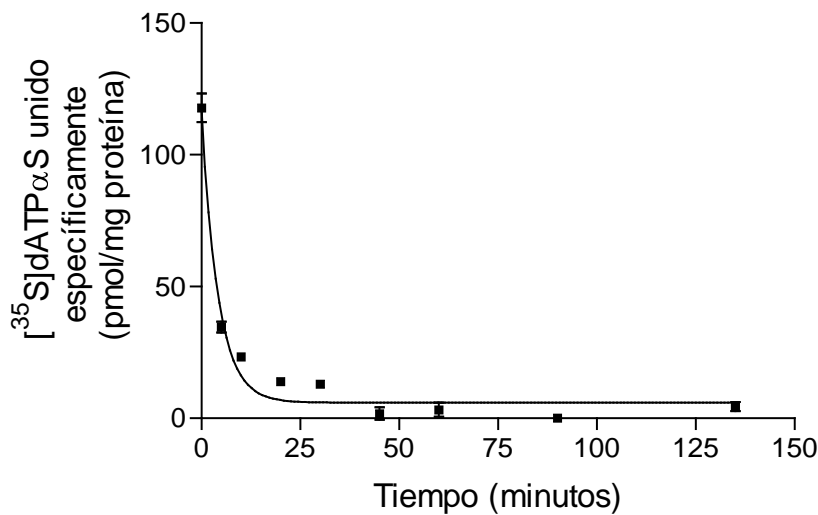
La asociación de la unión de [ $^{35}\text{S}$ ]dATP $\alpha\text{S}$  a las fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basolaterales de células parietales gástricas de conejo era rápida, alcanzándose el equilibrio en 20 min, el cual permanecía durante casi las siguientes 2 horas (Figura 26). Consecuentemente se eligió un tiempo de incubación de 60 min para experimentos posteriores. Tras la adición de 2-MeSATP 100  $\mu\text{M}$ , la unión específica de [ $^{35}\text{S}$ ]dATP $\alpha\text{S}$  fue rápidamente disociada (Figura 26). El análisis de los datos reveló una constante de asociación aparente ( $k_{\text{obs}}$ ) de  $0,394 \pm 0,058 \text{ min}^{-1}$  y  $t_{1/2} = 1,76 \text{ min}^{-1}$  y una constante de disociación ( $k_{-1}$ ) de  $0,099 \pm 0,016 \text{ min}^{-1}$  y  $t_{1/2} = 6,97 \text{ min}$  (Tabla 9). El valor de la constante de asociación ( $k_{+1}$ ) calculada según la ecuación  $k_{+1} = (k_{\text{obs}} - k_{-1})/[\text{radioligando}]$  fue de  $4,92 \times 10^6 \text{ min}^{-1}\text{nM}^{-1}$  (Tabla 9). El ratio de las constantes cinéticas ( $k_{-1}/k_{+1}$ ) nos da un valor estimado de la  $K_d$  de 20 nM.

**Tabla 9.** Constantes cinéticas de la unión de [ $^{35}\text{S}$ ]dATP $\alpha\text{S}$  a fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basolaterales de células parietales de estómago de conejo.

Asociación	$k_{+1} = 4,92 \times 10^6 \text{ min}^{-1}\text{nM}^{-1}$ $t_{1/2} = 1,76 \text{ min}$
Disociación	$k_{-1} = 0,099 \text{ min}^{-1}$ $t_{1/2} = 6,97 \text{ min}$



**Figura 26.** Cinética de asociación de la unión de [<sup>35</sup>S]dATP<sub>α</sub>S a fracciones enriquecidas en membrana plasmática basolateral de células parietales de conejo. El [<sup>35</sup>S]dATP<sub>α</sub>S (60 nM) se incubó con las membranas (25 μg proteína) a temperatura ambiente, y se determinó la radiactividad unida tras diferentes tiempos de incubación (0-135 min). Los resultados mostrados son la media ± SEM de una determinación llevada a cabo por triplicado.



**Figura 27.** Cinética de disociación de la unión de [<sup>35</sup>S]dATP<sub>α</sub>S a fracciones enriquecidas en membrana plasmática basolateral de células parietales de conejo. El [<sup>35</sup>S]dATP<sub>α</sub>S (60 nM) se incubó con las membranas (25 μg proteína) a temperatura ambiente, durante 60 min. La disociación fue iniciada mediante la adición de 2-MeSATP 100 μM; el desplazamiento de la unión se determinó a distintos tiempos (0-135 min). Los resultados mostrados son la media ± SEM de una determinación llevada a cabo por triplicado.

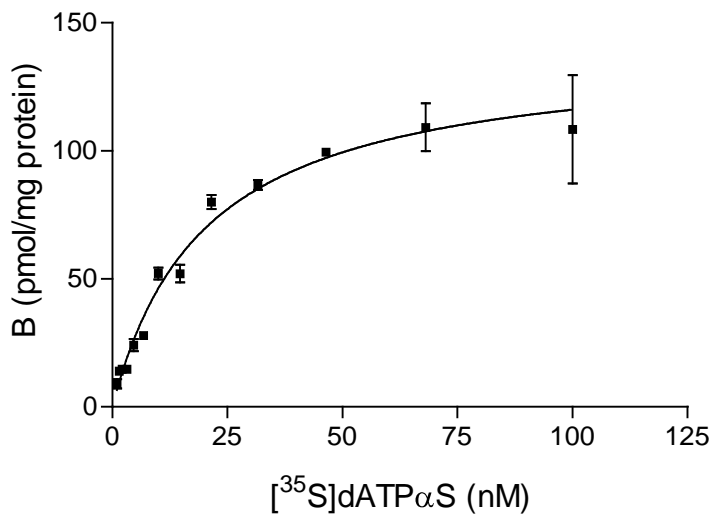
#### 4.2.2. Características de la unión de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S a las fracciones de membrana plasmática en el equilibrio

Para los estudios de unión de saturación, alícuotas de las fracciones enriquecidas en membrana plasmática basolateral y de las fracciones enriquecidas en membrana plasmática apical que contenían 5  $\mu$ g de proteína fueron incubadas por separado, a temperatura ambiente, con 13 concentraciones de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S (1-100 nM) hasta alcanzar el equilibrio (60 min). En ambas situaciones, la unión no específica se definió en presencia de ATP 100  $\mu$ M. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, y se repitieron al menos tres veces en cada caso.

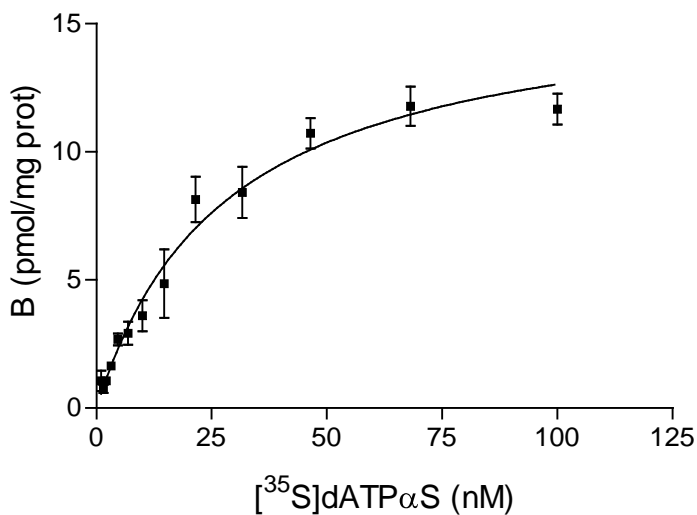
En el rango de concentración de 1 a 100 nM, la unión específica de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S a las fracciones de membrana plasmática apical y basolateral de las células parietales de conejo era saturable (Figuras 28 y 29). Los datos en ambos casos se ajustaron mejor a un único sitio de unión de alta afinidad, como se ilustra en las Figuras 28-31.

Los análisis de regresión no lineal (GraphPad, Prism) dieron un valor de  $K_d$  similar para ambas fracciones de membrana plasmática ( $K_d = 20 \pm 2$  nM para las fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basolaterales, y  $K_d = 28 \pm 5$  nM para las fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas apicales) (Tabla 10). La densidad de los sitios de unión fue, sin embargo, significativamente diferente en las dos preparaciones ( $B_{max} = 139 \pm 6$  pmol unidos/mg proteína para las fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basolaterales, y  $B_{max} = 16 \pm 1$  pmol unidos/mg proteína para las fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas apicales) (Tabla 10).

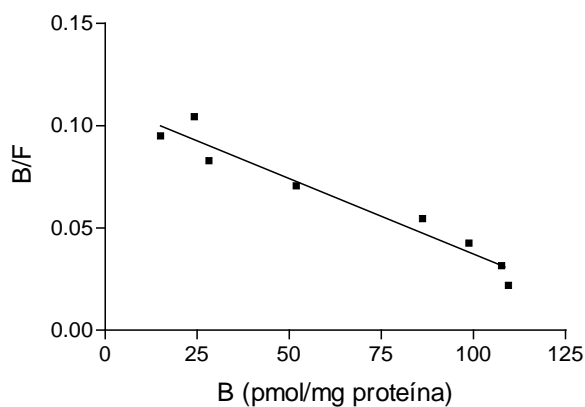
Debido a la gran diferencia existente respecto a la densidad de los sitios de unión de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S entre las dos fracciones de membrana plasmática, investigamos sólo la abundante unión del radioligando a la fracción de membrana plasmática basolateral de las células parietales de conejo.



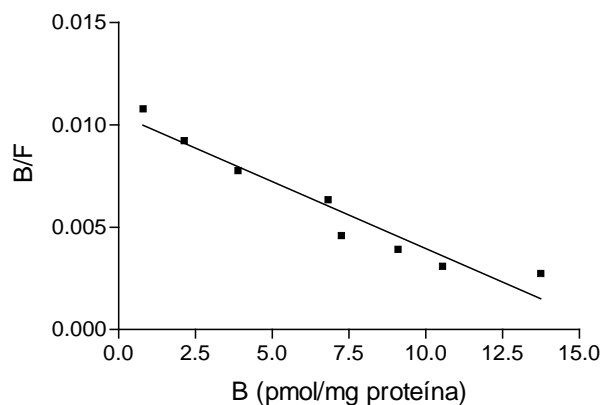
**Figura 28.** Gráfica de saturación de la unión en el equilibrio de [<sup>35</sup>S]dATP<sub>α</sub>S a las fracciones enriquecidas en membrana plasmática basolateral de las células parietales de la mucosa gástrica de conejo. Las membranas (5 μg) se incubaron a temperatura ambiente con concentraciones crecientes de [<sup>35</sup>S]dATP<sub>α</sub>S (1-100 nM). La unión específica se determinó restando la unión no específica (definida en presencia de ATP 100 μM) de la unión total. Los datos muestran la media ± SEM de al menos tres experimentos llevados a cabo por triplicado en cada caso.



**Fig. 4.12.** Gráfica de saturación de la unión en el equilibrio de [<sup>35</sup>S]dATP<sub>α</sub>S a las fracciones enriquecidas en membrana plasmática apical de las células parietales de la mucosa gástrica de conejo. Las membranas (5 μg) se incubaron a temperatura ambiente con concentraciones crecientes de [<sup>35</sup>S]dATP<sub>α</sub>S (1-100 nM). La unión específica se determinó restando la unión no específica (definida en presencia de ATP 100 μM) de la unión total. Los datos muestran la media ± SEM de al menos tres experimentos llevados a cabo por triplicado en cada caso.



**Fig. 4.13.** Gráfica Scatchard de la unión en el equilibrio de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  a las fracciones enriquecidas en membrana plasmática basolateral de las células parietales de la mucosa gástrica de conejo.



**Figura 31.** Gráfica Scatchard de la unión en el equilibrio de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  a las fracciones enriquecidas en membrana plasmática apical de las células parietales de la mucosa gástrica de conejo.

**Tabla 10.** Parámetros  $K_d$  y  $B_{\text{max}}$  de la unión de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  a las fracciones enriquecidas en membrana plasmática basolateral y membrana plasmática apical de las células parietales de la mucosa gástrica de conejo.

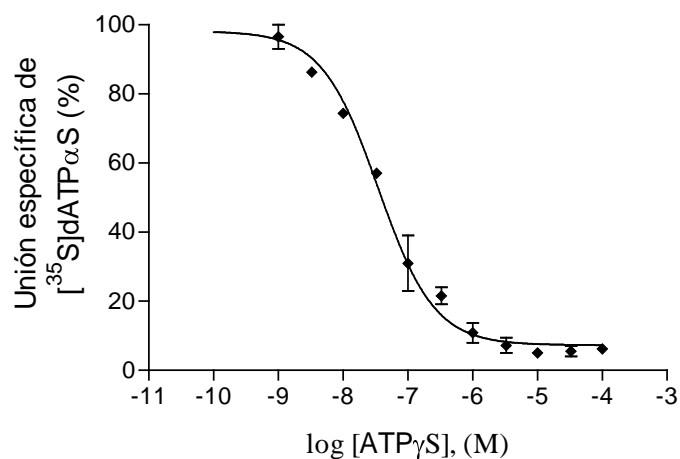
	$K_d$ (nM)	$B_{\text{max}}$ (pmol /mg proteína)
Membrana basolateral	$20 \pm 2$	$139 \pm 6$
Membrana apical	$28 \pm 5$	$16 \pm 1$

#### 4.2.3. Desplazamiento por diversos ligandos de los receptores P2 de la unión de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S a las fracciones enriquecidas en membrana plasmática basolateral

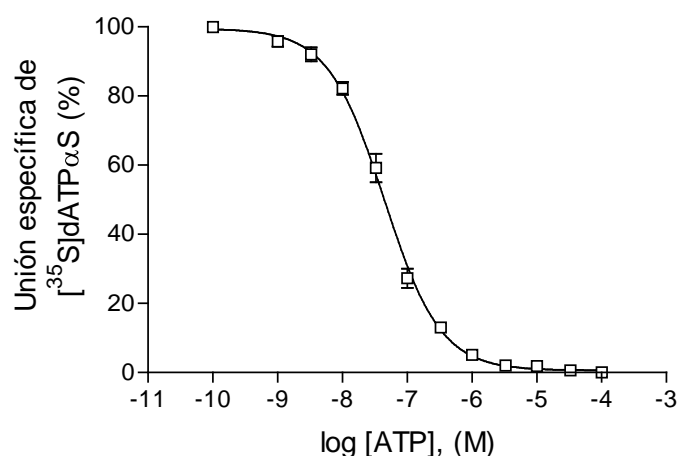
En los experimentos de competición alícuotas de las fracciones enriquecidas en membrana plasmática basolateral (5  $\mu$ g de proteína) se incubaron a temperatura ambiente, durante 1 h, con el [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S (10 nM) en presencia de concentraciones desde 1 nM hasta 100  $\mu$ M de diferentes agonistas (ATP, dATP, 2-MeSATP,  $\beta,\gamma$ -meATP, UTP, ADP $\beta$ S, ATP $\gamma$ S, 2-MeSADP) y antagonistas (suramina, RB-2, PPADS, A2P5PS) de los receptores P2. La unión no específica se definió en presencia de ATP 100  $\mu$ M.

Las curvas de desplazamiento obtenidas se muestran en las Figuras 32-44 y representan el modelo que se corresponde con el mejor ajuste de los datos, que resultó ser el de unión a un centro y no a dos centros, según el modelo de unión a uno o dos sitios. En la Tabla 11 se representan los valores IC<sub>50</sub> de estos experimentos, calculados mediante el método de regresión no lineal (GraphPad, Prism). Todos los valores son expresados como la media  $\pm$  SEM de al menos tres determinaciones independientes llevadas a cabo por triplicado.

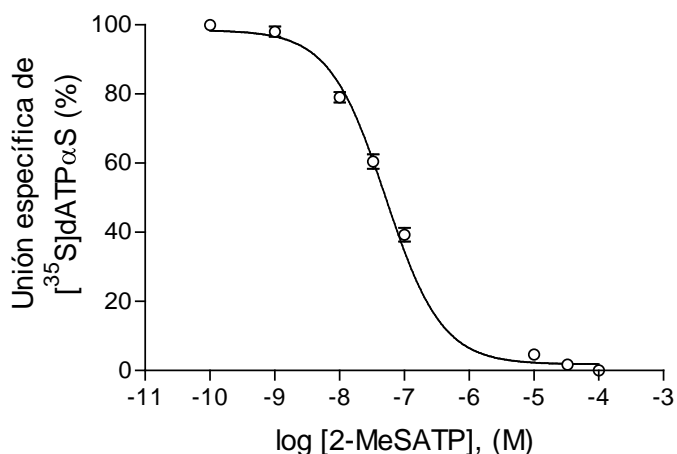
Los agonistas ATP $\gamma$ S, ATP, 2-MeSATP, dATP y 2-MeSADP competían todos con alta afinidad y valores de IC<sub>50</sub> comprendidos en el rango 34-68 nM por la unión específica de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S a las fracciones enriquecidas en membrana plasmática basolateral de las células parietales gástricas. El ADP $\beta$ S y el UTP mostraron mucha menor afinidad, con valores IC<sub>50</sub> de 1,45 y 5,19  $\mu$ M respectivamente. Por otra parte, el  $\beta,\gamma$ -meATP lograba desplazar solamente alrededor del 50% de la unión específica del radioligando a la máxima concentración utilizada (100  $\mu$ M), por lo que su valor IC<sub>50</sub> no podía ser estimado. Entre los antagonistas de receptores P2 ensayados, la suramina y el RB-2 mostraron valores IC<sub>50</sub> de 1,50 y 0,54  $\mu$ M respectivamente; PPADS y A2P5PS no conseguían competir con el [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S unido. El orden de potencia establecido, según los valores IC<sub>50</sub>, para los agonistas purinérgicos testados en los estudios de competición fue: ATP $\gamma$ S  $\geq$  ATP  $\geq$  2-MeSATP  $\geq$  dATP  $\geq$  2-MeSADP  $\gg$  ADP $\beta$ S  $>$  UTP  $\gg$   $\beta,\gamma$ -meATP.



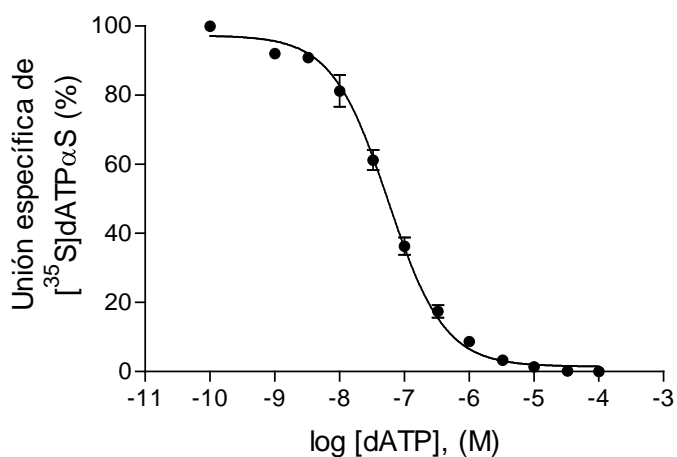
**Figura 32.** Desplazamiento por  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  ( $\blacklozenge$ ) de la unión específica de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  a fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basolaterales de células parietales de mucosa gástrica de conejo. Diferentes concentraciones de  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  (1 nM a 100  $\mu\text{M}$ ) fueron añadidas con el  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  (10 nM) e incubadas con la fracción de membrana (5  $\mu\text{g}$  de proteína) durante 1h a temperatura ambiente. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos por triplicado y normalizado a la unión máxima de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  en cada experimento. El valor  $\text{IC}_{50}$  calculado se muestra en la Tabla 11.



**Figura 33.** Desplazamiento por  $\text{ATP}$  ( $\square$ ) de la unión específica de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  a fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basolaterales de células parietales de mucosa gástrica de conejo. Diferentes concentraciones de  $\text{ATP}$  (1 nM a 100  $\mu\text{M}$ ) fueron añadidas con el  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  (10 nM) e incubadas con la fracción de membrana (5  $\mu\text{g}$  de proteína) durante 1h a temperatura ambiente. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos por triplicado y normalizado a la unión máxima de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  en cada experimento. El valor  $\text{IC}_{50}$  calculado se muestra en la Tabla 11.

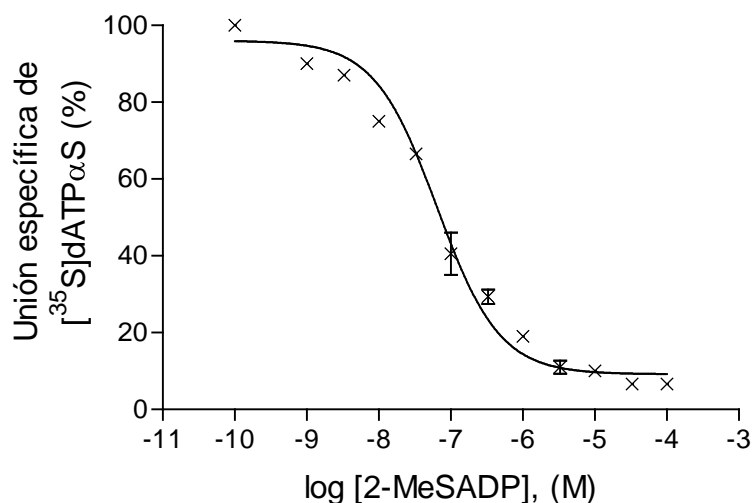


**Figura 34.** Desplazamiento por 2-MeSATP (○) de la unión específica de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  a fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basolaterales de células parietales de mucosa gástrica de conejo. Diferentes concentraciones de 2-MeSATP (1 nM a 100  $\mu\text{M}$ ) fueron añadidas con el  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  (10 nM) e incubadas con la fracción de membrana (5  $\mu\text{g}$  de proteína) durante 1h a temperatura ambiente. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos por triplicado y normalizado a la unión máxima de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  en cada experimento. El valor  $\text{IC}_{50}$  calculado se muestra en la Tabla 11.

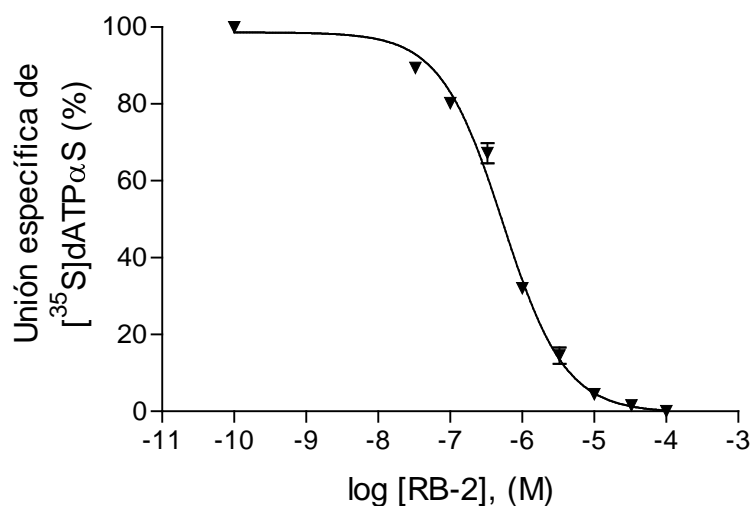


**Figura 35.** Desplazamiento por dATP (●) de la unión específica de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  a fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basolaterales de células parietales de mucosa gástrica de conejo. Diferentes concentraciones de dATP (1 nM a 100  $\mu\text{M}$ ) fueron añadidas con el  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  (10 nM) e incubadas con la fracción de membrana (5  $\mu\text{g}$  de proteína) durante 1h a temperatura ambiente. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos por triplicado y normalizado a la unión máxima de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  en cada experimento. El valor  $\text{IC}_{50}$  calculado se muestra en la Tabla 11.

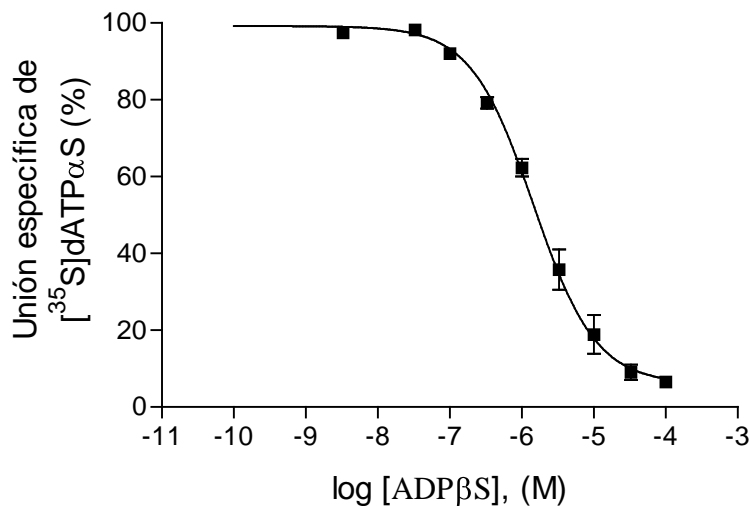




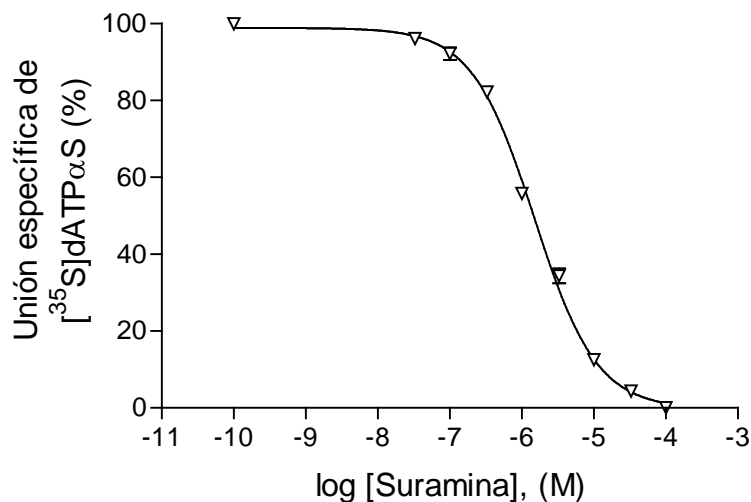
**Figura 36.** Desplazamiento por 2-MeSADP (×) de la unión específica de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  a fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basolaterales de células parietales de mucosa gástrica de conejo. Diferentes concentraciones de 2-MeSADP (1 nM a 100  $\mu\text{M}$ ) fueron añadidas con el  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  (10 nM) e incubadas con la fracción de membrana (5  $\mu\text{g}$  de proteína) durante 1h a temperatura ambiente. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos por triplicado y normalizado a la unión máxima de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  en cada experimento. El valor  $\text{IC}_{50}$  calculado se muestra en la Tabla 11.



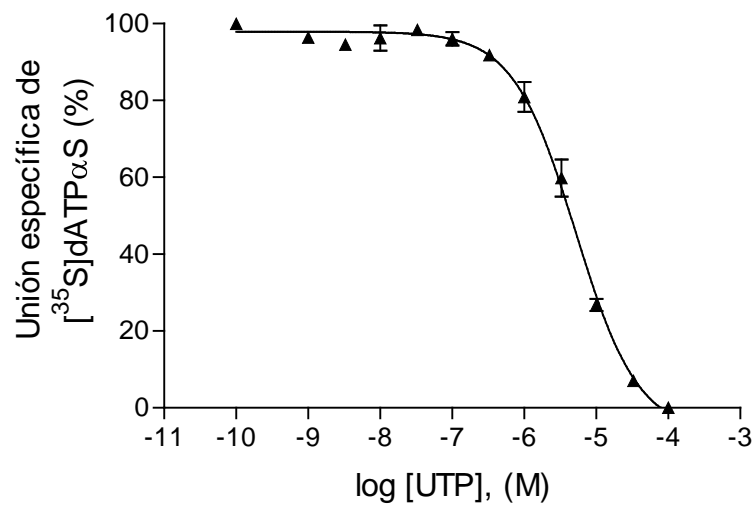
**Figura 37.** Desplazamiento por RB-2 (▼) de la unión específica de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  a fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basolaterales de células parietales de mucosa gástrica de conejo. Diferentes concentraciones de RB-2 (1 nM a 100  $\mu\text{M}$ ) fueron añadidas con el  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  (10 nM) e incubadas con la fracción de membrana (5  $\mu\text{g}$  de proteína) durante 1h a temperatura ambiente. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos por triplicado y normalizado a la unión máxima de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  en cada experimento. El valor  $\text{IC}_{50}$  calculado se muestra en la tabla 11.



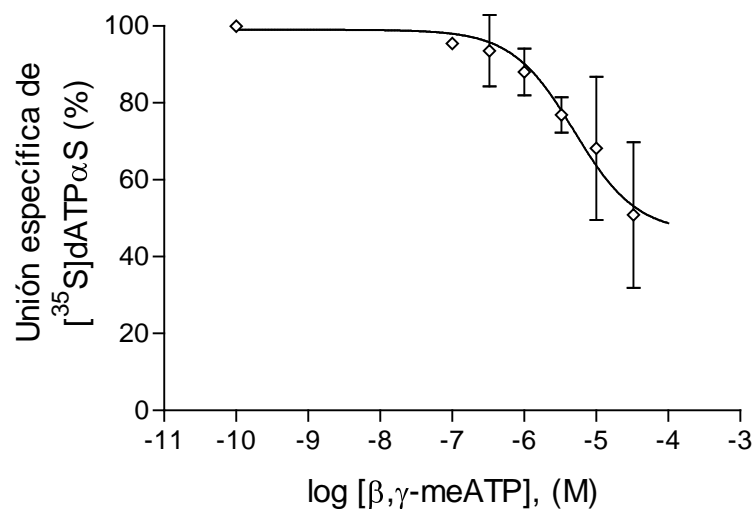
**Figura 38.** Desplazamiento por ADPβS (■) de la unión específica de [<sup>35</sup>S]dATPαS a fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basolaterales de células parietales de mucosa gástrica de conejo. Diferentes concentraciones de ADPβS (1 nM a 100 μM) fueron añadidas con el [<sup>35</sup>S]dATPαS (10 nM) e incubadas con la fracción de membrana (5 μg de proteína) durante 1h a temperatura ambiente. Los datos mostrados son la media ± SEM de al menos tres experimentos por triplicado y normalizado a la unión máxima de [<sup>35</sup>S]dATPαS en cada experimento. El valor IC<sub>50</sub> calculado se muestra en la Tabla 11.



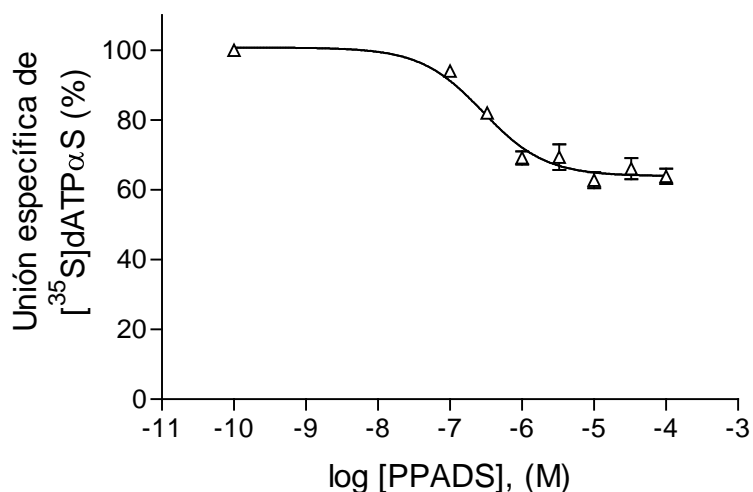
**Figura 39.** Desplazamiento por suramina (▽) de la unión específica de [<sup>35</sup>S]dATPαS a fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basolaterales de células parietales de mucosa gástrica de conejo. Diferentes concentraciones de suramina (1 nM a 100 μM) fueron añadidas con el [<sup>35</sup>S]dATPαS (10 nM) e incubadas con la fracción de membrana (5 μg de proteína) durante 1h a temperatura ambiente. Los datos mostrados son la media ± SEM de al menos tres experimentos por triplicado y normalizado a la unión máxima de [<sup>35</sup>S]dATPαS en cada experimento. El valor IC<sub>50</sub> calculado se muestra en la Tabla 11.



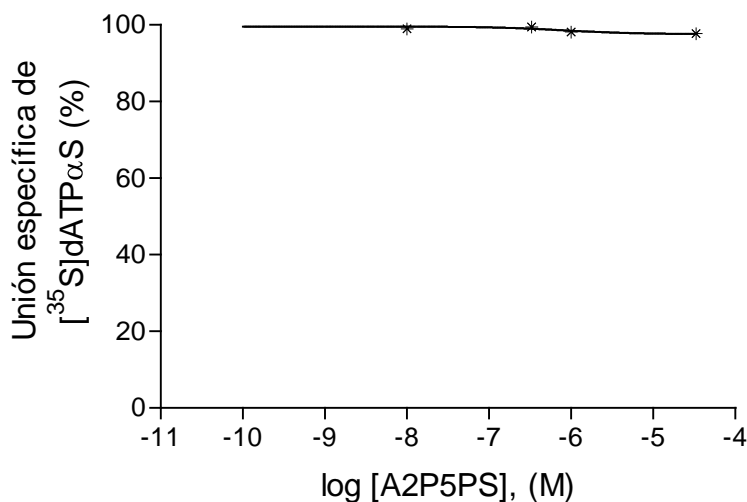
**Figura 40.** Desplazamiento por UTP ( $\blacktriangle$ ) de la unión específica de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  a fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basolaterales de células parietales de mucosa gástrica de conejo. Diferentes concentraciones de UTP (1 nM a 100  $\mu\text{M}$ ) fueron añadidas con el  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  (10 nM) e incubadas con la fracción de membrana (5  $\mu\text{g}$  de proteína) durante 1h a temperatura ambiente. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos por triplicado y normalizado a la unión máxima de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  en cada experimento. El valor  $\text{IC}_{50}$  calculado se muestra en la Tabla 11.



**Figura 41.** Desplazamiento por  $\beta,\gamma\text{-meATP}$  ( $\diamond$ ) de la unión específica de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  a fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basolaterales de células parietales de mucosa gástrica de conejo. Diferentes concentraciones de  $\beta,\gamma\text{-meATP}$  (1 nM a 100  $\mu\text{M}$ ) fueron añadidas con el  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  (10 nM) e incubadas con la fracción de membrana (5  $\mu\text{g}$  de proteína) durante 1h a temperatura ambiente. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos por triplicado y normalizado a la unión máxima de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  en cada experimento. El valor  $\text{IC}_{50}$  no pudo ser calculado como se muestra en la Tabla 11.



**Figura 42.** Desplazamiento por PPADS ( $\Delta$ ) de la unión específica de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  a fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basolaterales de células parietales de mucosa gástrica de conejo. Diferentes concentraciones de PPADS (1 nM a 100  $\mu\text{M}$ ) fueron añadidas con el  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  (10 nM) e incubadas con la fracción de membrana (5  $\mu\text{g}$  de proteína) durante 1h a temperatura ambiente. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos por triplicado y normalizado a la unión máxima de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  en cada experimento. El valor  $\text{IC}_{50}$  no pudo ser calculado como se muestra en la Tabla 11.

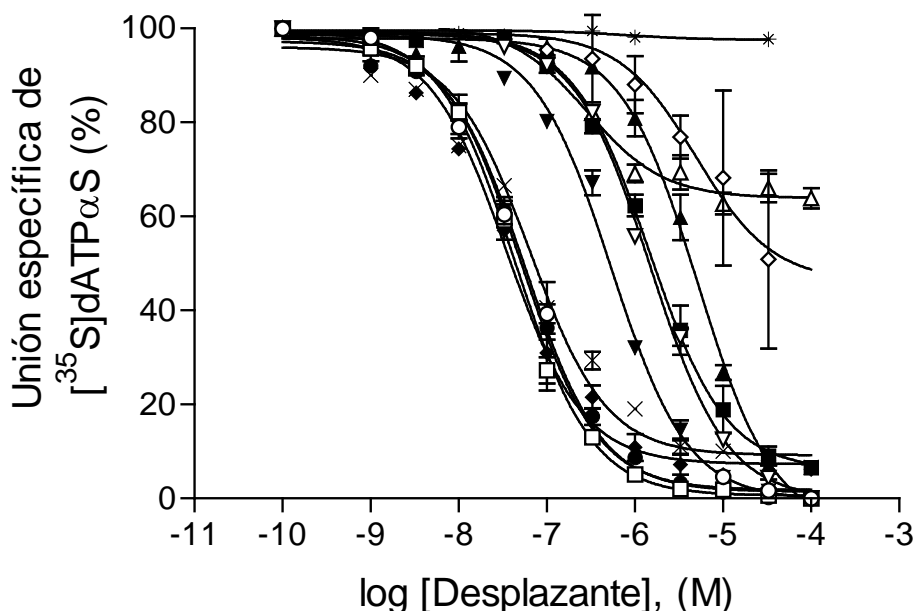


**Figura 43.** Desplazamiento por A2P5PS (\*) de la unión específica de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  a fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basolaterales de células parietales de mucosa gástrica de conejo. Diferentes concentraciones de A2P5PS (1 nM a 100  $\mu\text{M}$ ) fueron añadidas con el  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  (10 nM) e incubadas con la fracción de membrana (5  $\mu\text{g}$  de proteína) durante 1h a temperatura ambiente. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos por triplicado y normalizado a la unión máxima de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  en cada experimento. El valor  $\text{IC}_{50}$  no pudo ser calculado como se muestra en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Potencia de los ligandos purinoceptores en la competición por la unión de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S 10 nM a las fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basolaterales de células parietales de conejo. El IC<sub>50</sub> para cada ligando se calculó a partir de los datos de competición. Todos los valores son expresados como la media  $\pm$  SEM de al menos tres determinaciones independientes.

Ligando	IC <sub>50</sub> (nM)
ATP $\gamma$ S	35 $\pm$ 5
ATP	44 $\pm$ 3
2-MeSATP	51 $\pm$ 4
dATP	56 $\pm$ 4
2-MeSADP	64 $\pm$ 8
RB-2	537 $\pm$ 36
ADP $\beta$ S	1453 $\pm$ 155
Suramina	1499 $\pm$ 90
UTP	5197 $\pm$ 473
$\beta,\gamma$ -meATP	*
PPADS	*
A2P5PS	*

\* No pudo ser calculado



**Figura 44.** Gráfica conjunta de la competición de los ligandos purinérgicos por la unión específica de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  a fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basolaterales de células parietales de mucosa gástrica de conejo. Los símbolos utilizados en esta gráfica conjunta se corresponden con los utilizados para cada ligando en las gráficas individuales.

#### 4.2.4. Sensibilidad a los nucleótidos de guanina

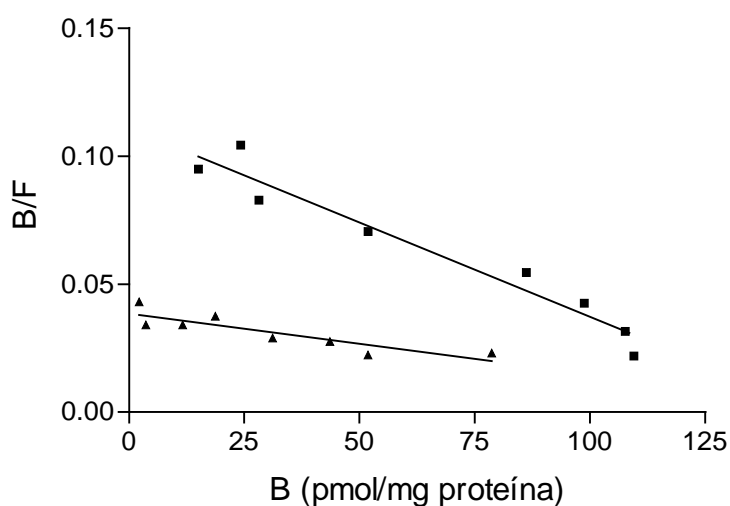
Como la señal de transducción de los receptores P2 metabotrópicos (P2Y) es mediada por proteínas G analizamos si la unión de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  a las fracciones enriquecidas en membrana plasmática basolateral era afectada por la presencia de GDP en el medio de incubación. El GDP inhibe el mecanismo de acción de las proteínas G (13, 91). Para ello, se incubaron las membranas con concentraciones crecientes del radioligando de forma similar a los experimentos de saturación, añadiendo al medio de incubación GDP  $10\ \mu\text{M}$ , y se determinaron la  $K_d$  y la  $B_{\text{max}}$ .

La presencia de GDP  $10\ \mu\text{M}$  en el medio de incubación mostró también una unión de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  saturable, pero mientras la  $K_d$  ( $111 \pm 37\ \text{nM}$ ) aumentó en gran medida, la  $B_{\text{max}}$  ( $182 \pm 46\ \text{pmol/mg proteína}$ ) no fue significativamente diferente (Tabla 12). Aunque los parámetros de la unión se calcularon mediante un análisis de regresión no lineal, en la Figura 45 pueden

observarse los mismos resultados basados en la correspondiente transformada de Scatchard.

**Tabla 12.** Parámetros  $K_d$  y  $B_{max}$  de la unión de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  a las fracciones enriquecidas en membrana plasmática basolateral en ausencia y presencia de GDP  $10\ \mu\text{M}$ .

	$K_d$ (nM)	$B_{max}$ (pmol/mg proteína)
Sin GDP	$20 \pm 2$	$139 \pm 6$
Con GDP	$111 \pm 37$	$182 \pm 46$



**Figura 45.** Inhibición por GDP de la unión de  $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$  a las membranas plasmáticas basolaterales. Representación de Scatchard de los estudios de unión en ausencia (■) y presencia (▲) de GDP  $10\ \mu\text{M}$ . El GDP cambia la  $K_d$  mientras que la  $B_{max}$  no era afectada significativamente. Todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado y repetidos al menos tres veces.





## **5. DISCUSIÓN**



Desde 1971 se ha venido suministrando datos a favor de la participación de las purinas en la regulación de la secreción gástrica de ácido. Los resultados derivados de la experimentación que utilizaba preparaciones de glándulas gástricas aisladas de conejo (4, 53-55), mostraron que era posible considerar la división de los compuestos de adenina en dos grupos, uno encabezado por la adenosina que promueve la estimulación de la secreción gástrica de ácido y otro encabezado por el ATP que promueve su inhibición.

Al estudiar las características del efecto inhibitor producido por el ATP y sus derivados, fisiológicos y sintéticos, sobre la secreción de ácido en glándulas gástricas estimuladas con histamina los datos obtenidos sugerían que, en esta preparación, la acción antsecretora del citado nucleótido y/o sus derivados podía tener lugar a través de receptores P2Y vinculados, en parte, con la síntesis de prostaglandinas (4, 53-55). En este sentido, la caracterización de receptores P2Y-like mediante estudios de unión con radioligandos en preparaciones de membrana plasmática obtenidas a partir de glándulas gástricas de conejo (144) supuso un apoyo experimental importante a favor de esta conclusión.

No obstante, no cabía ignorar que las glándulas gástricas están constituidas por diversos tipos de células además de las células parietales que secretan el ácido. Así, estaba abierta la posibilidad de que el efecto de inhibición de la secreción observado con ATP sobre la secreción glandular de ácido fuese mediada indirectamente a través de algún modulador paracrino producto de la acción del nucleótido sobre células no parietales presentes en la preparación glandular. Por ello se llevaron a cabo estudios con preparaciones de células parietales aisladas de mucosa gástrica de conejo y se pudo concluir que el ATP inhibía de manera intensa y selectiva la secreción de ácido estimulada por histamina y se sugería que al menos una parte de dicho efecto tenía que ver con la estimulación de la producción endógena de prostaglandinas. Se corroboraba así el comportamiento inhibitor observado previamente para ATP en otras preparaciones gástricas estimuladas con histamina. Así mismo, se sugería que esta acción antsecretora del ATP se debía a receptores P2Y que podrían estar presentes en la membrana plasmática de las células parietales de la mucosa gástrica de conejo (56).

Con el fin, por un lado, de confirmar la presencia de receptores P2Y en la membrana plasmática de las células parietales gástricas y, por otro, de estudiar el perfil cinético y la densidad de estos receptores, consideramos proceder a la identificación y caracterización de receptores P2Y en preparaciones de membrana plasmática de células parietales de mucosa gástrica de conejo mediante estudios de unión con radioligandos específicos.

Los experimentos de unión con ligandos radiactivos se han convertido en los últimos años en una herramienta relativamente simple pero extremadamente poderosa para el estudio de los receptores. Tales estudios proporcionan un análisis de la interacción de las hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento y drogas similares con los receptores, de éstos con los sistemas de segundos mensajeros, e información sobre el número de receptores presentes en un tejido, su distribución subcelular y función fisiológica (23, 92).

Aunque los ensayos de unión con radioligandos pueden ser realizados utilizando preparaciones de células enteras, la preparación de membranas aisladas es por mucho la más comúnmente utilizada en este tipo de estudios. En general, los ensayos con células intactas se prefieren para los estudios relacionados con la función fisiológica de los receptores y los ensayos con las membranas aisladas para los estudios relacionados con las características bioquímicas y farmacológicas de los receptores (23). En consonancia con ello, elegimos realizar nuestros ensayos utilizando preparaciones de membranas plasmáticas aisladas, puesto que era el modelo más conveniente para los estudios que pretendíamos llevar a cabo en el presente trabajo.

Ahora bien, la célula parietal de la mucosa gástrica es una célula polarizada y, como tal, su membrana plasmática presenta dos dominios perfectamente diferenciados, uno apical (luminal) y otro basolateral (contraluminal). Ambas fracciones de la membrana, tal y como se ha mencionado en otros apartados de este trabajo, difieren en su ultraestructura (61, 102), actividades enzimáticas (64), mecanismos de transporte (64), propiedades electrofisiológicas (34), composición de proteínas (24, 58) y composición lipídica (87).

Como cualquier proteína de membrana en un epitelio polarizado los receptores P2 pueden estar localizados selectivamente o en la superficie apical o en la basolateral o estar expresado en ambos dominios de la membrana celular (20, 37, 38, 80).

En este sentido Luo *et al.* (88) han publicado que las células epiteliales ductales del páncreas expresan tres subtipos de receptor P2Y (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub>). Los receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub> estarían selectivamente localizados en la membrana apical, mientras que los receptores P2Y<sub>1</sub> pueden ser detectados tanto en la superficie apical como en la basolateral. Estas células también expresaron tres subtipos de receptor P2X (P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>7</sub>), los cuales mostraron también una localización asimétrica; los receptores P2X<sub>1</sub> y P2X<sub>4</sub> estaban presentes exclusivamente en las membranas plasmáticas basolaterales, mientras que el receptor P2X<sub>7</sub> se detectaba en ambas superficies celulares.

De igual forma, en otros estudios se ha sugerido que las células del epitelio respiratorio expresan receptores P2Y<sub>2</sub> en la membrana apical y receptores P2Y<sub>3</sub> en la membrana basolateral (66). También se ha publicado que las células epiteliales nasales expresan receptores P2Y<sub>2</sub> en la membrana basolateral y receptores P2Y<sub>6</sub> en la membrana apical (78). Y otros autores han encontrado receptores P2Y<sub>1</sub> y/o P2Y<sub>2</sub> en la membrana basolateral y P2z (P2X<sub>7</sub>) en la membrana apical de las células ductales de las glándulas salivares submandibulares (7, 79, 153).

Precisamente por ello, en el presente trabajo se procedió previamente al desarrollo de un procedimiento para aislar y separar las fracciones apical y basolateral de la membrana plasmática de las células parietales de la mucosa gástrica de conejo partiendo de una preparación enriquecida en dichas células.

A este respecto, Muallem *et al.* habían publicado en 1985 (95) un procedimiento bastante sencillo para el aislamiento y separación simultánea de los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática de las células parietales, partiendo para ello de una preparación de células parietales aisladas de mucosa gástrica de conejo enriquecidas en un 75-90%. Utilizaron un método de preparación en el que la suspensión de células parietales

homogenizada en un homogenizador Polytron se centrifugaba primeramente a baja velocidad y el sobrenadante resultante se sometía posteriormente a un proceso de centrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa (25-32-42%). En la interfase de sacarosa 25-32% aislaban la fracción apical de la membrana plasmática y en la interfase 32-42% la fracción basolateral.

En el presente trabajo nos basamos esencialmente en este modelo descrito por Muallem y col. Sin embargo, lo fuimos adaptando progresivamente según los resultados que se derivaban de nuestra experimentación hasta adoptar finalmente el modelo que se ha descrito detalladamente en el apartado de Materiales y Métodos.

Para analizar el enriquecimiento en fracciones apical y basolateral de la membrana plasmática se ensayaron conocidos enzimas marcadores.

La 5'-nucleotidasa es por mucho el enzima más comúnmente utilizado como marcador de membrana plasmática (41). Diversos autores han realizado determinaciones de este enzima para caracterizar membranas plasmáticas preparadas a partir de un homogenado de estómago de rata (84), mucosa gástrica de perro (119, 121) y células parietales aisladas de cobaya (10).

Es conocida la ubicación de la  $H^+,K^+$ -ATPasa en la fracción apical de la membrana plasmática de las células parietales de la mucosa gástrica. Como se ha señalado anteriormente en otros apartados de esta memoria, por medio de técnicas de inmunolocalización Saccomani *et al.* (120) demostraron la presencia del enzima transportador de hidrogeniones  $H^+,K^+$ -ATPasa en las microvellosidades de la membrana plasmática apical y canalicular de las células oxínticas. Se trata de una bomba electroneutra que intercambia  $K^+$  luminal por  $H^+$  citoplásmico, y es el principal enzima responsable de la acidificación de la luz gástrica (85, 123).

La  $Na^+,K^+$ -ATPasa o bomba de sodio, al igual que la  $H^+,K^+$ -ATPasa, es un transportador de iones activo de membrana que pertenece a la familia de ATPasas tipo P. Está presente en la membrana basolateral de la célula oxíntica (32, 64, 139), donde cataliza el cotransporte de  $Na^+$  y  $K^+$ . Se trata de una bomba electrogénica, que transporta hacia el exterior de la célula tres iones de

sodio, al tiempo que introduce dos iones potasio dentro de la misma. Es uno de los principales transportadores basolaterales responsable del mantenimiento de la homeostasis de la célula parietal (apdo. 1.2.2).

Para estudiar la contaminación de las fracciones de membrana plasmática por retículo endoplásmico se ha ensayado la actividad glucosa-6-fosfatasa, conocido marcador de esta fracción subcelular (41).

El análisis enzimático demostraba que en la interfase de sacarosa S-40% se conseguía separar la fracción enriquecida en membrana plasmática apical, puesto que el enzima  $H^+,K^+$ -ATPasa estaba purificado en esta fracción aproximadamente 3,42 veces respecto al homogenado. Además, esta fracción estaba esencialmente libre de contaminación por membrana plasmática basolateral, ya que no se observaba enriquecimiento del enzima  $Na^+,K^+$ -ATPasa. El enzima marcador de membrana plasmática 5'-nucleotidasa sólo se enriquecía en esta fracción.

En la interfase de sacarosa 40-47% se separaba la fracción enriquecida en membrana plasmática basolateral, ya que el enzima  $Na^+,K^+$ -ATPasa se purificaba en esta fracción alrededor de 3,06 veces respecto al homogenado. No obstante, en esta fracción existía una apreciable contaminación por membrana plasmática apical, ya que había un cierto enriquecimiento del enzima  $H^+,K^+$ -ATPasa; este hallazgo por otra parte no constituía un hecho inesperado, ya que cierto grado de contaminación cruzada entre las dos fracciones de membrana plasmática había sido descrito también por otros autores tanto en aislamientos procedentes de células gástricas como de otros tipos celulares (32, 67, 76, 95, 141).

No se advirtió incremento de la actividad específica del enzima glucosa-6-fosfatasa en ninguna de las fracciones obtenidas a partir del procesamiento del homogenado celular. De lo que se dedujo que las fracciones de membrana plasmática obtenidas podían considerarse no contaminadas por retículo endoplásmico.

Puesto que los enzimas marcadores ensayados mostraron un enriquecimiento apropiado en sus respectivos dominios de membrana,

consideramos que mediante la técnica de aislamiento desarrollada por nosotros conseguíamos una adecuada separación y purificación de las fracciones apical y basolateral de la membrana plasmática de las células parietales y que, por lo tanto, las preparaciones así obtenidas eran suficientemente idóneas para los estudios posteriores.

Una vez logrado el objetivo de separar y purificar las fracciones apical y basolateral de la membrana plasmática de las células parietales procedimos a llevar a cabo los experimentos necesarios para establecer la posible presencia de receptores P2Y en estas preparaciones mediante el estudio de la unión del radioligando [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S, ligando que había sido considerado por diversos investigadores un instrumento útil para caracterizar receptores P2Y-like (ó receptores P<sub>2Y</sub> nativos) en diferentes tejidos (126, 135, 136, 144).

En el intervalo de concentración de 1 a 100 nM, la unión específica de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S a las fracciones de membrana plasmática apical y basolateral de las células parietales de conejo era saturable. Los datos en ambos casos se ajustaron mejor a un único sitio de unión de alta afinidad. El valor de la K<sub>d</sub> era similar para ambas fracciones de membrana plasmática (K<sub>d</sub>  $\approx$  20 nM para las fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basolaterales, y K<sub>d</sub>  $\approx$  28 nM para las fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas apicales). La densidad de los sitios de unión fue, sin embargo, significativamente diferente (B<sub>max</sub>  $\approx$  139 pmol/mg proteína para las fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basolaterales, y B<sub>max</sub>  $\approx$  16 pmol/mg proteína para las fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas apicales). De ello podríamos deducir que existiría un mismo subtipo de receptor P2 que se distribuye asimétricamente en la membrana plasmática de la célula parietal, lo cual, por otra parte, estaría de acuerdo con lo descrito para los receptores P2 en otros tejidos (37, 38, 80, 88).

El parámetro B<sub>max</sub> obtenido para el sitio de unión de alta afinidad en la fracción de membrana plasmática basolateral es extraordinariamente alto puesto que es incluso superior a valores que se han publicado para otros tejidos, donde se refieren cifras B<sub>max</sub> de 17-71 pmol/mg proteína, cantidades que se consideran ya muy altas (72, 125, 135, 144). No obstante, si consideráramos la preparación de membrana plasmática completa (es decir,



fracción apical más fracción basolateral) calcularíamos para la muestra una densidad de sitios de unión específica aproximada de 88 pmol/mg proteína. Este número máximo de sitios de unión es cercano a los valores previamente publicados para otros tejidos y, además, estaría correlacionado con el determinado para membranas plasmáticas aisladas a partir de glándulas gástricas (144), donde en los estudios de unión con el radioligando [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S se había descrito una B<sub>max</sub> de 17 pmol/mg de proteína. Según estos datos, el valor de B<sub>max</sub> calculado para membranas plasmáticas aisladas a partir de una preparación enriquecida en células parietales sería unas 5 veces superior al de B<sub>max</sub> obtenida en preparaciones de membranas plasmáticas aisladas a partir de glándulas gástricas. Y esa cifra es la que aproximadamente cabría esperar si tenemos en cuenta que la riqueza en células parietales de la preparación a partir de la cual aislamos las fracciones apical y basolateral de la membrana plasmática es de alrededor de un 70%, es decir, casi 5 veces el contenido en células parietales presentes en las glándulas gástricas (donde las células parietales representan cerca del 13% del total de las células).

No obstante, el valor tan alto de B<sub>max</sub> obtenido nos induce a sospechar que es bastante probable que sitios de unión no-receptor estén también contribuyendo al número máximo de sitios de unión de alta afinidad encontrados, a pesar de que los datos no ofrecen una buena correlación para los modelos de unión a dos centros de unión.

En este sentido, no debemos olvidar que la utilidad de los ensayos de unión con radioligandos para cuantificar receptores P2Y es motivo de controversia. Una prueba de este desacuerdo lo constituyen los ensayos de unión con el radioligando [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S que condujeron a la identificación errónea de receptores p2y<sub>5</sub> y p2y<sub>7</sub> como receptores P2Y (6, 150). De forma similar, Schachter y Harden (125) han publicado que el [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S no se puede considerar un radioligando válido para los estudios de caracterización de los receptores P2. Estos autores mostraron que el [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S se unía con una relativamente alta densidad (10 pmol/mg proteína) de sitios de unión a membranas de células 1321N1 y de células Cos-7 que expresan el receptor P2Y<sub>1</sub>. Sin embargo, no observaron diferencia alguna en la densidad total de sitios de unión entre las células nativas (que no expresan el receptor P2Y<sub>1</sub>), las células transfectadas solamente con el vector y las células transfectadas

para expresar el receptor P2Y<sub>1</sub>. Además, encontraron que los análogos de los nucleótidos de adenina competían por la unión de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S con un orden de potencia que difería marcadamente con el orden mostrado para la acumulación de inosítoles fosfato en células transfectadas que expresan el receptor P2Y<sub>1</sub>. Por éstos y otros hallazgos han llegado a sugerir que las membranas celulares muestran un gran número de sitios de unión de alta afinidad para [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S distintos de los subtipos de receptor P2Y. Estos sitios de unión no-receptor interfieren a la hora de calcular los parámetros de la unión de este radioligando con el receptor P2Y en el equilibrio (125).

Debido a ello se ha propuesto la utilización de un nuevo radioligando, el [<sup>3</sup>H]MRS2279, un antagonista altamente selectivo para el subtipo de receptor P2Y<sub>1</sub> y que no muestra unión a membranas celulares que carecen del receptor (148). Sin embargo, este ensayo tiene que ser llevado a cabo en un baño con hielo, y entonces la velocidad de disociación del complejo radioligando-receptor es relativamente rápida (vida media aproximada de 0,9 min). Por lo que durante las etapas de dilución, filtración y lavado no puede ser utilizado la aplicación de un medio con hielo para evitar la pérdida del radioligando unido específicamente, lo que puede conducir a una infravaloración en el cálculo de la densidad de los receptores (107). A diferencia del [<sup>3</sup>H]MRS2279, la vida media de la velocidad de disociación para el [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S es aproximadamente de 3 min a temperatura ambiente y la aplicación de un medio tampón con hielo puede parar efectivamente el proceso y convertir en insignificante la pérdida del radioligando unido específicamente al receptor durante la fase de filtración (107).

Oras *et al.* (106, 107) indican que, como ligando específico para el subtipo P2Y<sub>1</sub> así como para otros receptores P2Y, el [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S puede realmente ser útil para los estudios de estos receptores con radioligandos si el estudio se combina con un análisis cinético adecuado. Mediante este análisis consiguen diferenciar los sitios de unión "lentos" de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S (de origen receptor) de los sitios de unión "rápidos" (de origen no receptor) localizados sobre membranas de células de astrocitoma transfectadas que expresan receptores P2Y<sub>1</sub> (hP2Y1-1321N1) y en membranas de cerebro de rata. El comportamiento de los sitios "lentos" podría representarse mediante un mecanismo de unión del radioligando en dos etapas, donde la formación rápida

del complejo ligando-receptor era seguida por la lenta isomerización de este complejo. Existían evidencias de que este último fenómeno era característico de receptores muscarínicos (70), dopaminérgicos D2 (83) y adrenérgicos (127), todos ellos pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteínas G.

Entre las principales proteínas de unión para el ATP que contienen las fracciones de membrana plasmática de la célula parietal gástrica a las que pudiera estar uniéndose también el [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S se encuentran sobre todo las ATPasas tipo P como la H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa y la Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa. Sin embargo, para la unión con alta afinidad (valor de K<sub>d</sub> de orden nM) del ATP u otros nucleótidos a estos y otros ectoenzimas requiere de la presencia de los cationes divalentes Mg<sup>2+</sup> y/o Ca<sup>2+</sup>, ya que se ha demostrado que la unión a tales sitios es reducida en un 75% en ausencia de los cationes mencionados (93). Por otra parte, diversos datos experimentales parecen indicar que algunos receptores P2 son activados por una forma de ATP no unida a cationes divalentes (presumiblemente ATP<sup>4-</sup>) y no por ATP-Mg<sup>2+</sup>, que constituye el sustrato para las ATPasas y las quinasas (154). El medio de incubación utilizado en el presente trabajo en los ensayos de unión con el radioligando [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S es preparado en ausencia de Mg<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup>, por lo que se puede descartar en gran medida la unión del radioligando a las ATPasas presentes en las fracciones de membrana plasmática. Además, el hecho de que la densidad máxima de sitios de unión obtenida en las fracciones apical y basolateral de la membrana plasmática sea significativamente diferente, siendo ambas fracciones igualmente ricas en ATPasas, es un dato más a favor de esta conclusión. Por otra parte, el ensayo de unión se llevó a cabo en presencia de EDTA 1mM, agente quelante que previene la interacción de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S con sitios de unión no específica y reduce significativamente la degradación enzimática del radioligando (154).

Con nuestros estudios, no obstante, no podemos descartar completamente la unión del radioligando a otras posibles proteínas de unión del ATP que pudieran estar presentes en la membrana plasmática de la célula parietal tales como canales iónicos sensibles al ATP, canales de ATP, proteínas transportadoras de ATP (proteínas ABC) u otras, pero estas posibles interacciones no implicarían la no existencia de receptores P2Y.

La afinidad de la unión en la fracción de membrana plasmática basolateral fue fuertemente reducida por la presencia de GDP en el medio de incubación, mientras que la densidad de los sitios de unión no era significativamente afectada. De ello podemos deducir que la afinidad de los sitios de unión detectada depende de un acoplamiento a la proteína G, lo que está de acuerdo con el carácter metabotrópico de los sugeridos receptores P2Y.

A partir de los valores  $IC_{50}$  mostrados por diferentes agonistas P2 en competición por los sitios de unión de  $[^{35}S]dATP\alpha S$  en la fracción basolateral puede establecerse el siguiente orden de afinidades:  $ATP\gamma S \geq ATP \geq 2-MeSATP \geq dATP \geq 2-MeSADP \gg \gg ADP\beta S > UTP$ , mientras que el análogo  $\beta,\gamma$ -meATP no puede ser considerado como un verdadero competidor. Este orden de potencia es similar al obtenido para la acción antsecretora de estos ligandos en células parietales de conejo estimuladas con histamina, donde  $2-MeSATP > ATP \gg \beta,\gamma$ -meATP, UTP (56). Y es similar también al orden de potencia observado en el desplazamiento de la unión de  $[^{35}S]dATP\alpha S$  a membranas plasmáticas de glándulas gástricas (144), donde se observó que  $ATP = 2-MeSATP \gg \alpha,\beta$ -meATP  $\gg$  adenosina, y UTP no desplazaba más del 30% de la unión del radioligando.

El orden de afinidades mostrado en el presente trabajo por los agonistas competidores está de acuerdo con tres de los receptores P2Y hasta ahora clonados que son sensibles a los nucleótidos de adenina e insensibles a los nucleótidos de uridina: P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>11</sub> y P2Y<sub>12</sub>.

Un nuevo receptor P2Y, denominado P2Y<sub>13</sub>, que es también activado por los nucleótidos de adenina y no por los de uridina ha sido clonado a partir de tejido humano (30). Este receptor muestra una alta afinidad por el ADP e inhibe la adenilato ciclasa, al igual que el receptor P2Y<sub>12</sub>. Pero mientras en el receptor P2Y<sub>12</sub> el 2-MeSADP muestra 10-100 veces mayor potencia que el ADP, ambos compuestos presentan afinidades similares en el receptor P2Y<sub>13</sub>. La ausencia de efecto de los nucleótidos trifosfato en el receptor P2Y<sub>13</sub> es otra característica farmacológica importante que permite diferenciarlos de los receptores P2Y<sub>12</sub>. Se ha descrito que el 2-MeSATP es inactivo a

concentraciones superiores a 1  $\mu\text{M}$  en el receptor P2Y<sub>13</sub>, mientras que su potencia en el receptor P2Y<sub>12</sub> está en el rango nanomolar y es similar a la del 2-MeSADP (156). Podemos observar que estas características del receptor P2Y<sub>13</sub> no se ajustan al perfil derivado de nuestros ensayos de unión, donde el 2-MeSATP es de similar potencia al 2-MeSADP (ambos en el rango nanomolar) y éste, a su vez, es alrededor de 20 veces más potente que el ADP $\beta\text{S}$  (cuya potencia está en el rango  $\mu\text{M}$ ). A partir de estos datos podemos considerar que no es probable que el receptor P2Y<sub>13</sub> esté presente en las preparaciones de membrana plasmática basolateral de la célula parietal gástrica.

El alto valor IC<sub>50</sub> obtenido por el UTP en los estudios de competición ( $\approx 10^2$  veces mayor que el valor IC<sub>50</sub> del ATP) indicaría que los receptores P2Y sensibles a los nucleótidos de uridina (P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>6</sub>) pueden ser descartados como el sitio de unión descrito en estas fracciones enriquecidas en membrana plasmática basolateral de células parietales. Lo que estaría de acuerdo, por otra parte, con la observación de que el UTP carece de efecto sobre la secreción de ácido en preparaciones de células parietales de conejo estimuladas con histamina (56).

Como se ha comentado anteriormente, los receptores presentes en las fracciones de membrana plasmática parecen estar acoplados a la proteína G. Y puesto que el análogo  $\beta,\gamma$ -meATP no puede competir por la unión de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha\text{S}$ , podemos descartar la presencia de receptores P2X en nuestras muestras de membrana. Lo que también viene a corroborar lo descrito en los estudios sobre la influencia de los nucleótidos de adenina y uridina en la secreción gástrica de ácido en preparaciones de células parietales de conejo estimuladas con histamina (56).

En los estudios de competición han sido ensayados diversos antagonistas de los receptores P2. El compuesto A2P5PS no producía ningún desplazamiento del radioligando y el PPADS desplazaba no más del 35% a la concentración máxima de 0,1 mM. La suramina era capaz de competir por la unión con un valor IC<sub>50</sub> de alrededor de 1,50  $\mu\text{M}$  y el reactivo blue 2 fue el que mostró el menor valor IC<sub>50</sub> entre los antagonistas ensayados (0,54  $\mu\text{M}$ ).

Se ha descrito que los análogos bifosfato de la adenosina tales como A2P5PS y A3P5PS bloquean selectivamente las respuestas mediadas por el

receptor P2Y<sub>1</sub> (142, 146). El reactivo blue 2, la suramina y el PPADS (146) también actúan como antagonistas de los receptores P2Y<sub>1</sub>, con aproximadamente similares potencias antagonistas. La suramina y el reactivo blue 2 son antagonistas del receptor P2Y<sub>11</sub>, pero no el PPADS (146). Los receptores P2Y<sub>12</sub> son insensibles al PPADS, débilmente antagonizados por suramina y bastante potentemente antagonizados por el reactivo blue 2 (142).

La falta de competición del A2P5PS y el PPADS y la sí observada para la suramina y el reactivo blue 2 por la unión del [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S en nuestro estudio nos inducen a pensar, por un lado, que podríamos descartar la presencia de receptores P2Y<sub>1</sub> y, por otro lado, que los subtipos de receptor P2Y presentes posiblemente en las fracciones de membrana plasmática basolateral de las células parietales serían más probablemente los subtipos P2Y<sub>11</sub> y/o P2Y<sub>12</sub>.

Ambos subtipos de receptor difieren en sus mecanismos de transducción. Se ha descrito que el receptor P2Y<sub>11</sub> media la activación tanto de la fosfolipasa C como de la adenilato ciclasa; el receptor P2Y<sub>12</sub>, por su parte, inhibe la adenilato ciclasa (146).

Respecto al mecanismo de acción desplegado por el ATP, en los estudios realizados con preparaciones de células parietales de conejo estimuladas con histamina se sugirió que el ATP promovería una inhibición de la secreción de ácido por medio de un mecanismo combinado (56): a) el ATP, por un lado, actuaría directamente sobre la célula parietal a través de receptores P2Y que promueven la inhibición de la adenilato ciclasa acoplada, probablemente, a receptores H<sub>2</sub> de histamina mediante una proteína G<sub>i</sub> de membrana, atenuando de este modo la respuesta secretora inducida por histamina, y b) el ATP, por otro lado, actuaría sobre receptores P2Y vinculados con la síntesis de prostaglandinas estimulando su producción endógena; éstas, a su vez, utilizando el mecanismo antes descrito inhibirían la respuesta secretora a la histamina.

Este tipo de mecanismo de acción nos sugiere poderosamente que los receptores presentes en nuestras preparaciones de membrana podrían ser del subtipo P2Y<sub>12</sub>. Sin embargo no podemos confirmarlo definitivamente, ya que

los resultados experimentales obtenidos al ensayar la actividad de la adenilato ciclasa en preparaciones enriquecidas en membrana plasmática basolateral de células parietales no han sido concluyentes.





## **6. CONCLUSIONES**



1. El procedimiento desarrollado para el aislamiento y separación simultánea de las fracciones apical y basolateral de la membrana plasmática de las células parietales de la mucosa gástrica de conejo es adecuado para conseguir un enriquecimiento apropiado de los enzimas marcadores en sus respectivos dominios de membrana y nos permite obtener preparaciones idóneas para los estudios de unión con radioligandos.

2. Se ha encontrado un sitio de unión de alta afinidad para el radioligando [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S, probablemente un receptor P2Y, tanto en las fracciones de membrana plasmática apical como en las fracciones de membrana plasmática basolateral de las células parietales. El valor de la K<sub>d</sub> es similar en ambas fracciones de membrana plasmática.

3. La densidad máxima de los sitios de unión para el radioligando [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S es significativamente diferente en las dos fracciones de la membrana plasmática de la célula parietal. De ello se deduce la existencia de una distribución asimétrica del sitio de unión de alta afinidad del radioligando [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S en la membrana plasmática de la célula parietal de la mucosa gástrica de conejo.

4. La afinidad de la unión del [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S en la fracción de membrana plasmática basolateral es fuertemente reducida por la presencia de GDP en el medio de incubación, mientras que la densidad máxima de los sitios de unión no es significativamente afectada. De ello podemos deducir que la afinidad de los sitios de unión detectada depende de un acoplamiento a la proteína G, lo que está de acuerdo con el carácter metabotrópico de los sugeridos receptores P2Y.

5. Puesto que los sitios de unión detectados en las fracciones de membrana plasmática basolateral parecen estar acoplados a la proteína G y debido a que el  $\beta,\gamma$ -meATP no puede competir por la unión de [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S podemos descartar la presencia de receptores P2X en estas muestras de membrana.

## CONCLUSIONES

---

6. El alto valor  $IC_{50}$  obtenido por el UTP en los estudios de competición nos permite descartar la presencia de receptores P2Y sensibles a los nucleótidos de uridina (P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>6</sub>) en las fracciones enriquecidas en membrana plasmática basolateral de las células parietales.

7. Puesto que en los ensayos de competición el 2-MeSATP muestra similar potencia al 2-MeSADP y éste es, a su vez, alrededor de 20 veces más potente que el ADPβS podemos considerar que no es probable que el receptor P2Y<sub>13</sub> esté presente en las preparaciones de membrana plasmática basolateral de la célula parietal gástrica.

8. Debido a la falta de competición de los antagonistas P2 A2P5PS y PPADS por la unión de [<sup>35</sup>S]dATPαS en nuestro estudio podemos descartar la presencia de receptores P2Y<sub>1</sub> en las fracciones enriquecidas en membrana plasmática basolateral.

9. Teniendo en cuenta el orden de afinidades obtenido en los estudios de competición para los agonistas de los receptores P2 y el perfil mostrado por los antagonistas P2 ensayados podemos sugerir que los subtipos de receptor P2Y presentes posiblemente en las fracciones de membrana plasmática basolateral de las células parietales son probablemente los subtipos P2Y<sub>11</sub> y/o P2Y<sub>12</sub>.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



1. Abbracchio MP and Burnstock G. Purinoceptors: Are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* 1994; 64: 445-475.
2. Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, King BF, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA, Burnstock G. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y<sub>14</sub> receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol. Sci.* 2003; 24: 52-55.
3. Agnew BJ, Duman JG, Watson CL, Coling DE and Forte JG. Cytological transformations associated with parietal cell stimulation: critical steps in the activation cascade. *J. Cell Sci.* 1999; 112: 2639-2646.
4. Ainz LF, Gil-Rodrigo CE, Gomez R, Malillos M, Requejo D, Gandarias JM. Efecto de algunos derivados fisiológicos de la adenina sobre la secreción de ácido en glándulas gástricas aisladas de conejo. *Rev. Esp. Fisiol.* 1989; 45: 281-286.
5. Ainz LF, Salgado C, Gandarias JM, Gómez R, Vallejo A, Gil-Rodrigo CE. P<sub>1</sub>(A<sub>2</sub>/R<sub>a</sub>)-purinoceptors may mediate the stimulatory effect of adenosine and adenosine analogs on acid formation in isolated rabbit parietal cells. *Pharmacol. Res.* 1993; 27: 319-334.
6. Akbar GKM, Dasari VR, Webb TE, Ayyanathan K, Pillarisetti K, Sandhu AK, Athwal RS, Daniel JL, Ashby B, Barnard EA, et al. Molecular cloning of a novel P2 purinoceptor from human erythroleukemia cells. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 18363-18367.
7. Amsallem, H., M. Metioui, A. VandenAbeelee, A. Elyamani, A. Moran, and J.-P. Dehaye. Presence of a metabotropic and an ionotropic purinergic receptor on rat submandibular ductal cells. *Am. J. Physiol.* 1996; 271: C1546-C1555.
8. Aronson NN Jr, Touster O. Isolation of rat liver plasma membrane fragments in isotonic sucrose. *Methods Enzymol.* 1974; 31(Pt A): 90-102.
9. Barnard EA, Burnstock G and Webb TE. G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: A new receptor family. *Trends Pharmacol. Sci.* 1994; 15: 67-70.
10. Beil W, Sewing KF. Inhibition of partially purified K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-ATPase from guinea-pig isolated and enriched parietal cells by substituted benzimidazoles. *Br. J. Pharmacol.* 1984; 82: 651-657.
11. Berglindh T, Öbrink KJ. A method for preparing isolated glands from the rabbit gastric mucosa. *Acta Physiol. Scand.* 1976; 96: 150-159.

## BIBLIOGRAFÍA

---

12. Berglindh T, Dibona DR, Ito S and Sachs G. Probes of parietal cell function. *Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol.)* 1980; 238: G165-G176.
13. Birnbaumer L, Abramowitz J, Brown AM. Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1990; 1031: 163-224.
14. Bogdanov YD, Dale L, King BF, Whittock N and Burnstock G. Early expression of a novel nucleotide receptor in the neural plate of *Xenopus* embryos. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 12583-12590.
15. Bordi C, D'Adda T, Azzoni C and Ferraro G. Classification of gastric endocrine cells at the light and electron microscopical levels. *Micros. Res. Tech.* 2000; 48: 258-271.
16. Boyer JL, Romero T, Schachter JB and Harden TK. Identification of competitive antagonists of the P2Y<sub>1</sub> receptor. *Mol. Pharmacol.* 1996; 50: 1323-1329.
17. Boyer JL, Waldo GL, Harden TK. Molecular cloning and expression of an avian G protein-coupled P2Y receptor. *Mol. Pharmacol.* 1997; 52: 928-934.
18. Boyer JL, Delaney SM, Villanueva D and Harden TK. A Molecularly Identified P2Y Receptor Simultaneously Activates Phospholipase C and Inhibits Adenylyl Cyclase and Is Nonselectively Activated by All Nucleoside Triphosphates. *Mol. Pharmacol.* 2000; 57: 805-810.
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.
20. Bucheimer RE and Linden J. Purinergic regulation of epithelial transport. *J. Physiol.* 2004; 555: 311-321.
21. Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Bolis L and Straub RW, editors. *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones*. New York: Raven Press; 1978. p 107-118.
22. Burnstock G and Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P<sub>2</sub>-purinoceptor? *Gen. Pharmacol.* 1985; 16: 433-440.
23. Bylund DB, Toews ML. Radioligand binding methods: practical guide and tips. *Am. J. Physiol.* 1993; 265: L421-L429.
24. Callaghan JM, Toh BH, Pettitt JM, Humphris DC, Gleeson PA. Poly-N-acetyllactosamine-specific tomato lectin interacts with gastric parietal cells. Identification of a tomato-lectin binding 60-90 x 10<sup>3</sup> M<sub>r</sub> membrane glycoprotein of tubulovesicles. *J. Cell. Sci.* 1990; 95: 563-576.



25. Camaioni E, Boyer JL, Mohanram A, Harden TK and Jacobson KA. Deoxyadenosine-bisphosphate derivatives as potent antagonists at P2Y<sub>1</sub> receptors. *J. Med. Chem.* 1998; 41: 183-190.
26. Chang K, Hanaoka K, Kumada M, and Takuwa Y. Molecular Cloning and Functional Analysis of a Novel P<sub>2</sub> Nucleotide Receptor. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 26152-26158.
27. Communi D, Motte S, Boeynaems JM and Piroton S. Pharmacological characterization of the human P2Y<sub>4</sub> receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 1996; 317: 383-389.
28. Communi D, Govaerts C, Parmentier M and Boeynaems JM. Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 31969-31973.
29. Communi D, Robaye B and Boeynaems JM. Pharmacological characterization of the human P2Y<sub>11</sub> receptor. *Br. J. Pharmacol.* 1999; 128: 1199-1206.
30. Communi D, Suarez Gonzalez N, Detheux M, Brézillon S, Lannoy V, Parmentier M, Boeynaems J-M. Identification of a novel human ADP receptor coupled to G<sub>i</sub>. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 41479-41485.
31. Cressman VL, Lazarowski ER, Homolya L, Boucher RC, Koller BH and Grubb BR. Effect of loss of P2Y<sub>2</sub> receptor gene expression on nucleotide regulation of murine epithelial Cl<sup>-</sup> transport. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 26461-26468.
32. Culp DJ, Forte JG. An enriched preparation of basal-lateral plasma membranes from gastric glandular cells. *J. Membr. Biol.* 1981; 59: 135-142.
33. Del Valle J and Todisco A. Gastric secretion. In: Yamada T, editor. *Textbook of Gastroenterology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott JB; 1999. p. 278-319.
34. Demarest JR, Loo DD. Electrophysiology of the parietal cell. *Annu. Rev. Physiol.* 1990; 52: 307-319.
35. Dockray GJ. Gastrin and gastric epithelial physiology. *J. Physiol.* 1999; 518: 315-324.
36. Dorin M. Developing Elutriation Protocols. *Technical Information. High Speed Centrifugation*. Fullerton, California: Beckman Instruments, Inc.; 1994. p. 1-7.
37. Dranoff JA, Masyuk AI, Kruglov EA, LaRusso NF and Nathanson MH. Polarized expression and function of P2Y ATP receptors in rat bile duct epithelia. *Am. J. Physiol.* 2001; 281: G1059-G1067.

## BIBLIOGRAFÍA

---

38. Dubyak GR. Focus on "multiple functional P2X and P2Y receptors in the luminal and basolateral membranes of pancreatic duct cells". *Am. J. Physiol.* 1999; 277: C202-C204.
39. Dubyak GR. Knock-Out Mice Reveal Tissue-Specific Roles of P2Y Receptor Subtypes in Different Epithelia. *Mol. Pharmacol.* 2003; 63: 773-776.
40. Erlinge D, Hou M, Webb TE, Barnard EA and Möller S. Phenotype Changes of the Vascular Smooth Muscle Cell Regulate P2 Receptor Expression as Measured by Quantitative RT-PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 248: 864-870.
41. Evans WH. Preparation and characterization of mammalian plasma membranes. In: Work TS and Work E, editors. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press; 1979. p. 1-266.
42. Fabre JE, Nguyen M, Latour A, Keifer JA, Audoly LP, Coffman TM and Koller BH. Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y<sub>1</sub>-deficient mice. *Nat. Med.* 1999; 5: 1199-1202.
43. Filtz TM, Li Q, Boyer JL, Nicholas RA and Harden TK. Expression of a cloned P2Y purinergic receptor that couples to phospholipase C. *Mol. Pharmacol.* 1994; 46: 8-14.
44. Fiske CH and Subbarow Y. Colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 1925; 66: 375-400.
45. Forsythe KM, Bjur RA and Westfall DP. Nucleotide modulation of norepinephrine release from sympathetic nerves in the rat vas deferens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991; 256: 831-826.
46. Forte TM, Machen TE and Forte JG. Ultrastructural changes in oxyntic cells associated with secretory function: a membrane recycling hypothesis. *Gastroenterol.* 1977; 73: 941-955.
47. Forte JG, Black JA, Forte TM, Machen TE and Wolosin JM. Ultrastructural changes related to functional activity in gastric oxyntic cells. *Am. J. Physiol.* 1981; 241: G349-G358.
48. Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden KT, Jacobson KA, Leff P and Williams M. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.* 1994; 46: 143-156.
49. Fredholm BB, Burnstock G, Harden KT and Spedding M. Receptor nomenclature. *Drug Dev. Res.* 1996; 39: 461-466.

50. Fryklund J, Wallmark B, Larsson H, Helander HF. Effect of omeprazole on gastric secretion in H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and in pepsinogen-rich cell fractions from rabbit gastric mucosa. *Biochem. Pharmacol.* 1984; 33: 273-280.
51. Ganser AL, Forte JG. K<sup>+</sup>-stimulated ATPase in purified microsomes of bullfrog oxyntic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1973; 307: 169-180.
52. Geneser F. Aparato digestivo. In: *Histología*. 2. ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A.; 1994. p 380-451.
53. Gil-Rodrigo CE, Gáldiz B, Gandarias JM, Gómez R, Ainz LF. Characterization of the effects of adenosine, adenosine 5'-triphosphate and related purines on acid secretion in isolated rabbit gastric glands. *Pharmacol. Res.* 1990; 22: 103-113.
54. Gil-Rodrigo CE, Gáldiz B, Carou M, Gandarias JM, Gómez R, Vallejo A, Ainz LF. Inhibición específica por ATP de la secreción ácida estimulada por histamina en glándulas gástricas de conejo. *Rev. Esp. Fisiol.* 1992; 48: 31-36.
55. Gil-Rodrigo CE, Gómez R, Gandarias JM, Gáldiz B, Carou M, Bergaretxe I, Vallejo A, Ainz LF. Effect of adenosine 5'-triphosphate on secretagogue-stimulated (14C)-aminopyrine accumulation by rabbit isolated gastric glands. *Gen. Physiol. Biophys.* 1993; 12: 27-36.
56. Gil-Rodrigo CE, Bergaretxe I, Carou M, Gáldiz B, Salgado C, Ainz LF. Inhibitory action of extracellular adenosine 5'-triphosphate on parietal cells isolated from rabbit gastric mucosa. *Gen. Physiol. Biophys.* 1996; 15: 251-264.
57. Gordon JL. Extracellular ATP: Effects, sources and fate. *Biochem. J.* 1986; 233: 309-319.
58. Hanzel D, Reggio H, Bretscher A, Forte JG, Mangeat P. The secretion-stimulated 80K phosphoprotein of parietal cells is ezrin, and has properties of a membrane cytoskeletal linker in the induced apical microvilli. *EMBO J.* 1991; 10: 2363-2373.
59. Harden TK, Boyer JL and Nicholas RA. P<sub>2</sub>-purinergic receptors: subtype-associated signaling responses and structure. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1995; 35: 541-579.
60. Hechler B, Vigne P, Leon C, Breitmayer JP, Gachet C, and Frelin C. ATP derivatives are antagonists of the P2Y<sub>1</sub> receptor: similarities to the platelet ADP receptor. *Mol. Pharmacol.* 1998; 53: 727-733.
61. Helander HF. The cells of the gastric mucosa. *Int. Rev. Cytol.* 1981; 70: 217-289.

## BIBLIOGRAFÍA

---

62. Helander HF, Leth R and Olbe L. Stereological investigations on human gastric mucosa: I. Normal oxyntic mucosa. *Anat. Rec.* 1986; 216: 373-380.
63. Helander HF and Keeling DJ. Cell biology of gastric acid secretion. *Baillière's Clin. Gastroenterol.* 1993; 7: 1-20.
64. Hersey SJ, Sachs G. Gastric acid secretion. *Physiol. Rev.* 1995; 75: 155-189.
65. Hirst BH. Parietal cell membrane trafficking. Focus on "Expression of rab11a N124I in gastric parietal cells inhibits stimulatory recruitment on the H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase". *Am. J. Physiol (Cell Physiol.)* 1999; 277: C359-C360.
66. Hwang, T.-H., E. M. Schwiebert, and W. B. Guggino. Apical and basolateral ATP stimulates tracheal epithelial chloride secretion via multiple purinergic receptors. *Am. J. Physiol.* 1996; 270: C1611-C1623.
67. Illsley NP, Wang ZQ, Gray A, Sellers MC, Jacobs MM. Simultaneous preparation of paired, syncytial, microvillous and basal membranes from human placenta. *Biochim. Biophys. Acta.* 1990; 1029: 218-226.
68. Ito S. Functional gastric morphology. In: Johnson LR, editors. *Physiology of the Gastrointestinal Tract.* 2 ed. New York: Raven Press; 1987. p. 817-851.
69. Janssens R, Paindavoine P, Parmentier M, and Boeynaems J-M. Human P2Y<sub>2</sub> receptor polymorphism: identification and pharmacological characterization of two allelic variants. *Br. J. Pharmacol.* 1999; 127: 709-716.
70. Järv J and Eller M. Kinetic aspects of L-quinuclidinyl benzilate interaction with muscarinic receptors. *Neurochem. Int.* 1988; 13: 419-428
71. Kamoshida S, Saito E, Fukuda S, Kato K, Iwasaki A and Arakawa Y. Anatomical location of enterochromaffin-like (ECL) cells, parietal cells, and chief cells in the stomach demonstrated by immunocytochemistry and electron microscopy. *J. Gastroenterol.* 1999; 34: 315-320.
72. Keppens S, Vandekerckhove A, De Wulf H. Characterization of the purinoceptors present in rabbit and guinea pig liver. *Eur. J. Pharmacol.* 1990; 182: 149-153.
73. Kidder GW. Effects of exogenous ATP on acid secretion in frog gastric mucosa. *Am. J. Physiol.* 1971; 221: 421-426.
74. Lacapère J-J, Robert J-C and Thomas-Soumarmon A. Efficient solubilization and purification of the gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase for functional and structural studies. *Biochem. J.* 2000; 345: 239-245.

75. Lambrecht G, Friebe T, Grimm U, Windscheif U, Bungardt E, Hildebrandt C, Baumert HG, Spatz-Kumbel G, Mutschler E. PPADS, a novel functionally selective antagonist of P<sub>2</sub> purinoceptor-mediated responses. *Eur. J. Pharmacol.* 1992; 217: 217-219.
76. Lambrecht G, Seidler U and Classen M. Intracellular pH-regulating ion transport mechanisms in parietal cell basolateral membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* 1993; 265: G903-G910.
77. Lambrecht G. Design and pharmacology of selective P<sub>2</sub>-purinoceptor antagonists. *J. Auton. Pharmacol.* 1996;16: 341-344.
78. Lazarowski, E. R., A. M. Paradiso, W. C. Watt, T. K. Harden, and R. C. Boucher. UDP activates a mucosal-restricted receptor on human nasal epithelial cells that is distinct from the P<sub>2</sub>Y<sub>2</sub> receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 2599-2603.
79. Lee, M. G., W. Zeng, and S. Muallem. Characterization and localization of P<sub>2</sub> receptors in rat submandibular gland acinar and duct cells. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 32951-32955.
80. Leipziger J. Control of epithelial transport via luminal P<sub>2</sub> receptors. *Am. J. Physiol.* 2003; 284: F419-F432.
81. Leon C, Hechler B, Vial C, Leray C, Cazenave JP and Gachet C. The P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells. *FEBS Lett.* 1997; 403: 26-30.
82. Leon C, Hechler B, Freund M, Eckly A, Vial C, Ohlmann P, Dierich A, LeMeur M, Cazenave JP, and Gachet C. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> receptor-null mice. *J. Clin. Investig.* 1999; 104: 1731-1737.
83. Lepiku M, Rinken A, Jarv J, Fuxe K. Kinetic evidence for isomerization of the dopamine receptor-raclopride complex. *Neurochem. Int.* 1996; 28: 591-595.
84. Lewin M, Soumarmon A, Bali JP, Bonfils S, Girma JP, Morgat JL, Fromageot P. Interaction of <sup>3</sup>H-labelled synthetic human gastrin I with rat gastric plasma membranes. Evidence for the existence of biologically reactive gastrin receptor sites. *FEBS Lett.* 1976; 66: 168-172.
85. Lewin MJ-M. Cellular mechanisms and inhibitors of gastric acid secretion. *Drugs of Today* 1999; 35: 743-752.
86. Li Q, Olesky M, Palmer RK, Harden TK, and Nicholas RA. Evidence that the p<sub>2</sub>y<sub>3</sub> Receptor Is the Avian Homologue of the Mammalian P<sub>2</sub>Y<sub>6</sub> Receptor *Mol. Pharmacol.* 1998; 54: 541-546.

## BIBLIOGRAFÍA

---

87. Ljungstrom M, Norberg L, Olaisson H, Wernstedt C, Vega FV, Arvidson G, Mardh S. Characterization of proton-transporting membranes from resting pig gastric mucosa. *Biochim. Biophys. Acta.* 1984; 769: 209-219.
88. Luo, X, Zheng W, Yan M, Lee MG, and Muallem S. Multiple functional P2X and P2Y receptors in the luminal and basolateral membranes of pancreatic duct cells. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)* 1999; 277: C205-C215.
89. Lustig KD, Shiau AK, Brake AJ and Julius D. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993; 90: 5113-5117.
90. Malbon CC, Rapiejko PJ, Mangano TJ. Fat cell adenylate cyclase system. Enhanced inhibition by adenosine and GTP in the hypothyroid rat. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 2558-2564.
91. Mazzone MR, Martini C, Lucacchini A. Regulation of agonist binding to A<sub>2A</sub> adenosine receptors: effects of guanine nucleotides (GDP[S] and GTP[S]) and Mg<sup>2+</sup> ion. *Biochim. Biophys. Acta.* 1993; 1220: 76-84.
92. Miralles A, García-Sevilla JA. Caracterización de receptores mediante la unión de radioligandos. En: Producción editorial, Rubes editorial S.L. *Monografías de Neurociencias. Receptores para neurotransmisores.* Barcelona: Ediciones en Neurociencias S.L. 1996; 57-80.
93. Mockett BG, Housley GD, Thorne PR. Fluorescence imaging of extracellular purinergic receptor sites and putative ecto-ATPase sites on isolated cochlear hair cells. *J. Neurosci.* 1994; 14 (11 Pt 2): 6992-7007.
94. Mosbacher J, Maier R, Fakler B, Glatz A, Crespo J, Bilbe G. P2Y receptor subtypes differentially couple to inwardly-rectifying potassium channels. *FEBS Lett.* 1998; 436: 104-110.
95. Muallem S, Burnham C, Blissard D, Berglindh T and Sachs G. Electrolyte transport across the basolateral membrane of the parietal cells. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 664-653.
96. Munson K, Lambrecht N, Shin JM and Sachs G. Analysis of the membrane domain of the gastric H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *J. Experim. Biol.* 2000; 203: 161-170.
97. Nicholas RA, Watt WC, Lazarowski ER, Li Q, Harden K. Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Mol. Pharmacol.* 1996; 50: 224-229.

98. Nicholas RA. Identification of the P2Y<sub>12</sub> Receptor: A Novel Member of the P2Y Family of Receptors Activated by Extracellular Nucleotides. *Mol. Pharmacol.* 2001; 60: 416-420.
99. Norberg L and Mårdh S. A continuous technique for analysis of stoichiometry and transport kinetics of gastric H,K-ATPase. *Acta Physiol. Scand.* 1990; 140: 567-573.
100. Nordstedt C and Fredholm BB. A modification of a protein-binding method for rapid quantification of cAMP in cell-culture supernatans and body fluid. *Anal. Biochem.* 1990; 189: 231-234.
101. O'Connor SE, Dainty IA and Leff P. Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies. *Trends Pharmacol. Sci.* 1991; 12: 137-141.
102. Ogata T. Gastric oxyntic cell structure as related to secretory activity. *Histol. Histopath.* 1997; 12: 739-754.
103. Ogata T and Yamasaki Y. Morphological studies on the translocation of tubulovesicular system toward the intracellular canaliculus during stimulation of the gastric parietal cell. *Micro. Res. Tech.* 2000; 48: 282-292.
104. Ogata T and Yamasaki Y. Scanning EM of resting gastric parietal cells reveals a network of cytoplasmic tubules and cisternae connected to the intracellular canaliculus. *Anat. Rec.* 2000; 258: 15-24.
105. Okamoto CT, Duman JG, Tyagarajan K, McDonald KL, Jeng YY, McKinney J, Forte TM and Forte JG. Clathrin in gastric acid secretory (parietal) cells: biochemical characterization and subcellular localization. *Am. J. Physiol.* 2000; 279: C833-C851.
106. Oras A, Kilk K, Kunapuli S, Barnard EA and Järv J. Kinetic analysis of [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S interaction with P2y<sub>1</sub> nucleotide receptor. *Neurochem. Int.* 2002; 40: 381-386.
107. Oras A, Järv J. Kinetics of [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S interaction with P2Y<sub>1</sub> purinoceptor in rat brain membranes. *Neurosci. Lett.* 2004; 355: 9-12.
108. Ota S, Hiraishi H, Terano A, Mutoh H, Kurachi Y, Shimada T, Ivey KJ, Sugimoto T. Effect of adenosine and adenosine analogs on [<sup>14</sup>C]aminopyrine accumulation by rabbit parietal cells. *Dig. Dis. Sci.* 1989; 34: 1882-1889.
109. Palmer RK, Boyer JL, Schachter JB, Nicholas RA, and Harden TK. Agonist action of adenosine triphosphates at the human P2Y<sub>1</sub> receptor. *Mol. Pharmacol.* 1998; 54: 1118-1123.

110. Parr CE, Sullivan DM, Paradiso AM, Lazarowski ER, Burch LH, Olsen JC, Erb L, Weisman GA, Boucher RC and Turner JT. Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; 91: 3275-3279.
111. Pettitt JM, Humphris DC, Barrett SP, Toh BH, van Driel IR and Gleeson PA. Fast freeze-fixation/freeze-substitution reveals the secretory membranes of the gastric parietal cell as a network of helically coiled tubule. A new model for parietal cell transformation. *J. Cell Sci.* 1995; 108: 1127-1141.
112. Pettitt JM, van Driel IR, Toh BH and Gleeson PA. From coiled tubules to a secretory canaliculus: a new model for membrane transformation and acid secretion by gastric parietal cells. *Trends Cell. Biol.* 1996; 6: 49-53.
113. Pintor J, Diaz-Rey MA and Miras-Portugal MT. Ap4A and ADP- $\beta$ -S binding to P<sub>2</sub> purinoceptors present on rat brain synaptic terminals. *Br. J. Pharmacol.* 1993; 108: 1094-1099.
114. Pintor J and Miras-Portugal T. A novel receptor for diadenosine polyphosphates coupled to calcium increase in rat midbrain synaptosomes. *Br. J. Pharmacol.* 1995; 115: 895-902.
115. Rabon EC, McFall TL and Sachs G. The gastric (H<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase: H/ATP stoichiometry. *J. Biol. Chem.* 1982; 257: 6296-6299.
116. Ralevic V and Burnstock G. Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 1998; 50: 413-492.
117. Reenstra WW and Forte JG. H<sup>+</sup>/ATP stoichiometry for the gastric (K<sup>+</sup> + H<sup>+</sup>)-ATPase. *J. Membr. Biol.* 1981; 61: 55-60.
118. Robaye B, Boeynaems JM, Communi D. Slow desensitization of the human P2Y<sub>6</sub> receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 1997; 329: 231-236.
119. Saccomani G, Stewart HB, Shaw D, Lewin M and Sachs G. Characterization of gastric mucosal membranes. IX. Fractionation and purification of K<sup>+</sup>-ATPase-containing vesicles by zonal centrifugation and free-flow electrophoresis technique. *Biochim. Biophys. Acta.* 1977; 465: 311-330.
120. Saccomani G, Helander HF, Crago S, Chang HH, Dailey DW and Sachs G. Characterization of gastric mucosal membranes. X. Immunological studies of gastric (H<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)ATPase. *J. Cell. Biol.* 1979; 83: 271-283.
121. Sachs G, Chang HH, Rabon E, Schackman R, Lewin M, Saccomani G. A nonelectrogenic H<sup>+</sup> pump in plasma membranes of hog stomach. *J. Biol. Chem.* 1976; 251: 7690-7698.



122. Sanders MJ, Soll AH. Cell separation by elutriation: major and minor cell types from complex tissues. *Methods Enzymol.* 1989; 171: 482-497.
123. Scarff KL, Judd LM, Toh B-H, Gleeson PA and van Driel IR. Gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase  $\beta$  subunit is required for normal function, development, and membrane structure of mouse parietal cells. *Gastroenterol.* 1999; 117: 605-618.
124. Schachter JB, Li Q, Boyer JL, Nicholas RA and Harden TK. Second messenger cascade specificity and pharmacological selectivity of the human P2Y<sub>1</sub> receptor. *Br. J. Pharmacol.* 1996; 118: 167-173.
125. Schachter JB and Harden TK. An examination of deoxyadenosine 5'( $\alpha$ -thio)triphosphate as a ligand to define P2Y receptors and its selectivity as a low potency partial agonist of the P2Y<sub>1</sub> receptor. *Br. J. Pharmacol.* 1997; 121: 338-344.
126. Schäfer R, Reiser G. Characterization of [<sup>35</sup>S]-ATP $\alpha$ S and [<sup>3</sup>H]- $\alpha$ , $\beta$ -MeATP binding sites in rat brain cortical synaptosomes: regulation of ligand binding by divalent cations. *Br. J. Pharmacol.* 1997;121: 913-922.
127. Schliebs R, Bigl V. Kinetics of the interaction of dihydroalprenolol with beta-adrenergic receptors in rat cerebral cortex. *Gen. Physiol. Biophys.* 1984; 3: 31-46.
128. Schmidt WE and Bojko JB. Regulation of gastric acid secretion. *Gastrointestinal Endocrinol.* 1999; 8: 353-391.
129. Schubert ML. Regulation of gastric acid secretion. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 1998; 14: 425-432.
130. Schubert ML. Regulation of gastric acid secretion. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 1999; 15: 457-462.
131. Schubert ML. Gastric secretion. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2000; 16: 463-468.
132. Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P, Harline M, Boivin GP, Stemmermann G, Duffy JJ, Doetschman T, Miller ML, and Shull GE. Targeted disruption of the murine Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 2 gene causes reduced viability of gastric parietal cells and loss of net acid secretion. *J. Clin. Invest.* 1998; 101: 1243-1253.
133. Skrabanja ATP, van der Hijden H and De Pont JJHM. Transport ratios of reconstituted (H<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1987; 903: 434-440.

134. Shull GE, Miller ML and Schultheis PJ. Lessons from Genetically Engineered Animal Models. VIII. Absorption and secretion of ions in the gastrointestinal tract. *Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol.)* 2000; 278: G185-G190.
135. Simon J, Webb TE and Barnard EA. Characterization of a P2Y purinoceptor in the brain. *Pharmacol. Toxicol.* 1995; 76: 302-307.
136. Simon J, Webb TE, Barnard EA. Distribution of [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S binding sites in the adult rat neuraxis. *Neuropharmacol.* 1997; 36: 1243-1251.
137. Skou JC. The Na,K-pump. *Methods Enzymol.* 1988; 156: 1-25.
138. Soll AH and Berglindh T. Physiology of isolated gastric glands and parietal cells: Receptors and effectors regulating function. In: Johnson LR editor. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. New York: Raven Press; 1987. p. 883-909.
139. Supplisson S, Loo DD, Sachs G. Diversity of K<sup>+</sup> channels in the basolateral membrane of resting *Necturus oxyntic* cells. *J. Membr. Biol.* 1991; 123: 209-221.
140. Swillens S, Waelbroeck M, Champeil P. Does a radiolabelled ligand bind to a homogeneous population of non-interacting receptor sites? *Trends Pharmacol. Sci.* 1995; 16: 151-155.
141. Tietz PS, Holman RT, Miller LJ, LaRusso NF. Isolation and characterization of rat cholangiocyte vesicles enriched in apical or basolateral plasma membrane domains. *Biochemistry.* 1995; 34: 15436-15443.
142. Unterberger U, Moskvina E, Scholze T, Freissmuth M, Boehm S. Inhibition of adenylyl cyclase by neuronal P2Y receptors. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 135: 673-684.
143. Urushidani T and Forte JG. Signal transduction and activation of acid secretion in the parietal cell. *J. Membr. Biol.* 1997; 159: 99-111.
144. Vallejo AI, Bo X, Burnstock G. P2Y purinoceptors in gastric gland plasma membranes. *Eur. J. Pharmacol.* 1996; 312: 209-214.
145. Von Kügelgen I and Starke K. Evidence for two separate vasoconstriction-mediating nucleotide receptors, both distinct from the P2X-receptor, in rabbit basilar artery: A receptor for pyrimidine nucleotides and a receptor for purine nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1990; 341: 538-546.
146. Von Kügelgen I and Wetter A. Molecular pharmacology of P2Y receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2000; 362: 310-323.

147. Von Kügelgen I and Wetter A. Table: Molecular pharmacology of P2Y-receptor subtypes, updated version (modified from von Kügelgen I and Wetter A. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2000; 362: 310-323). Updated April 2003. Disponible en <http://www.uni-bonn.de/~umv70019/p2r.htm>.
148. Waldo GL, Corbitt J, Boyer JL, Ravi G, Kim HS, Ji XD, Lacy J, Jacobson KA, Harden TK. Quantitation of the P2Y<sub>1</sub> receptor with a high affinity radiolabeled antagonist. *Mol. Pharmacol.* 2002; 62: 1249-1257.
149. Webb TE, Simon J, Krishek BJ, Bateson AN, Smart TG, King BF, Burnstock G and Barnard EA. Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett.* 1993; 324: 219-225.
150. Webb TE, Kaplan MG and Barnard EA. Identification of 6H1 as a P2Y purinoceptor: P2Y<sub>5</sub>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 219: 105-110.
151. Wiklund NP and Gustafsson LE. Indications for P<sub>2</sub>-purinoceptor subtypes in guinea-pig smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 1988; 148: 361-370.
152. Wolfe MM and Sachs G. Acid suppression: optimizing therapy for gastroduodenal ulcer healing, gastroesophageal reflux disease, and stress-related erosive syndrome. *Gastroenterol.* 2000; 118 (2 Suppl 1): S9-S31.
153. Xu X., Zeng W, Díaz J, Lau KA, Gukovskaya AC, Brown RJ, Pandol SJ, and Muallem S. nNOS and Ca<sup>2+</sup> influx in rat pancreatic and submandibular salivary gland cells. *Cell Calcium* 1997; 22: 217-228.
154. Yegutkin GG, Burnstock G. Steady-state binding of [<sup>3</sup>H]ATP to rat liver plasma membranes and competition by various purinergic agonists and antagonists. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998; 1373: 227-236.
155. Yao X and Forte JG. Cell biology of acid secretion by the parietal cell. *Ann. Rev. Physiol.* 2003; 65: 103-131.
156. Zhang FL, Luo L, Gustafson E, Lachowicz J, Smith M, Qiao X, Liu Y-H, Chen G, Pramanik B, Laz TM, Palmer K, Bayne M and Monsma FJ-Jr. ADP is the cognate ligand for the orphan G protein-coupled receptor SP1999. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 8608-8615.
157. <http://www.sunyniagara.cc.ny.us/val/stomach.html>  
*Virtual Anatomy Lab. Stomach.* Niagara County Community College. State University of New York. 2003.

## BIBLIOGRAFÍA

---

158. [http://cwx.prenhall.com/horton/medialib/media\\_portfolio/text\\_images/FG09\\_43\\_90201.JPG](http://cwx.prenhall.com/horton/medialib/media_portfolio/text_images/FG09_43_90201.JPG)  
Horton, Moran, Ochs, Rawn and Scrimgeour. *The adenylyate cyclase signalling pathway*. In *Principles of Biochemistry*, by Prentice-Hall, Inc, A Pearson Company. 2002; 9.43-9.45.
159. [http://cwx.prenhall.com/horton/medialib/media\\_portfolio/text\\_images/FG09\\_46\\_90202.JPG](http://cwx.prenhall.com/horton/medialib/media_portfolio/text_images/FG09_46_90202.JPG)  
Horton, Moran, Ochs, Rawn and Scrimgeour. *Inositol-phospholipid signalling pathway*. In *Principles of Biochemistry*, by Prentice-Hall, Inc, A Pearson Company. 2002; 9.46-9.47.
160. [http://www.sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/Life\\_Science/Cell\\_Signaling/Pathway\\_Slides\\_and\\_Charts/Mitogen\\_activated\\_Protein\\_Kinase\\_Cascades.html](http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cell_Signaling/Pathway_Slides_and_Charts/Mitogen_activated_Protein_Kinase_Cascades.html)  
*Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Cascades*. Sigma-Aldrich Co. 2003
161. <http://www.upstate.com/features/gprotein.asp>  
*Purified G-Protein-coupled Receptors*. Upstate Group, Inc. 2004



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.