



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

Biología experimental

### **CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS**

**(P2) INVOLUCRADOS EN LA RELAJACIÓN MEDIADA POR ATP EN EL**

**MÚSCULO LISO TRAQUEAL DE COBAYO**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIÓL. JOSÉ ERIK CRUZ VALDERRAMA**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS MANUEL MONTAÑO RAMÍREZ

FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA MERCEDES PERUSQUÍA NAVA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR: DR. MARIO HUMBERTO VARGAS BECERRA

FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

Biología experimental

### **CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS**

**(P2) INVOLUCRADOS EN LA RELAJACIÓN MEDIADA POR ATP EN EL**

**MÚSCULO LISO TRAQUEAL DE COBAYO**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIÓL. JOSÉ ERIK CRUZ VALDERRAMA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS MANUEL MONTAÑO RAMÍREZ**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA MERCEDES PERUSQUÍA NAVA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**COMITÉ TUTOR: DR. MARIO HUMBERTO VARGAS BECERRA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2013**

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de agosto de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **CRUZ VALDERRAMA JOSÉ ERIK** con número de cuenta 303051141, con la tesis titulada "**CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS (P2) INVOLUCRADOS EN LA RELAJACIÓN MEDIADA POR ATP EN EL MÚSCULO LISO TRAQUEAL DE COBAYO**" realizada bajo la dirección del **DR. LUIS MANIEL MONTAÑO RAMÍREZ**:

Presidente: DRA. LETICIA HAYDEE RAMÍREZ SILVA  
Vocal: DR. CARLOS BARAJAS LÓPEZ  
Secretario: DRA. MARÍA MERCEDES PERUSQUÍA NAVA  
Suplente: DR. MARIO HUMBERTO VARGAS BECERRA  
Suplente: DR. TOMÁS ROCHA RINZA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 23 de noviembre de 2012

*M. del Coro Arizmendi*  
**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA**

# **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por mi formación académica.

Al CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

A los miembros de mi comité tutor:

Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez

Dra. María Mercedes Perusquía Nava

Dr. Mario Humberto Vargas Becerra

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación en Asma de la Torre de Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez. A él y a todo el equipo de trabajo mi más sincera gratitud.

Dedico éste trabajo a dios, a mi familia, a mis amigos, a todas las personas que directa o indirectamente me han ayudado a concluir la tesis y a aquellos a los que les pueda servir.

...Yo, por ejemplo, soy un perro alto, casi pastor alemán o policía - aunque no del todo, porque mi madre era una *collie*. Tengo el pelo color canela, que es una ventaja, y de la cabeza al rabo me corre una línea blanca con dos lunares de pelo negro: uno detrás de la oreja y otro en el rabo, que parecen manchas de aceite y me han costado más baños y restregones de los que merezco.

Por herencia de mi madre - y esto parece que va muy en contra mía - no puedo mantener en alto la oreja izquierda y se me dobla aun cuando estoy atento. Por lo demás, tengo los ojos color caramelo y dos rayas negras que parten de mis párpados inferiores y van hasta las orejas, dan la impresión de que alguien me maquilló para almendrar mis ojos. También, y esto llama mucho la atención, tengo seis dedos en la pata delantera derecha.

Todavía no he cumplido el año, pero ya doy miedo al que me le pare en dos patas y le abra cerca del rostro mi hocico lleno de dientes y colmillos afilados. Soy sencillo, afectuoso; obedezco según quien me mande, y casi siempre estoy alegre. Pero más vale que lo sepáis de una vez: no soy lo que se dice “de raza”...

Perdido de Hilda Perera

# Índice

Lista de Abreviaturas	2
Lista de Figuras	6
Lista de Tablas	7
Resumen	8
Abstract	9
Introducción	
La molécula de ATP	10
Metabolismo extracelular del ATP	11
Receptores purinérgicos o purinorreceptores	15
Receptores acoplados a proteínas G que regulan la relajación en el MLVA	19
Fisiología del ATP en el MLVA	19
Planteamiento del problema	20
Hipótesis	20
Objetivo General	21
Material y Métodos	
1. Órganos Aislados	21
2. Técnica de fijación de membranas	24
3. Fármacos	26
4. Análisis estadísticos	26
Resultados	
1. El ATP induce relajación dependiente de prostaglandinas en los anillos traqueales de cobayo, pero independientemente del epitelio	27
2. Los receptores P2Y son los receptores purinérgicos involucrados en la relajación inducida por ATP en los anillos traqueales de cobayo	29
3. El ATP activa las corrientes de K <sup>+</sup> en célula única	33
Discusión	39
Conclusión	40
Bibliografía	41
Anexos	48



## Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
$\alpha,\beta$ -metilén-ATP	$\alpha,\beta$ -metilén adenosina 5' trifosfato
2-metiltio ADP	2- metiltio adenosina difosfato
2- metiltio ATP	2- metiltio adenosina 5' trifosfato
4-AP	4 -aminopiridina
AC	Adenilil ciclase
ARC 126313	5-(7-cloro-4H-1-tia-3-aza-benzo-4-il[f])-3-metil-6-tioxopiperidin-2-ona
ARC 67085	2-propiltio- $\beta$ - $\gamma$ -diclorometilén-d-adenosina trifosfato
ARC 69931 MX	N <sup>6</sup> -(2-metiltioetil)-2-(3,3,3-trifluoropropiltio)- $\beta$ - $\gamma$ -diclorometilén adenosina trifosfato
ARL 67156	----
ADP	Adenosina difosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina 5' trifosfato
ATP $\gamma$ S	Adenosina 5'-[ $\gamma$ -tio] trifosfato
Bz-ATP	2' y 3'-O-(4-benzoil-benzoil)- adenosina trifosfato
BK	Bradicinina
BK <sub>Ca</sub>	Canal de K <sup>+</sup> dependiente de Ca <sup>2+</sup> de alta conductancia
CT50547	N1-(6-etoxi-1,3-benzotiazol-2-il-2-(7-etoxi-4-hidroxi-2,2-dioxo-2H-2)6benzo [4,5] [1,3]tiazolo[2,3-c] [1,2,4]tiadiazin-3-il)-2-oxo-1-etanosulfonamida
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcio
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración de Ca <sup>2+</sup> intracelular

Abreviatura	Significado
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
Cu <sup>2+</sup>	Ion cobre
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
DAG	Diacilglicerol
DPC	Difenilamino-2-carboxilato
DIDS	4-4'-diisotiocianoestilbeno-2,2'-disulfonato
EGTA	Ácido etiléntrico tetraacético
E-NTPDasa	Ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa
E-NPP	Ectonucleotidasa pirofosfatasa fosfodiesterasa
g.	Gramos (fuerza)
GTP	Guanosina-5' trifosfato
HEPES	Ácido (4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinetanosulfónico
IK	Incremento de las corrientes de K <sup>+</sup>
INS 37217	P(1)-(uridina 5')-P(4)-(2'-deoxicitidina 5')tetrafosfato
IP <sub>3</sub>	1,4-5 trifosfato de inositol
Ibtx	Iberiotoxina
K <sup>+</sup>	Ion potasio
KCl	Cloruro de potasio
KOH	Hidróxido de potasio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monobásico de potasio
Kv	Canal de K <sup>+</sup> de rectificación tardía
K <sub>ATP</sub>	Canal de K <sup>+</sup> sensible a ATP
MEM	Medio esencial mínimo

Abreviatura	Significado
Mg <sup>2+</sup>	Ion magnesio
min.	Minutos
mM	Milimolar
MLC	Cadena ligera de la miosina
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de la miosina
MLVA	Músculo liso de las vías aéreas.
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnesio
MRS 2365	(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4-[(6-amino-2-metiltio-9Hpurin-9-il)-1-difosforiloximetil]biciclo[3.1.0]hexano-2,3-diol
MRS 2179	N <sup>6</sup> -metil 2'-deoxiadenosina-3',5'-bifosfato
MRS 2500	2-iodo-N <sup>6</sup> -metil-(N)-metanocarba-20-deoxiadenosina-30,50-bifosfato
MRS 2578	1,4-di-[(3-isotiocianato fenil)-tioureido]butano
MRS 2211	3,5-dietil-2-metil-4-(trans-2-(4-nitrofenil)vinil)-6-fenil-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato
Na <sup>+</sup>	Ion sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	Carbonato ácido de sodio
NEM	N-etilmaleimida
NF157	Ácido 8,8'-[carbonilbis[imino-3,1-fenilén carbonilimino(4-fluoro-3,1-fenilén) carbonilimino]]bis-1,3,5 naftaléntrisulfónico
NPPB	Ácido [5-nitro-2-(fenilpropilamino) benzoico]
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>

Abreviatura	Significado
PKA	Proteína cinasa A
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PLCβ	Fosfolipasa C β
PPADS	Piridoxal fosfato-6-azo( benceno-2,4-ácido di sulfónico)
RB2	Reactivo azul 2
TEA	Tetraetilamonio
UDP	Uridina difosfato
UDP-glucosa	Uridina difosfato-glucosa
UDP-galactosa	Uridina difosfato-galactosa
UTP	Uridina trifosfato
UTPβS	Uridina-[β-tio] trifosfato
UTPγS	Uridina-[γ-tio] trifosfato
SQ 22,536	9-(Tetrahidro-2-furanil)-9H-purín-6- amína
SITS	4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfonato
VRAC	Canal aniónico dependiente de volumen
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
Zn <sup>2+</sup>	Ion zinc

## Lista de Figuras

Figura	Título	Página
1	Estructura molecular del ATP.	10
2	Vías potenciales para la liberación del ATP al espacio extracelular.	12
3	Clasificación y topografía de las ectonucleotidasas.	14
4	Clasificación y estructura de los receptores purinérgicos.	16
5	Registros originales del protocolo de relajación inducida por ATP.	22
6	Registros originales del protocolo de relajación inducida por ATP para determinar la remoción del epitelio.	23
7	Respuesta bifásica (contracción y relajación) del músculo liso traqueal de cobayo inducida por la administración de ATP.	27
8	Respuesta de los anillos traqueales de cobayo a la aplicación de ATP en ausencia de epitelio y con presencia de indometacina, sobre la contracción inducida por histamina.	28
9	Respuesta de los anillos traqueales de cobayo a la aplicación de ATP, ATP $\gamma$ S, $\alpha\beta$ -metilén-ATP y UTP, sobre la contracción inducida por de histamina.	29
10	Respuesta de los anillos traqueales de cobayo a la aplicación de ATP en presencia de suramina, RB2 y la mezcla de suramina + RB2, o de la incubación con N-etilmaleimida, sobre la contracción inducida por histamina.	31
11	Respuesta de los anillos traqueales de cobayo a la aplicación de ATP en presencia de una mayor concentración de suramina o de RB2 sobre la contracción inducida por histamina.	32
12	Respuesta de los anillos traqueales de cobayo a la aplicación de ATP en presencia de ARL 67156 y de ARL con la mezcla de suramina y RB2.	32

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>13</b>	Efecto del ATP sobre las corrientes de K <sup>+</sup> , en cultivos primarios de miocitos traqueales de cobayo y registro original del efecto de la indometacina sobre las corrientes de potasio inducidas antes y después del estímulo de ATP.	33
<b>14</b>	Efecto de la suramina sobre las corrientes de K <sup>+</sup> inducidas por ATP.	34
<b>15</b>	Efecto del RB2 sobre las corrientes de K <sup>+</sup> inducidas por ATP.	35
<b>16</b>	Efecto de la combinación de suramina y RB2 sobre las corrientes de K <sup>+</sup> inducidas por ATP.	35
<b>17</b>	Participación de los canales de K <sup>+</sup> dependientes de calcio y de los canales de rectificación tardía en el efecto del ATP.	36
<b>18</b>	Participación de proteínas G y de la adenilil ciclasa en el aumento de las corrientes de potasio inducidas por la aplicación de ATP.	37
<b>19</b>	Registros originales del protocolo experimental de las curvas acumulativas de relajación inducida por ATP para evaluar la participación de los canales de K <sup>+</sup> .	38
<b>20</b>	Respuesta de los anillos traqueales de cobayo a la aplicación de ATP en presencia de 4-AP e Ibtx.	38

## Lista de Tablas

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Características farmacológicas de los receptores P2Y, donde se muestran sus principales agonistas y antagonistas.	17

## Resumen

La adenosina 5' trifosfato (ATP) funge como una molécula capaz de donar energía para que se puedan efectuar una gran variedad de procesos metabólicos. Su papel como neurotransmisor fue descrito por primera vez en 1972 y a la fecha se conocen diversos procesos fisiológicos en los cuales interviene mediante la activación de una familia de receptores llamada receptores purinérgicos.

Es bien conocido que el ATP induce relajación en el músculo liso de las vías aéreas, asociada con la producción de prostaglandinas por medio de la activación de receptores purinérgicos. En éste trabajo, se caracterizó el tipo de receptores purinérgicos que regulan la relajación inducida por el ATP en el músculo liso de las vías aéreas de cobayo. Para esto, se utilizaron anillos traqueales y miocitos, en donde se evaluó tanto la respuesta de la relajación, como el incremento de las corrientes de  $K^+$  (IK) inducido por ATP. En este contexto, se demostró adicionando ATP $\gamma$ S (análogo no hidrolizable del ATP) que es el ATP, y no sus metabolitos, él que induce la relajación del músculo liso y dicha relajación es bloqueada por indometacina. La remoción del epitelio disminuyó la relajación por ATP a concentraciones bajas, pero no la modifica a concentraciones altas.

Al usar agonistas para las dos grandes subfamilias de receptores P2 (P2X y P2Y), se obtuvo que el UTP (agonista de receptores P2Y) indujo una relajación muy parecida a la del ATP. Por el contrario  $\alpha,\beta$ -metilén-ATP (agonista de P2X), no indujo relajación hasta concentraciones muy elevadas y ésta fue muy pequeña. El uso de antagonistas de los receptores P2Y; suramina (P2Y<sub>1,2,6,11,12,13</sub>) ó reactivo azul 2 (RB2) (P2Y<sub>1,4,6,11,12,13</sub>), no modificó la relajación, pero su combinación redujo significativamente el efecto del ATP.

La relajación fue disminuida por N-etilmaleimida (NEM, desacoplador de proteínas G). El ATP indujo un IK en miocitos traqueales, el cual fue bloqueado por la indometacina, pero no fue modificado por la suramina o el RB2. Al utilizar la combinación de ambos antagonistas dicho incremento se anuló. 4-aminopiridina (bloqueador de los canales de  $K^+$  de rectificación tardía) e iberiotoxina (bloqueador de los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ ) disminuyeron el IK y su combinación disminuyó la relajación inducida por el ATP. El uso de NEM anuló el IK al igual que el inhibidor de la adenilil ciclasa, SQ 22,536.

Con estos resultados se puede concluir que el ATP induce relajación en el músculo de las vías aéreas del cobayo a través de la activación de receptores purinérgicos principalmente del tipo P2Y<sub>4</sub> y el P2Y<sub>2</sub>. La activación induce la formación de prostaglandinas probablemente del tipo E<sub>2</sub> en las células de músculo liso. Asimismo, de manera autócrina generan incrementos en los niveles de AMPc, que activa entre otros mensajeros a la PKA, la cual puede fosforilar a los canales de  $K^+$  de rectificación tardía y los dependientes de  $Ca^{2+}$ , para inducir hiperpolarización a nivel celular, y una subsecuente relajación.

## Abstract

Adenosine 5 'triphosphate (ATP) serves as a molecule capable of donating energy that can to perform a variety of metabolic processes. Its role as a neurotransmitter was first described in 1972. And at this time various physiological processes are known in which intervenes by activation of a family of receptors called purinergic receptors. At this time there are a several number of processes that involved the participation of this molecule by activation of purinergic receptors.

It is well known that ATP induces relaxation of airways smooth muscle associated with prostaglandin production through the activation of purinergic receptors. In this work, it has been characterized the type of purinergic receptors that regulate the ATP-induced relaxation in the airway smooth muscle of guinea pig. For this, tracheal rings and isolated myocytes were used to evaluate both the relaxation response and increased  $K^+$  currents (IK) induced by ATP. In this context, it was demonstrated adding ATP $\gamma$ S (a non-hydrolysable analogue of ATP) to be ATP, and not its metabolites, which induces relaxation of smooth muscle and this phenomenon is blocked by indomethacin. Epithelium removal decreased the relaxation induced by the ATP at low concentrations, but not modified at high concentrations.

In the one hand using agonists for two major subfamilies of receptor P2 (P2X and P2Y) afforded that the UTP (P2Y receptor agonist) induce a very similar relaxation to ATP. On the other hand,  $\alpha$ ,  $\beta$ -methylene-ATP (P2X agonist), did not induce relaxation till high concentrations and it was very small. The use of P2Y receptor antagonists; suramin (P2Y<sub>1</sub>, 2, 6, 11, 12, 13) or reactive blue 2 (P2Y<sub>1</sub>, 4, 6, 11, 12, 13), did not modify the relaxation, but their combination reduced significantly the ATP effect.

The relaxation was decreased by N-ethylmaleimide (NEM, an uncoupler of G proteins). The ATP induced a IK in tracheal myocytes, which was blocked by indomethacin, but was not by suramin or RB2. By using the combination of both antagonists such increase was abolished. 4-aminopyridine (a delayed rectifier  $K^+$  channel blocker) and iberiotoxin (a  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  channel blocker) reduced IK and their combination diminished the relaxation induced by ATP. The use of NEM annulled the IK like the inhibitor of adenylyl cyclase, SQ 22.536.

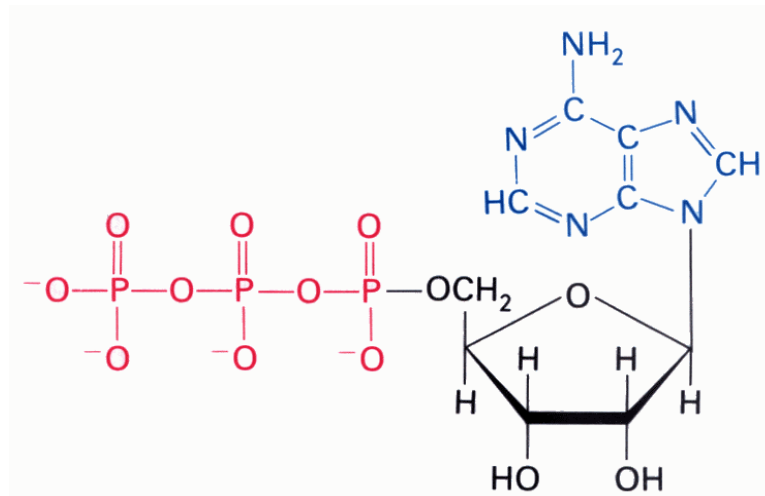
With these results it can be concluded that ATP induces relaxation in the guinea pig airways smooth muscle through mainly the activation of purinergic receptors P2Y<sub>4</sub> and P2Y<sub>2</sub>. The activation induces the formation of prostaglandin E<sub>2</sub> probably of smooth muscle cells. Also in an autocrine way generate increases in cAMP levels, which allows the activation of PKA to phosphorylate the delayed rectifier and dependent  $Ca^{2+}$  potassium channels to induce hyperpolarization, and a subsequent relaxation.



# Introducción

## La molécula de ATP

La adenosina 5' trifosfato (ATP) es un nucleótido constituido por una base nitrogenada (adenina), unida al carbono 1' de la pentosa (ribosa) y tres grupos fosfato unidos al carbono 5' de la ribosa (Fig. 1). Es el principal donador inmediato de energía en los seres vivos, siendo su hidrólisis la fuente de ella. De esta forma, participa en la regulación fisiológica de las células al acoplarse a reacciones metabólicas energéticamente desfavorables (McKee y McKee, 2009; Campbell y Farell, 2009). Así, mecanismos como el movimiento, el transporte activo, la amplificación de señales y los procesos biosintéticos ocurren debido a la participación del ATP y a que éste es sintetizado constantemente (Galindo y Flores, 2006).



**Figura 1**

*Estructura química del ATP, conformada por una base nitrogenada púrica (adenina, en azul), una pentosa (ribosa, en negro) y tres grupos fosfato (en rojo).*

En 1929, se describió que la adenosina ejercía una disminución en los latidos del corazón y en la dilatación de las arterias coronarias del perro y de otros mamíferos al ser administrada intravenosamente, sugiriendo así, el papel de éste nucleósido de purina como un mediador químico extracelular (Drury y Szent-Györgyi, 1929). Durante los años

subsecuentes, se continuaron los trabajos involucrados con compuestos púricos, observando distintos efectos no sólo en el sistema circulatorio, sino también en la musculatura estriada y la lisa, así como en el cerebro de distintos modelos animales (Burnstock, 2007).

No es hasta 1972 que Burnstock describe por primera vez a la molécula de ATP como un neurotransmisor en fibras nerviosas no adrenérgicas-no colinérgicas (Burnstock, 1972). A partir de entonces el ATP y sus metabolitos han sido descritos como potentes moléculas regulatorias en una gran variedad de tipos celulares y órganos (Fitz, 2007; Okada *et al.*, 2006).

El ATP se almacena en una amplia variedad de líneas celulares, como neuronas, plaquetas, células cebadas o células epiteliales con concentraciones entre 5 y 10 mM (Fitz, 2007). En condiciones fisiológicas puede ser liberado al espacio extracelular (Bodin y Burnstock, 2001; Dubyak, 2006; Lazarowski *et al.*, 2003, Schwartz y Malik, 1989), donde activa a receptores purinérgicos (Mounkaïla *et al.*, 2005) presentes en la membrana celular de una gran variedad de tejidos (Bodin y Burnstock, 2001).

La activación de los receptores purinérgicos puede regular distintos mecanismos fisiológicos, como la neurotransmisión excitatoria, mecanismos respiratorios, nocicepción, audición, agregación plaquetaria, contracción o relajación del músculo liso, e incluso, hasta la apoptosis (Burnstock y Williams, 2000; Burnstock, 2002).

### **Metabolismo extracelular del ATP**

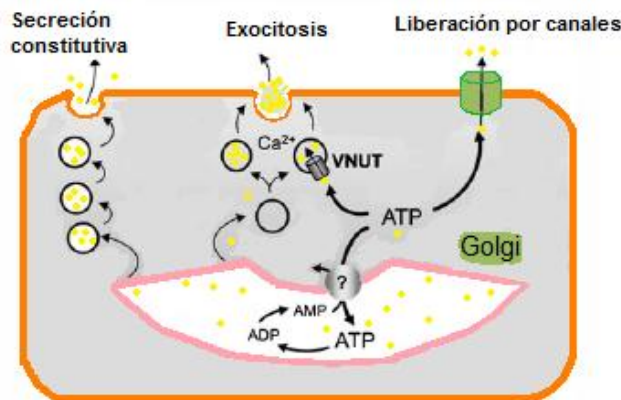
El mecanismo por el cual el ATP es transportado y liberado es aún motivo de controversia. Al menos para tejidos neuroendócrinos y plaquetas, se conoce que el ATP es almacenado en gránulos especializados y liberado por medio de exocitosis (Lazarowski, 2012).

Se conoce que los nucleótidos y otros neurotransmisores no peptídicos necesitan sistemas de transporte, llamados transportadores vesiculares, para ingresar al interior de los gránulos o vesículas de almacenamiento (Miras Portugal, 2011). Todos los transportadores vesiculares emplean el gradiente electroquímico de protones generado por una  $H^+$ -ATPasa vacuolar (V-ATPasa) para impulsar la entrada del nucleótido al interior del almacén (Miras Portugal, 2011; Lazarowski, 2012). La participación de dicha bomba en el almacenamiento del ATP en gránulos y vesículas ha sido comprobada con el uso de la bafilomicina A1, un bloqueador específico de las  $H^+$ -ATPasas (Lazarowski, 2012).

Actualmente, se conocen varios mecanismos de transporte que participan en la liberación de ATP al medio extracelular. La liberación de ATP por exocitosis en tejidos neuroendócrinos, neuronas excitatorias y en plaquetas es bien conocido (Lazarowski, 2012). En éstas células, el ATP, la serotonina o algunas catecolaminas pueden ser almacenadas en conjunto dentro de gránulos cromafines, que después de recibir un estímulo

migran a la membrana plasmática a través de la red de filamentos del citoesqueleto, donde al fusionarse con ella liberan su contenido al espacio extracelular con dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este fenómeno, ha sido demostrado al usar agentes quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$ , venenos que afectan la estructura del citoesqueleto como citocalasinas e inhibidores del funcionamiento del aparato de Golgi como la brefeldina A (Lazarowski, 2012). Las células cebadas, epiteliales, acinares pancreáticas, entre otras, también muestran liberación del ATP regulada por exocitosis (Lazarowski, 2012). Han sido propuestos algunos otros modelos de transporte (Fig. 2), incluyendo transporte activo, canales aniónicos dependientes de voltaje y la liberación constitutiva para otro tipo de células (Bodin y Burnstock, 2001; Dowe *et al.*, 1970; Sabirov y Okada, 2005; Schwiebert *et al.*, 2003; Spray *et al.*, 2006). Este último modelo se evidencia por el hecho de que la liberación de los nucleótidos en varias líneas celulares persiste aún con la adición de bafilomicina A1 y otros compuestos que interrumpen el tráfico vesicular (Lazarowski, 2012).

Así pues, en cardiomiocitos, astrocitos y en la mácula densa del riñón se han identificado canales aniónicos de larga conductancia que conducen ATP, los cuales forman un poro amplio de  $\sim 1.3$  nm permitiendo el paso de aniones orgánicos pequeños como el glutamato, ATP y UTP. Se conoce que estos canales aniónicos son activados por isquemia y por hinchamiento celular dado por las condiciones osmóticas (turgencia). Su participación ha sido demostrada por el uso de bloqueadores de canales aniónicos como el DIDS, SITS, NPPB y DPC (Lazarowski, 2012).



**Figura 2**

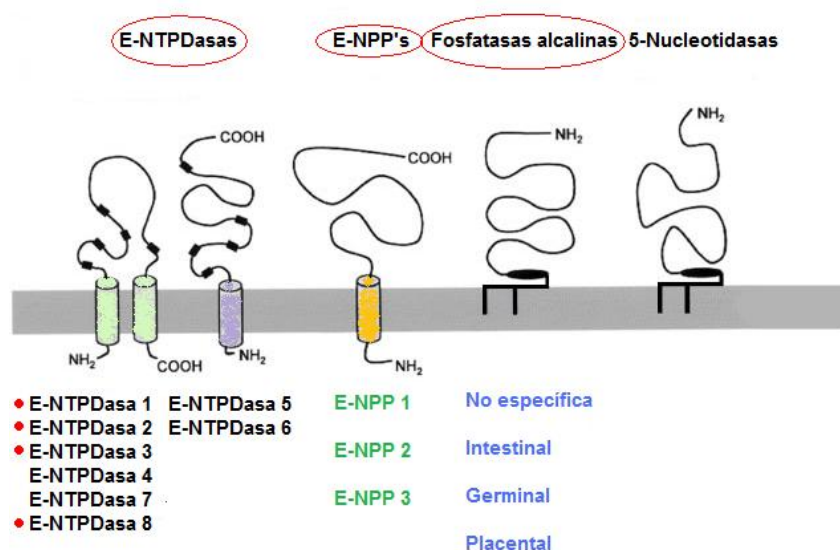
*Vías potenciales para la liberación del ATP al espacio extracelular. Además de la conocida exocitosis dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y los canales aniónicos, las conexinas y panexinas son proteínas que pueden conjuntarse para formar hemicanales y enviar ATP al medio extracelular. Nucleótidos dentro del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi que sirven como donadores energéticos, son liberados como moléculas residuales a través de una vía de secreción constitutiva. Tomado y modificado de Lazarowski, 2012.*

Otro tipo de canales aniónicos que intervienen en la liberación de ATP son los regulados por volumen (VRAC), los cuales permiten el paso de aminoácidos y ATP. Los VRAC se activan por turgencia y han sido estudiados en células endoteliales aórticas, donde su bloqueo inhibe la liberación de ATP, y son sensibles a fármacos como el tamoxifén, la fluoxetina, el ácido niflúmico entre otros bloqueadores de canales aniónicos (Lazarowski, 2012).

Las conexinas, proteínas que constituyen las uniones en hendidura o uniones GAP intercelulares pueden formar conexones, que a su vez constituyen la formación de hemicanales que permiten la liberación del ATP, siendo reguladas por una baja en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelulares. La supresión en la expresión de ciertas conexinas ha mostrado una disminución en la liberación de ATP en varios tipos celulares, como en las células endoteliales glomerulares. Las panexinas 1 y 3 que presentan un comportamiento parecido al de las conexinas también tienen una participación en la liberación de ATP aunque al parecer no dependen de las concentraciones extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (Lazarowski, 2012).

Por último, el receptor  $\text{P2X}_7$  puede formar un poro lo suficientemente grande para permitir la liberación del ATP y de otras moléculas de hasta 900 Da, pero dado que se necesitan altas concentraciones de ATP para la activación del receptor, se desconoce actualmente cual sería su mecanismo de regulación y el propósito de éste (Lazarowski, 2012).

Existe un grupo de proteínas con función enzimática llamadas ectonucleotidasas, que hidrolizan al ATP y a otros nucleótidos extracelulares en sus respectivos nucleósidos (Robson *et al.*, 2006). En la actualidad, las ectonucleotidasas son clasificadas en cuatro grupos (Fig. 3): las ectonucleotidasas trifosfato difosfohidrolasas (E-NTPDasas), las fosfatasas alcalinas, las ectonucleotidasas pirofosfatasas fosfodiesterasas (E-NPPs) y las 5-nucleotidasas (Kukulski *et al.*, 2011). Todas estas familias con excepción de las 5-nucleotidasas hidrolizan al ATP extracelular (Millan, 2006).



**Figura 3**

*Clasificación y topografía de las ectonucleotidasas. De los cuatro grupos actuales, sólo las E-NTPDasas, las E-NPP's y las fosfatasas alcalinas pueden degradar a la molécula de ATP. Dentro de las E-NTPDasas, las señaladas con un punto rojo son las que se encuentran en la membrana celular del lado extracelular (Millan, 2006). Tomada y modificada de Burnstock, 2007.*

Las E-NTPDasas quitan al fosfato terminal de los dinucleótidos y trinucleótidos. Las E-NPPs retiran los fosfatos  $\beta$  y  $\gamma$ . Las 5'-nucleotidasas remueven el último grupo fosfato restante dejando sólo a los nucleósidos, los cuales son recapturados por las células a través de transportadores específicos, sirviendo de sustrato para la síntesis de nuevos nucleótidos (Todorov *et al.*, 1997; Kirley, 1997; Zimmermann, 1996).

Existen ocho diferentes genes que codifican a ocho miembros de la familia de la E-NTPDasas, cuatro de ellas, las E-NTPDasas 1, 2, 3, y 8, tienen sus sitios catalíticos localizados extracelularmente, teniendo afinidad por ATP y ADP, mientras que las cuatro restantes, las E-NTPDasas 4, 5, 6 y 7, tienen sus sitios catalíticos intracelulares, teniendo afinidad por cualquier otra base nitrogenada (Robson *et al.*, 2006). Las E-NPPs 1, 2 y 3, tienen sus sitios catalíticos hacia el medio extracelular, así como una mayor afinidad por ATP y otros nucleótidos (Burnstock, 2007).

Por otra parte, existen cuatro isoenzimas reconocidas como fosfatasas alcalinas: la intestinal, la no específica de tejido, la placentar y la germinal (Millan, 2006).

## Receptores purinérgicos o purinorreceptores

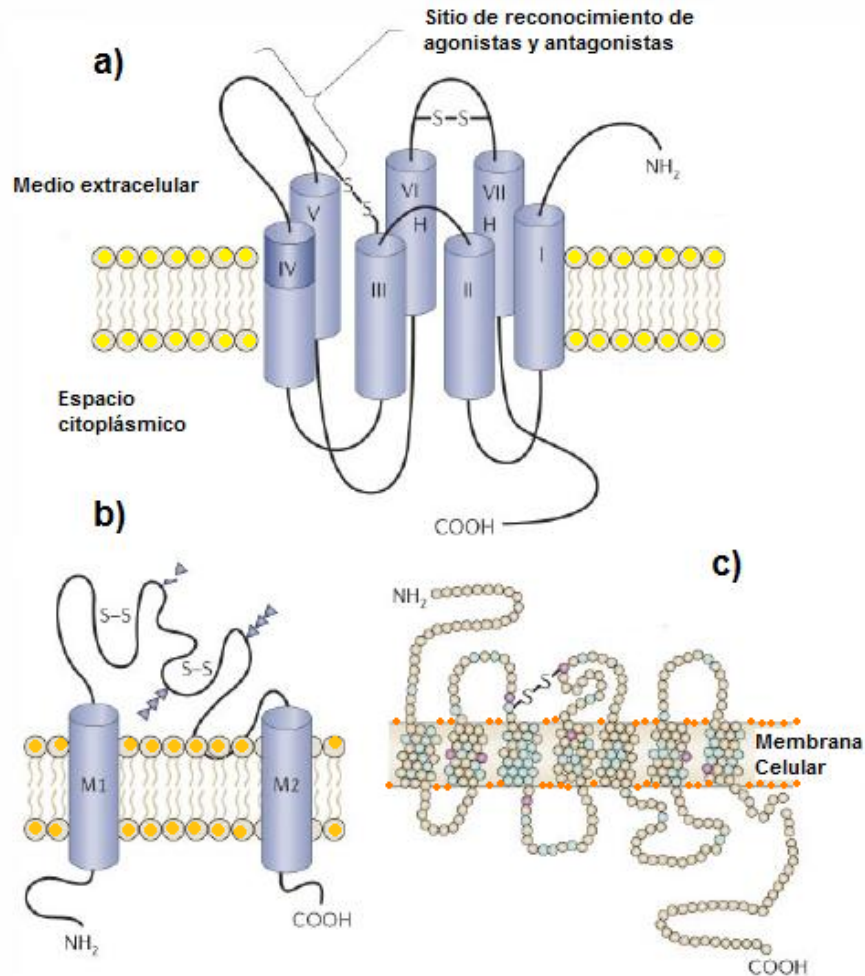
En la actualidad, los receptores purinérgicos son clasificados en dos tipos: los P1 y los P2 (Fig. 4). Los P1 son receptores acoplados a proteínas G activados por la adenosina principalmente (Piper y Hollingsworth, 1996). Hasta la fecha, se conocen cuatro tipos de receptores P1 los cuales son  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ . El receptor  $A_1$  está acoplado a las proteínas G inhibitorias,  $G_i$  y  $G_o$  (Freissmuth *et al.*, 1991). El receptor  $A_3$  también se encuentra acoplado a una proteína  $G_i$ . Por otra parte, los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  activan a proteínas G productoras de AMPc ( $G_s$ ) (Palmer *et al.*, 1995) y son antagonizados por bajas concentraciones de metilxantinas (Klinger *et al.*, 2002).

Por otro lado, dentro de la familia de los receptores P2 que son más afines por la molécula de ATP que la familia de los receptores P1, se encuentra la subfamilia P2X que es ionotrópica, es decir, son canales catiónicos inespecíficos o canales con compuerta de ligando en la membrana plasmática (Burnstock, 2006; Ralevic y Burnstock, 1998) que son activados sólo por el ATP extracelular. La apertura del canal permite el flujo de cationes tales como el  $Ca^{2+}$ , el  $Na^+$  y el  $K^+$  (North y Surprenant, 2000; Chizh e Illes, 2001), y la regulación del canal es sensible al  $Ca^{2+}$  extracelular, el  $Mg^{2+}$ , a los  $H^+$  ó a los iones metálicos tales como:  $Zn^{2+}$  y/o  $Cu^{2+}$  (North, 2002). Actualmente se conocen siete subtipos de receptores P2X ( $P2X_{1-7}$ ), que están distribuidos ampliamente en los tejidos y se cree que juegan un papel importante en diversas funciones fisiológicas como: la transmisión neuronal central y periférica, la agregación plaquetaria y la inflamación. En el músculo liso de las vías aéreas de cobayo, el incremento de calcio inducido por los receptores  $P2X_1$  y  $P2X_3$ , favorece el incremento en la concentración de calcio dentro del retículo sarcoplásmico, facilitando así la disponibilidad del  $Ca^{2+}$  cuando un agente broncoconstrictor actúa en dicho tejido por medio de la producción de  $IP_3$  (Flores-Soto *et al.*, 2011).

Existe otra familia de los receptores P2 que se denomina como P2Y, los cuales son receptores metabotrópicos, es decir, están acoplados a proteínas G (North y Barnard, 1997). Los receptores P2Y presentan siete dominios transmembranales con el amino terminal localizado en el medio extracelular, y el grupo carboxilo, en la porción intracelular. Los sitios en donde el ATP se une al receptor han sido identificados en el sexto y séptimo dominio transmembranal de la molécula (Von Kügelgen y Wetter, 2000). La activación farmacológica para esta subfamilia está bien documentada, variando de acuerdo al subtipo de receptor P2Y (Burnstock, 2006), (Tabla 1).

La familia de los receptores P2Y consta de ocho subtipos humanos ( $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$ ,  $P2Y_4$ ,  $P2Y_6$ ,  $P2Y_{11}$ ,  $P2Y_{12}$ ,  $P2Y_{13}$  y  $P2Y_{14}$ ) que están clonados, funcionalmente definidos y encontrados en muchos vertebrados. Los receptores  $P2Y_{1, 2, 4, 6}$  y  $11$  generan la activación de la fosfolipasa  $C\beta$ . El receptor  $P2Y_{11}$  también estimula la producción de adenilil ciclasa. Por otra parte, la activación de los receptores  $P2Y_{12, 13}$  y  $14$  causa la inhibición de la actividad de la adenilil ciclasa (von Kügelgen, 2006).

La expresión del receptor P2Y<sub>1</sub> es extensa: ha sido detectada en varias especies de mamíferos incluyendo el humano, demostrándose su actividad en una gran cantidad de tejidos incluyendo el músculo liso, endotelio y tejido neuronal (Ralevic y Burnstock, 1998). Estos receptores están involucrados en la agregación plaquetaria y neuromodulación (Fabre *et al.*, 1999; León *et al.*, 1996).



**Figura 4**

*Clasificación y estructura de los receptores purinérgicos. a) Receptores del tipo P1 que tienen como ligando principal a la adenosina y se encuentran acoplados a proteínas G. b) Subunidad del receptor P2X, un receptor del tipo canal iónico inespecífico. c) Receptores P2Y que se caracterizan por su acoplamiento a proteínas G, presentan al grupo amino extracelular mientras que su carboxilo es intracelular.*

El receptor P2Y<sub>2</sub> está distribuido en varios tejidos y se encuentra expresado en gran medida en células pulmonares, corazón, músculo esquelético, bazo, riñones e hígado (Lustig *et al.*, 1993; Parr *et al.*, 1994), así como también en el músculo liso de las vías aéreas (MLVA) (Montaño *et al.*, 2011). Estudios en ratones mutados del receptor P2Y<sub>2</sub> demostraron la importancia de estos receptores en la regulación del transporte de iones cloro en el epitelio del MLVA (Creelman *et al.*, 1999). Este receptor es activado por ATP, UTP y sus análogos no hidrolizables (son requeridos los 3 grupos fosfato para la activación de este receptor) y es antagonizado competitivamente por la suramina, pero no por el RB2 ni por el PPADS (Nicholas *et al.*, 1996, Wildman *et al.*, 2003).

Características farmacológicas de los receptores purinérgicos P2Y		
Receptor P2Y	Agonistas	Antagonistas
P2Y <sub>1</sub>	2-metiltioADP > 2-metiltioATP = ADP > ATP, MRS2365	Suramina, RB2, MRS2179, MRS2500
P2Y <sub>2</sub>	UTP = ATP, UTP $\gamma$ S, INS37217	Suramina > RB2, ARC126313
P2Y <sub>4</sub>	UTP $\geq$ ATP, UTP $\gamma$ S	RB2 > Suramina
P2Y <sub>6</sub>	UDP > UTP >> ATP, UDP $\beta$ S	Suramina, MRS2578
P2Y <sub>11</sub>	ARC67085 > BzATP $\geq$ ATP $\gamma$ S > ATP	Suramina > RB2, NF157
P2Y <sub>12</sub>	2-metiltioADP $\geq$ ADP >> ATP	CT50547, AR-C69931MX
P2Y <sub>13</sub>	ADP = 2-metiltioADP >> ATP y 2-metiltioATP	MRS2211
P2Y <sub>14</sub>	UDP-glucosa = UDP-galactosa	-

**Tabla 1**

*Características farmacológicas de los receptores P2Y, mostrando los principales agonistas y antagonistas conocidos para esta subfamilia de receptores. Tomado y modificado de Burnstock, 2006; von Kügelgen y Wetter, 2000.*



Los receptores P2Y<sub>4</sub> tienen una distribución restringida; estos receptores son expresados en placenta y en niveles muy bajos en el músculo liso vascular. Recientemente se encontró que el receptor P2Y<sub>4</sub> en MLVA de cobayo es el principal receptor P2Y expresado en este tejido (Montaño *et al.*, 2011). Este receptor tiene mayor preferencia al UTP que al ATP (Nicholas *et al.*, 1996), y es antagonizado por el RB2 y en menor proporción por el PPADS dependiendo de la especie a estudiar (Wildman *et al.*, 2003). Una de las características farmacológicas más importantes de este receptor es que la suramina no lo antagoniza como lo hace con el receptor P2Y<sub>2</sub> (Ralevic y Burnstock, 1998).

El receptor P2Y<sub>6</sub> se encuentra en el corazón, los vasos sanguíneos y el cerebro, tiene mayor afinidad al UDP el cual es ~100 veces más potente que el UTP (Nicholas *et al.*, 1996). Este receptor es antagonizado selectivamente por el MRS2567 sin mostrar efecto sobre los receptores P2Y<sub>1, 2, 4</sub> y <sub>11</sub> (Mamedova, 2004). También es antagonizado por la suramina y el RB2 aunque con menor selectividad (von Kügelgen y Wetter, 2000).

Los receptores P2Y<sub>11</sub> están altamente expresados en células hematopoyéticas y desempeñan un papel importante en la diferenciación celular (Communi *et al.*, 1997). Este receptor es activado por el ATP y su análogo el ARC67085, es antagonizado por el RB2 y la suramina, pero no por el PPADS (Communi *et al.*, 1999).

El receptor P2Y<sub>12</sub> ha sido descrito en plaquetas y tejidos neuronales, participando de forma muy importante en la agregación plaquetaria (Kubista *et al.*, 2003). La activación de los receptores P2Y<sub>12</sub> contribuye a la vasoconstricción en humanos. Tal activación puede realizarse por el ADP y por el 2-metil-tio-ADP. Por otro lado, los receptores P2Y<sub>12</sub> son antagonizados por el AR-C69931MX ó Cangrelor, los cuales se utilizan en el tratamiento farmacológico para inhibir la agregación plaquetaria (Kubista *et al.*, 2003).

Los receptores P2Y<sub>13</sub> están expresados en células de médula ósea, de bazo, de nódulos linfáticos y de neuronas, se activan por ADP y 2-metil-tio-ADP y son antagonizados selectivamente por MRS2211 (Burnstock, 2007). Por último, el receptor P2Y<sub>14</sub> está altamente distribuido en placenta, tejido adiposo, estómago, e intestino humano (Burnstock, 2007). En rata este receptor es altamente expresado en células hematopoyéticas y es activado por UDP-glucosa a concentraciones nanomolares. Aún no se conocen antagonistas que ejerzan un efecto en el receptor P2Y<sub>14</sub> (Chambers *et al.*, 2000).

## **Receptores acoplados a proteínas G que regulan la relajación en el MLVA**

Los receptores acoplados a una proteína Gs en el músculo liso de las vías aéreas, son activados por sustancias endógenas como las catecolaminas, las prostaglandinas, los isoprostanos, la adenosina y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) entre otros (Billington y Penn, 2003).

La subunidad  $\alpha$  de la proteína G activa a la adenilil ciclasa (AC) de la que se conocen nueve isoformas. Esta enzima cataliza la formación del AMPc a partir del ATP citosólico. El AMPc tiene como una de sus funciones principales el activar a la proteína cinasa A (PKA), complejo con dos subunidades regulatorias y dos subunidades catalíticas. La PKA regula las fosforilaciones de muchas proteínas intracelulares que tienen varios efectos en el MLVA. Por ejemplo, fosforila a ciertos receptores acoplados a proteínas Gq así como a la fosfolipasa C $\beta$  (PLC $\beta$ ), de éste modo se inhibe la formación de fosfoinosítidos como el IP $_3$  y en consecuencia la salida de Ca $^{2+}$  del retículo sarcoplásmico. PKA también puede fosforilar al receptor de IP $_3$  reduciendo su afinidad por éste, limitando así la movilización de Ca $^{2+}$ . Por otra parte, PKA puede fosforilar a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) disminuyendo su afinidad por el complejo Ca $^{2+}$ -calmodulina, reduciendo por consiguiente la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC).

Además, también puede fosforilar a los canales de K $^{+}$  dependientes de Ca $^{2+}$ , aumentando su probabilidad de apertura. El K $^{+}$  saliente promueve así la hiperpolarización de la membrana celular impidiendo la entrada de Ca $^{2+}$  al medio intracelular por medio de los canales dependientes de voltaje (Billington y Penn, 2003).

## **Fisiología del ATP en el MLVA**

Los receptores purinérgicos del tipo P2 se encuentran expresados en el MLVA, donde existen antecedentes que la adición de ATP induce una respuesta bifásica (contracción y relajación) y que es dependiente de la concentración (Mounkaïla *et al.*, 2005). En éste trabajo realizado en músculo liso bronquial de rata y humano, se propuso que la respuesta de relajación inducida por el ATP no es debida a su degradación a otros metabolitos, pero que puede ser atribuida, al menos parcialmente, a la desensibilización del receptor P2X impidiendo así la unión con su agonista y se sugiere también la posible participación de los receptores P2Y (Mounkaïla *et al.*, 2005). Sin embargo, existen numerosos trabajos donde demuestran que la relajación producida por el ATP en el músculo liso traqueal es activa, es decir, relaja la contracción inducida por acetilcolina o histamina y dicha relajación es bloqueada por la indometacina, un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas (Kamikawa y Shimo, 1976; Aksoy y Kelsen, 1994).

La relajación producida por el ATP en músculo liso traqueal de conejo se encuentra mediada a través de un receptor P2 localizado en el epitelio (Aksoy y Kelsen, 1994). Asimismo, en anillos traqueales de cobayo, se ha demostrado que el ATP induce la producción de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), responsable final del efecto de la relajación producida por el ATP (Kamikawa y Shimo, 1976). Estos hallazgos fueron corroborados en ratones transgénicos deficientes en la expresión del receptor para la PGE<sub>2</sub>, el EP2 [EP2(-/-)], donde encontraron que el ATP en estos animales no producía relajación (Tilley *et al.*, 2003). La PGE<sub>2</sub> estimula la producción de AMPc vía una proteína Gs activando a la PKA (Tilley *et al.*, 2003) la cual es la responsable de activar a los canales de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup> para producir la relajación (Mazzuco *et al.*, 2000).

El MLVA contiene una alta densidad de canales de K<sup>+</sup> de varios tipos que principalmente regulan el potencial de la membrana y la excitabilidad, es decir, inducen hiperpolarización y relajación (Nielsen-Kudsk, 1996; Snetkov *et al.*, 1996; Snetkov y Ward, 1999; Zhang y Paterson, 2005). Los canales de K<sup>+</sup> más importantes en este tejido son: a) Los canales de K<sup>+</sup> de rectificación tardía (Kv) (Zhao *et al.*, 2004), regulados por voltaje ya que son activados por despolarización y los canales de K<sup>+</sup> rectificadores entrantes (Oonuma *et al.*, 2002), regulados por voltaje y activados por hiperpolarización (Nielsen-Kudsk, 1996; Pelaia *et al.*, 2002); b) Los canales de K<sup>+</sup> sensibles a ATP (K<sub>ATP</sub>) y c) Los canales de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup> de alta conductancia (Maxi K o BK<sub>Ca</sub>). Estos últimos son los más importantes en el músculo liso de la vía aérea del humano, y son dependientes de voltaje, de Ca<sup>2+</sup> intracelular y son bloqueados por la iberiotoxina, caribdotoxina, y bajas concentraciones de tetraetilamonio (Snetkov *et al.*, 1996). Por lo tanto, es muy probable que durante la respuesta bifásica inducida por el ATP en el músculo liso de la vía aérea exista la participación de los canales de K<sup>+</sup> que podrían favorecer la relajación (Zhang y Paterson, 2005).

## Planteamiento del problema

Con base en los antecedentes, y dado que se conoce poco acerca del papel fisiológico del ATP, es importante conocer los receptores y la vía de señalización que activa el nucleótido en el músculo liso traqueal del cobayo, para comprender fisiológicamente cómo es que el ATP induce el efecto de relajación en éste tejido.

## Hipótesis

El ATP produce relajación vía receptores P2Y localizados en el MLVA y no en el epitelio, a través de la producción de PGE<sub>2</sub> que a su vez activa canales de BK<sub>Ca</sub> y Kv por medio de AMPc.

## Objetivo general

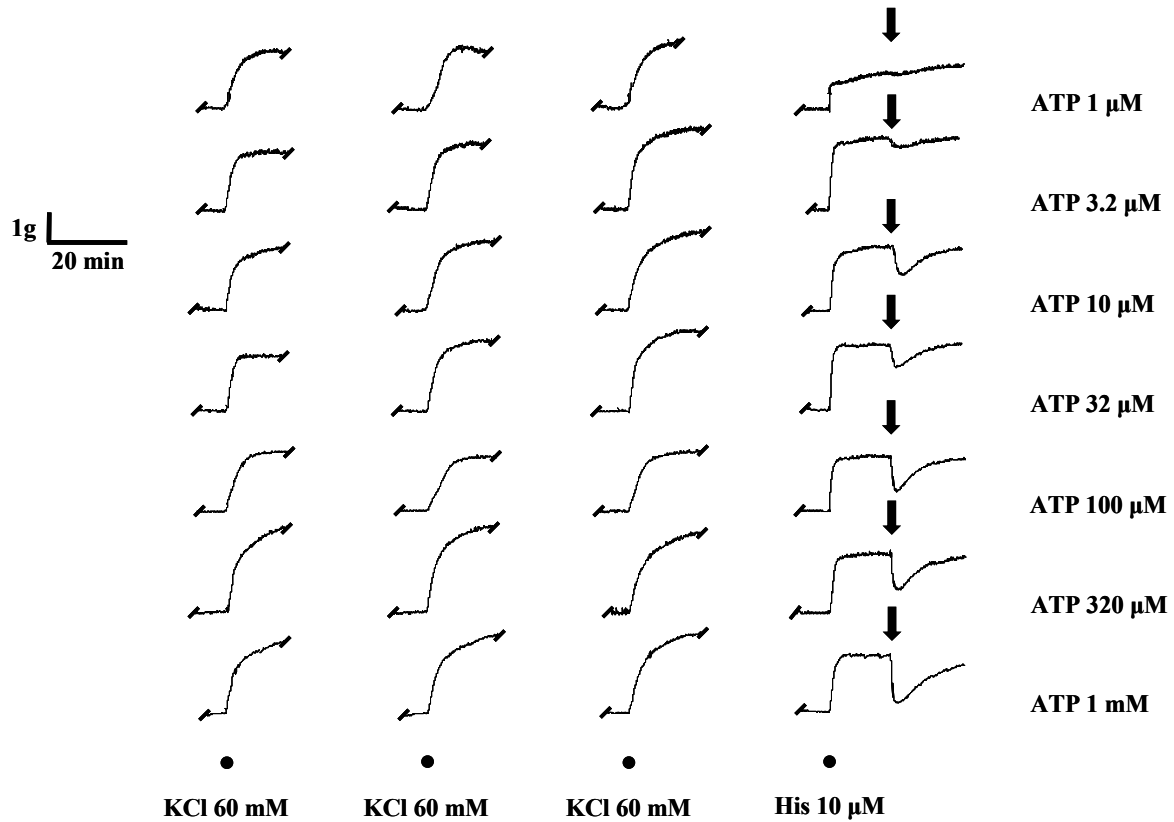
Caracterizar farmacológicamente los tipos de receptores purinérgicos que inducen una respuesta de relajación en el músculo liso traqueal de cobayo, así como también su posible mecanismo de señalización.

## Material y métodos

### 1. Órganos aislados

Se sacrificaron cobayos de la cepa Hartley, machos de 300-400 g, de los que se extrajo la tráquea y se colocó en una cámara de disección que contenía solución de Krebs-Ringer con la siguiente composición: NaCl 118 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, glucosa 11 mM, KCl 4.6 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM. La solución fue burbujeada con una mezcla de carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>) manteniendo un pH estable en intervalos fisiológicos (7.3-7.4). La tráquea fue seccionada en ocho segmentos cada uno con cuatro anillos de cartílago que se colgaron en distintas cámaras a una tensión de 1g, hasta que fueron totalmente estables después de 30 min. La tensión isométrica fue registrada con un transductor de tensión modelo FT03, (Grass Instruments, West Warwick, RI, USA) conectado a un sistema integrador de señales CyberAmp 380, (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) además de una interfase Digidata 1440A, (Axon Instruments). Para obtener los datos y registros de la contracción del músculo liso traqueal de cobayo se utilizó una computadora con el software AxoScope versión 10.2, (Axon Instruments, Foster City, CA, USA).

Con el propósito de normalizar las respuestas de los tejidos, éstos se estimularon tres veces con 60 mM de cloruro de potasio (KCl) durante 20 min o hasta alcanzar la respuesta máxima de contracción. Posteriormente, se siguió con el protocolo experimental señalado (Fig. 5).



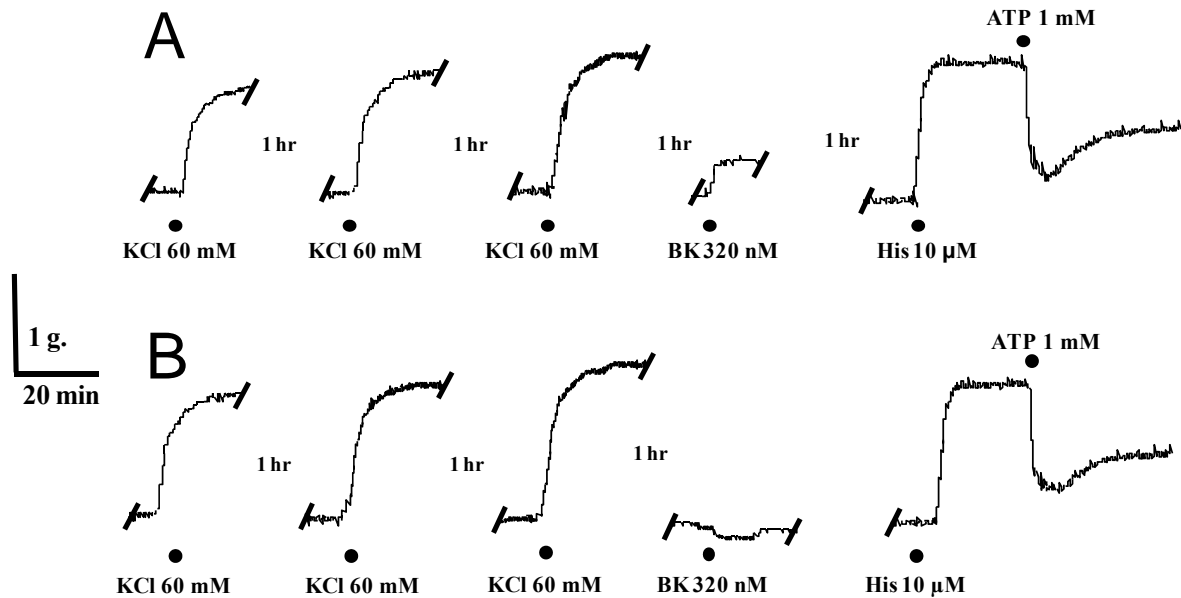
**Figura 5**

*Registros originales del protocolo de relajación inducida por ATP. Después de tres estimulaciones con KCl (60 mM) y sus respectivos lavados, se administró histamina (10  $\mu$ M) para provocar una contracción sostenida. En la meseta de esta contracción, se adicionó ATP con una concentración diferente para cada anillo traqueal, observando distintos porcentajes de relajación.*

Para verificar farmacológicamente la remoción completa del epitelio y evaluar con ello su participación en la relajación inducida por ATP, se adicionó bradicinina (BK, 320 nM), antes de la administración de histamina (Fig. 6), ya que algunos estudios *in vitro* han reportado que la BK (1 nM - 1  $\mu$ M) puede inducir relajación en preparaciones (tiras o anillos completos) con epitelio obtenidos de la tráquea de cobayo. Por el contrario, cuando se retira totalmente el epitelio, la BK induce contracción (Bramley *et al.*, 1990).

Para evaluar el efecto de relajación que inducían el ATP $\gamma$ S, el  $\alpha,\beta$ -metilén ATP y el UTP, éstos fueron adicionados después de la contracción inducida con histamina 10  $\mu$ M a diferentes preparaciones (Fig. 5) en lugar del ATP. Otros tejidos fueron incubados previamente con suramina (100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M), RB2 (100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M) y una combinación de suramina 100  $\mu$ M y RB2 100  $\mu$ M, donde el ARL 67156 (100 $\mu$ M) en un

caso especial, era adicionado 5 min antes de los antagonistas y por otra parte en el grupo experimental del NEM (30  $\mu$ M), este desacoplador se incubó por 15 min antes de la curva concentración respuesta no acumulativa hecha para el ATP (Fig. 5).



**Figura 6**

*Registros originales del protocolo de relajación inducida por ATP para determinar si el epitelio ha sido retirado completamente de los anillos. Después de tres estimulaciones con KCl (60 mM) y sus respectivos lavados, se administró BK 320 nM en anillos controles con epitelio y en anillos con el epitelio removido. En el panel A) se observa que en anillos con el epitelio removido, la BK induce una pequeña contracción en el músculo liso traqueal de cobayo. Por otra parte en el panel B), la BK induce relajación en los anillos controles que presentan el epitelio intacto. Posteriormente, a ambos grupos se les administró histamina (10  $\mu$ M) para provocar una contracción sostenida y en la meseta de ésta contracción, se adicionó ATP observando el mismo efecto de relajación al menos para la concentración más elevada (1 mM) (Ver protocolo en la Fig. 5).*

En un grupo de tejidos, la indometacina (1  $\mu$ M) fue adicionada durante todo el protocolo experimental, para evaluar la posible participación de la PGE<sub>2</sub>, en la relajación inducida por el ATP.

Para evaluar el papel de los canales de K<sup>+</sup> en la relajación, otro grupo de tejidos fueron incubados con 4-aminopiridina (4-AP, 3 mM) e iberiotoxina (Ibtx, 320 nM), elaborando

una curva acumulativa concentración respuesta para ATP, la cual será explicada más adelante en este trabajo.

## **2. Técnica de fijación de membranas**

Se sacrificaron cobayos de la cepa Hartley, machos de 300-400 g, de los que se extrajo la tráquea y se colocó en una cámara de disección que contenía solución de Krebs-Ringer con al siguiente composición: NaCl 118 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, glucosa 11 mM, KCl 4.6 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM. Con un microscopio estereoscópico se disecó el músculo liso removiendo el tejido conjuntivo y vasos sanguíneos. Una vez obtenido el músculo liso se incubó con 5 ml de solución de Hanks (Gibco) que contenía 0.5 unidades de papaína (56 mg/ml, Worthington) y 2 mg de L-Cisteína (Sigma) durante 10 minutos a 37°C para comenzar con la disgregación. Después, el tejido se lavó con solución de Leibovitz (L15, Gibco) para remover el exceso de enzima y enseguida se incubó en 5 ml de solución de Hanks a la que se le añadieron 5 mg/ml de colagenasa tipo 1 y 20 mg/ml de dispasa II (proteasa neutra) durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente, se comenzó la disociación mecánica del tejido con una pipeta Pasteur (a la cual previamente se le quitó el filo mediante calor) aspirando y soltando el tejido a través de la pipeta hacia las paredes del tubo: este procedimiento se realizó unas 25 veces. Después de esto se volvió a incubar nuevamente con la solución que contiene la mezcla de colagenasa-dispasa por otros 5 minutos, y se realizó el mismo procedimiento mecánico para la disgregación. Posteriormente, se detuvo la actividad de la enzima añadiendo solución L15 a la muestra, la cual y se centrifugó a 650 rpm durante 5 min a 22°C. Se desechó el sobrenadante. Una vez que se obtuvo el botón que contiene a las células, se le agregó más solución L15 para retirar todos los residuos de enzimas que pudieron quedar y se centrifugó nuevamente. Por último se retiró una vez más el sobrenadante. Las células obtenidas se colocaron en 6 ml de medio de cultivo (MEM, Gibco) para posteriormente sembrarlas en cajas multipozos (Falcon Becton Dickinson) colocando 1 ml de medio por pozo, (aprox. 6 pozos), a los cuales previamente se les colocó en el fondo un cubreobjetos impregnado con colágena de rata.

Los pozos se colocaron en una atmósfera humidificada (incubadora de CO<sub>2</sub> al 5 %) a 37° C durante un periodo de 48 horas para posteriormente registrar mediante la técnica de fijación de voltaje la actividad eléctrica de las células.

## **Registros de la actividad eléctrica en célula completa**

Las células de músculo liso de cobayo cultivadas fueron registradas mediante la técnica electrofisiológica de fijación de membranas en la configuración de fijación del voltaje de membrana, como se describe a continuación:

Las células fueron trasladadas a una cámara de registro, la cual fue constantemente bañada con un volumen de 0.5-1.0 ml de solución externa para la medición de corrientes de  $K^+$  (a una velocidad de perfusión de 1.5 ml/min aproximadamente) con la siguiente composición: KCl 5mM;  $KH_2PO_4$  1.2 mM;  $CaCl_2$  1.8 mM;  $NaHCO_3$  3 mM; NaCl 130 mM;  $MgCl_2$  0.5 mM; glucosa 10 mM; HEPES 10 mM; ácido níflúmico 0.1 mM. La solución fue ajustada a un pH  $\sim$ 7.4 con NaOH a temperatura ambiente, con una osmolaridad de 300 mOsm/l. Dicha cámara de registro esta adaptada sobre la base del objetivo de un microscopio de luz invertida (Zeiss modelo IP03).

Los microelectrodos que se utilizaron para el registro de fijación de membrana fueron fabricados con capilares de borosilicato, utilizando para ello un estirador de pipetas (Brown/Flaming modelo P-87 de Sutter Instruments). La resistencia de los electrodos se encontraba entre 3-8  $M\Omega$ .

La capacitancia de la punta antes y después del acceso a la célula fue compensada, aplicando pulsos cuadrados despolarizantes por parte de un amplificador Axopatch (modelo 200A, Axon Instruments). Para asegurar que una célula fuera isopotencial durante el procedimiento de fijación de voltaje, fueron excluidos los registros cuyos valores de capacitancia sobrepasaban los 80 pF, utilizando el intervalo entre 30 y 50 pF como criterio de inclusión. Se realizaron mediciones de corrientes de  $K^+$  utilizando los filtros del amplificador de 1 a 5 kHz con una frecuencia de digitalización de 2-5 kHz.

La solución de la pipeta de registro (solución interna, contaba con las siguientes concentraciones: gluconato de potasio 140 mM; NaCl 5 mM; ATP-Na 5 mM; HEPES 5 mM; EGTA 10 mM; guanosín-5' trifosfato (GTP) 0.1 mM; La solución fue ajustada a un pH  $\sim$ 7.3 con KOH, y presentó una osmolaridad de 270 mOsm/l.

## **Protocolo de medición de las corrientes de $K^+$**

Las corrientes totales de  $K^+$  se registraron mediante su activación con varios protocolos de estimulación que se han colocado previamente en el programa de pClamp (versión 10.0), los cuales consistieron en pasos con pulsos despolarizantes con potenciales de -60 a +50 mV durante 500 ms, a 1 Hz en incrementos de 10 mV con un potencial de fijación de la membrana a -60 mV. Este protocolo de voltaje evoca corrientes salientes estables y reproducibles. Estas corrientes fueron abolidas por 10 mM de tetraetilamonio (TEA), con lo que se corroboró que son corrientes totales de  $K^+$ . Los registros fueron digitalizados y



almacenados para su análisis subsecuente, utilizando para ello una interfase (Digidata 1200, Axon Instruments) y el programa de análisis y estímulo pClamp versión 10.0.

Una vez que se obtuvo un registro basal de las corrientes de  $K^+$ , que funge como protocolo control, se elaboró una curva concentración respuesta con ATP (1, 10, 100 y 1000  $\mu$ M), cuantificándose los cambios en las corrientes de  $K^+$ . Algunos miocitos fueron perfundidos con indometacina (1  $\mu$ M), y estimulados con 1 mM de ATP, con el que se obtuvo una respuesta máxima.

Otras células fueron incubadas 10 min antes de estimular con ATP (1 mM) con suramina (100  $\mu$ M), RB2 (100  $\mu$ M), o la combinación de suramina + RB2, SQ 22536 (100  $\mu$ M) y NEM (30  $\mu$ M).

Para evaluar la participación de los canales de  $K^+$  ( $BK_{Ca}$ ) y ( $K_v$ ), se tomó un registro basal de corrientes de  $K^+$ . Los  $K_v$  fueron bloqueados con 4-AP (3 mM), entonces el efecto del ATP se evaluó adicionando 1 mM y finalmente para evaluar la participación de los  $BK_{Ca}$ , se adicionó Ibtx (100 nM). Después de cada tratamiento, se registraron las corrientes de  $K^+$ . Para evaluar la participación de los  $K_v$ , el protocolo anterior se repitió en otra serie de experimentos pero la Ibtx fue adicionada primero.

### **3. Fármacos**

Todos los reactivos que se utilizaron fueron obtenidos de Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO), a excepción de la 4-aminopiridina, que se obtuvo de Research Chemicals LTD (Ward Hill, MA), y se enlistan a continuación:

La sal disódica de Adenosina 5' trifosfato, la sal de tetralitio de Adenosina 5'-[ $\gamma$ -tio] trifosfato, la sal de litio de  $\alpha,\beta$ -metilén adenosina 5' trifosfato, la sal trisódica hidratada de uridina 5' trifosfato, la N- etilmaleimida, la sal disódica de suramina, el reactivo azul 2, la sal trisódica de ARL 67156, la sal tetrasódica de piridoxal fosfato 6-azo (ácido benzén 2,4 disulfónico), la indometacina, la bradicinina, la SQ 22 536, el tetraetilamonio y la iberiotoxina.

### **4. Análisis estadísticos**

Las diferencias en la respuesta de los anillos traqueales fueron evaluadas por medio de un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguidos por una prueba de Dunnett de comparaciones múltiples.

Las células únicas en los experimentos de la técnica de fijación de membranas, fueron evaluadas a través de un análisis de varianza de mediciones repetidas (ANOVA) seguido de una prueba Tukey-Kramer de comparaciones múltiples. La significancia estadística se fijó a una  $p < 0.05$  bimarginal. Los valores en el texto y las figuras están expresados como la media más/menos el error estándar de la media (ESM). El número de animales que fueron requeridos es representado con la letra “n”. Para los experimentos de célula única, la letra “n” corresponde al número de células y sólo un experimento fue realizado por animal.

## I. Resultados

### 1. El ATP induce relajación dependiente de prostaglandinas en los anillos traqueales de cobayo, pero independientemente del epitelio

Las concentraciones de ATP no acumulativas que fueron utilizadas indujeron una respuesta bifásica (contracción seguida de una relajación en el tiempo,  $n = 5-7$ ) en los anillos traqueales (Fig. 7).

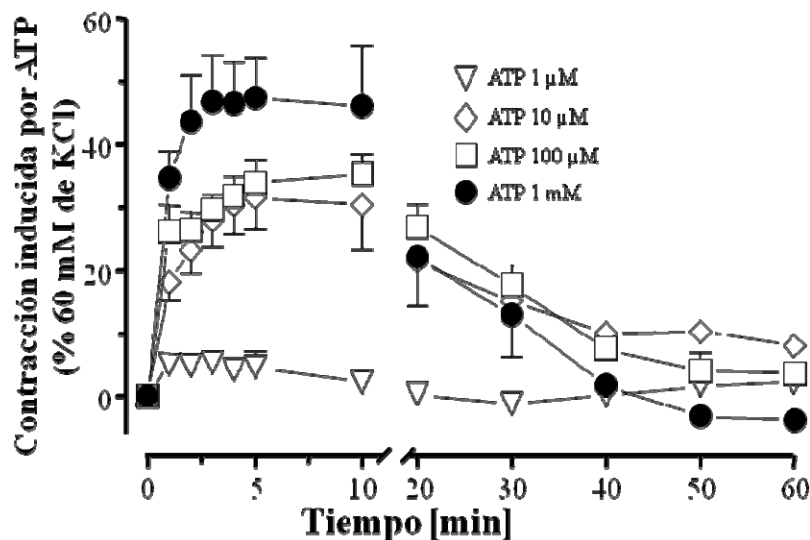


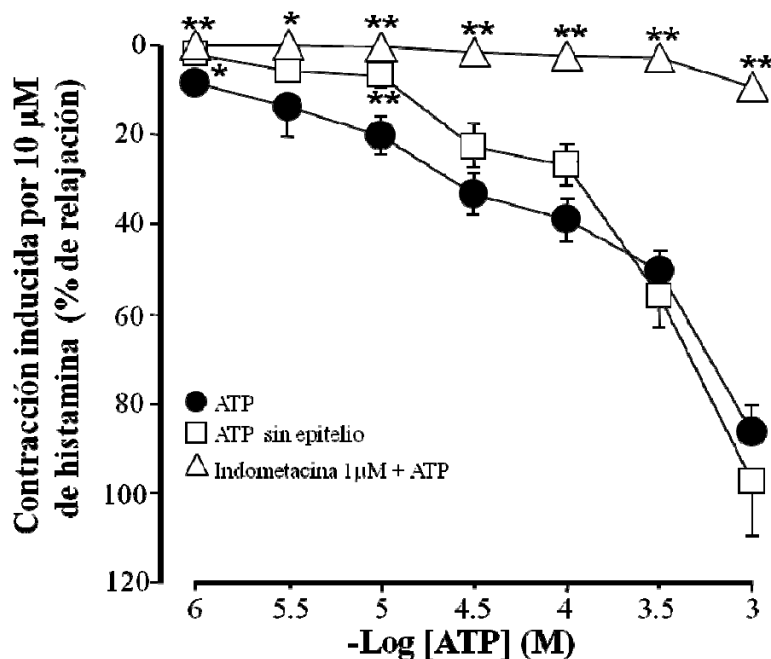
Figura 7

*Respuesta bifásica (contracción y relajación) del músculo liso traqueal de cobayo inducida por la administración de ATP. La aplicación de ATP (1, 10, 100, 1000 μM) produjo una respuesta bimodal, es decir, una contracción inicial seguida de una relajación. Las respuestas fueron dependientes de la concentración.*

Para corroborar que dicha relajación inducida por el ATP no era ocasionada por un proceso de desensibilización de los receptores purinérgicos, los tejidos fueron contracturados previamente con histamina 10  $\mu\text{M}$ , la cual indujo una contracción sostenida. Una vez que la contracción alcanzó una meseta, se adicionaron concentraciones únicas de ATP. Bajo éstas condiciones ( $n= 4-9$ ), el ATP indujo relajación dependiente de la concentración en los anillos traqueales.

Para inhibir la síntesis de prostaglandinas, se incubó con indometacina 1  $\mu\text{M}$  ( $n=5-7$ ). Con ello, el efecto de relajación producido por el ATP fue anulado a concentraciones por debajo de 320  $\mu\text{M}$ , pero una pequeña relajación quedó evidente al utilizar 1 mM de ATP (Fig. 8).

La remoción del epitelio de los anillos traqueales ( $n= 4-8$ ) disminuyó significativamente la relajación inducida por el ATP sólo a concentraciones entre 1-10  $\mu\text{M}$ , sin modificar las respuestas a concentraciones de ATP más elevadas (Fig. 8).



**Figura 8**

*Respuesta de los anillos traqueales de cobayo a la aplicación de: ATP, ATP en ausencia de epitelio y ATP con presencia de indometacina (1  $\mu\text{M}$ ), sobre la contracción inducida por histamina (10  $\mu\text{M}$ ).*

*\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$*

Al parecer, la relajación producida por el ATP requiere de la producción de prostaglandinas ya que ésta no fue observada en presencia de indometacina, y este fenómeno probablemente es ocasionado por un efecto directo en las células del músculo liso, ya que la relajación permanece aún después de la remoción del epitelio.

## 2. Los P2Y son los receptores purinérgicos involucrados en la relajación inducida por ATP en los anillos traqueales de cobayo

Se evaluó la posible participación de los receptores P2X y P2Y en la relajación inducida por el ATP en tejidos contracturados previamente con 10  $\mu$ M de histamina, por medio del uso de diversos agonistas y antagonistas de dichos receptores. ATP $\gamma$ S (análogo no hidrolizable del ATP, n= 4-7) y UTP (agonista de receptores P2Y, n= 5-10) provocaron una relajación dependiente de la concentración similar a la que produce el ATP (n= 4-8) de 1 a 320  $\mu$ M, y sólo la relajación inducida por 1000  $\mu$ M de UTP fue menos intensa que la del ATP.  $\alpha,\beta$ -metilén-ATP (agonista de receptores P2X, n= 4) no indujo relajación de 1 a 100  $\mu$ M y sólo una pequeña relajación fue observada a 320  $\mu$ M (Fig. 9).

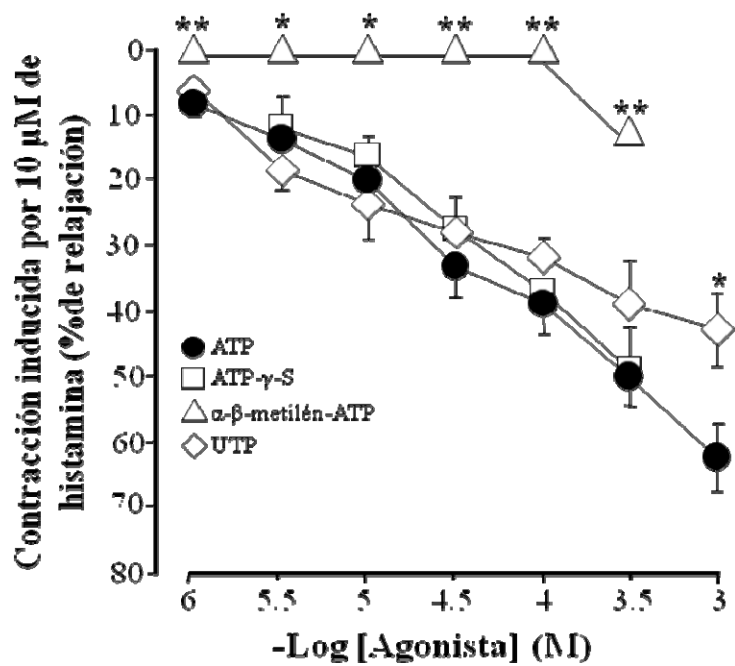


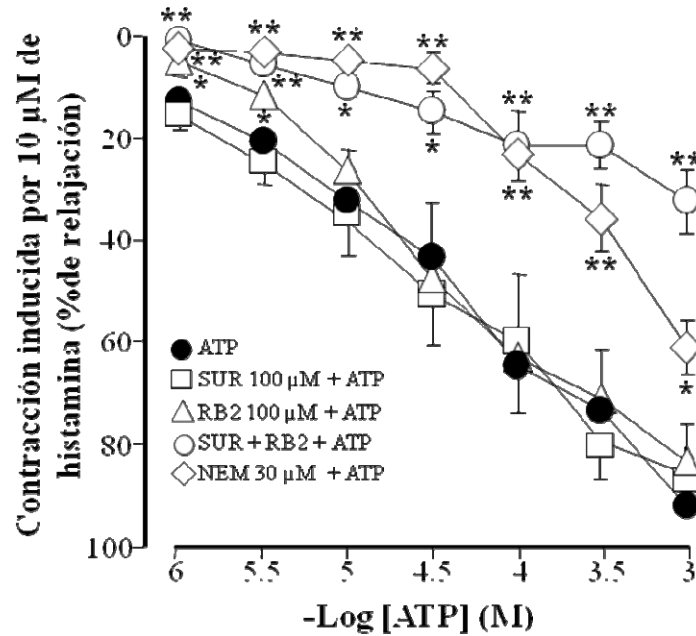
Figura 9

Respuesta de los anillos traqueales de cobayo a la aplicación de: ATP, ATP $\gamma$ S,  $\alpha,\beta$ -metilén-ATP y UTP, sobre la contracción inducida por 10  $\mu$ M de histamina.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

Por otra parte, la suramina (antagonista de los receptores P2X<sub>1,2,5</sub> y P2Y<sub>1,2,6,11,12,13</sub>, n= 4-6) y el RB2 (antagonista de los receptores P2Y<sub>1,4,6,11,12,13</sub> n= 5-6) no modificaron la relajación inducida por el ATP (n= 5-8), y sólo la combinación de ambos fármacos (n=5), redujo significativamente el efecto del ATP (Fig. 10). Posteriormente, se aumentó la concentración de ambos fármacos a 200 µM (Fig. 11), la suramina por sí sola no modificó la relajación inducida por ATP, pero el RB2 si lo hizo significativamente al menos en las concentraciones más bajas de ATP, lo que sugiere que el receptor P2Y<sub>4</sub>, para el cual se conoce que el RB2 tiene una CI<sub>50</sub> de 18.5 µM pero para la suramina mayor a 1 mM (Wildman *et al.*, 2003), puede ser uno de los principales receptores involucrados en la relajación mediada por el ATP. El receptor P2Y<sub>2</sub>, también puede estar involucrado, dado que es muy sensible a la suramina ya que ésta tiene una CI<sub>50</sub> mayor a 8.9 µM, además de que se sabe que el receptor tiene una gran resistencia al antagonismo por el RB2, ya que la CI<sub>50</sub> para éste antagonista es mayor a 10 mM (Wildman *et al.*, 2003).

La inhibición con el ARL 67156 de ciertos tipos de ectonucleotidasas, produjo que la curva concentración respuesta para el ATP se desplazara a la izquierda con respecto a su grupo control, sugiriendo que bajo estas condiciones experimentales, el ATP se hidroliza enzimáticamente por medio de las ectonucleotidasas. Asimismo, la incubación con la mezcla de suramina y RB2 en presencia del ARL 67156 redujo significativamente el efecto de relajación que induce el ATP al menos hasta la concentración de 10 µM y en las concentraciones más grandes el efecto de los antagonistas se vio minimizado, obviamente por el incremento de las concentraciones de ATP al estar inhibidas las ectonucleotidasas (Fig. 12).

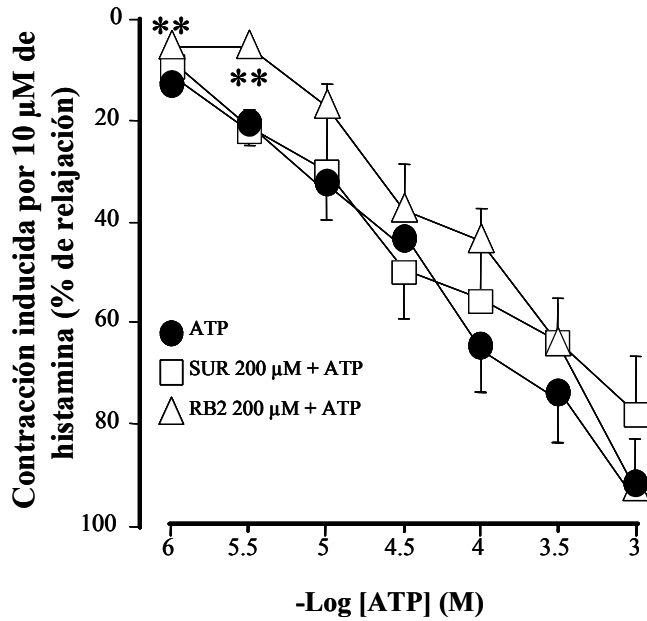


**Figura 10**

*Respuesta de los anillos traqueales de cobayo a la aplicación de ATP en presencia de 100 µM de suramina, 100 µM de RB2 y la mezcla de suramina y RB2, o de la incubación con NEM (30 µM), sobre la contracción inducida por histamina (10 µM).*

*\* p<0.05, \*\*p<0.01*

Estos resultados sugieren que durante la relajación inducida por el ATP, el receptor P2Y<sub>4</sub> o el P2Y<sub>2</sub>, pudieran ser los receptores purinérgicos involucrados en dicha respuesta. Con el uso del (NEM, n= 5-6), el cual desacopla a las proteína G de varios receptores, se observó que también reducía significativamente la relajación inducida por el ATP, corroborando que éste fenómeno se lleva a cabo a través de la activación de receptores acoplados a proteínas G.



**Figura 11**

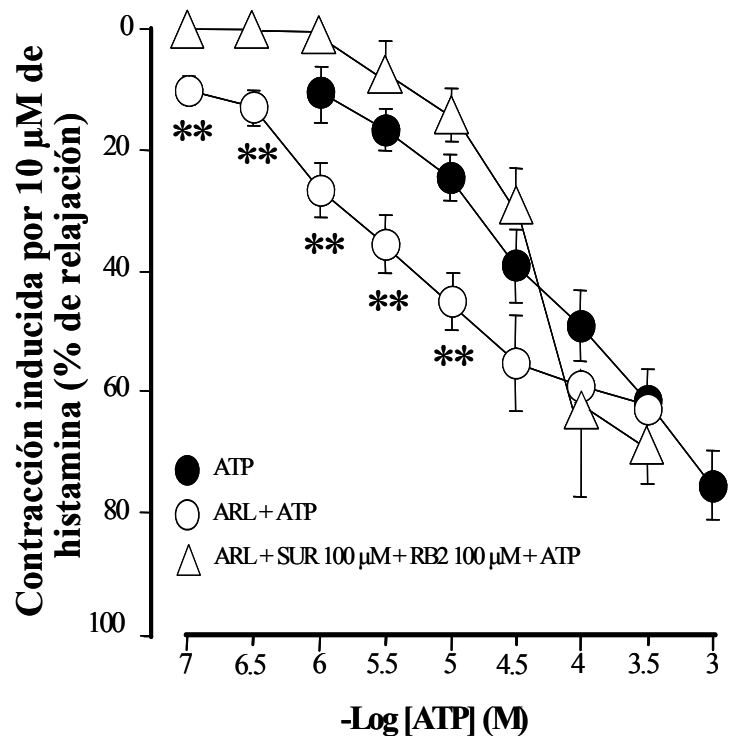
Respuesta de los anillos traqueales de cobayo a la aplicación de ATP en presencia de 200 μM de suramina o 200 μM de RB2 sobre la contracción inducida por histamina (10 μM).

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

**Figura 12**

Respuesta de los anillos traqueales de cobayo a la aplicación de ATP en presencia de 100 μM ARL 67156 y de ARL con la presencia de 100 μM de suramina y 100 μM de RB2 sobre la contracción inducida por histamina (10 μM). Se observa que el ARL produce un corrimiento a la izquierda en la curva de relajación con respecto al grupo control. Por otra parte, la mezcla de suramina y de RB2, en presencia de ARL, hace que el ATP reduzca su efecto de relajación hasta la concentración de 10 μM, a concentraciones más elevadas el efecto de los antagonistas se ve nulificado.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$



### 3. El ATP activa las corrientes de $K^+$ en célula única

En los experimentos de la técnica de fijación de membranas realizados en células únicas de miocitos traqueales de cobayo, las corrientes salientes de  $K^+$  fueron activadas con una serie de doce pasos despolarizantes desde -60 a 50 mV, los cuales fueron aplicados desde un potencial en reposo de -60 mV (Fig. 13 A), representando al grupo control.

El ATP indujo un incremento en las corrientes de  $K^+$  (IK) dependiente de la concentración con una respuesta máxima para la concentración 1000  $\mu$ M (Fig. 13 A). Este IK fue nulificado totalmente por la indometacina (1  $\mu$ M, n= 6), indicando que el fenómeno esta mediado por prostaglandinas producidas en el músculo liso (Fig.13 B).

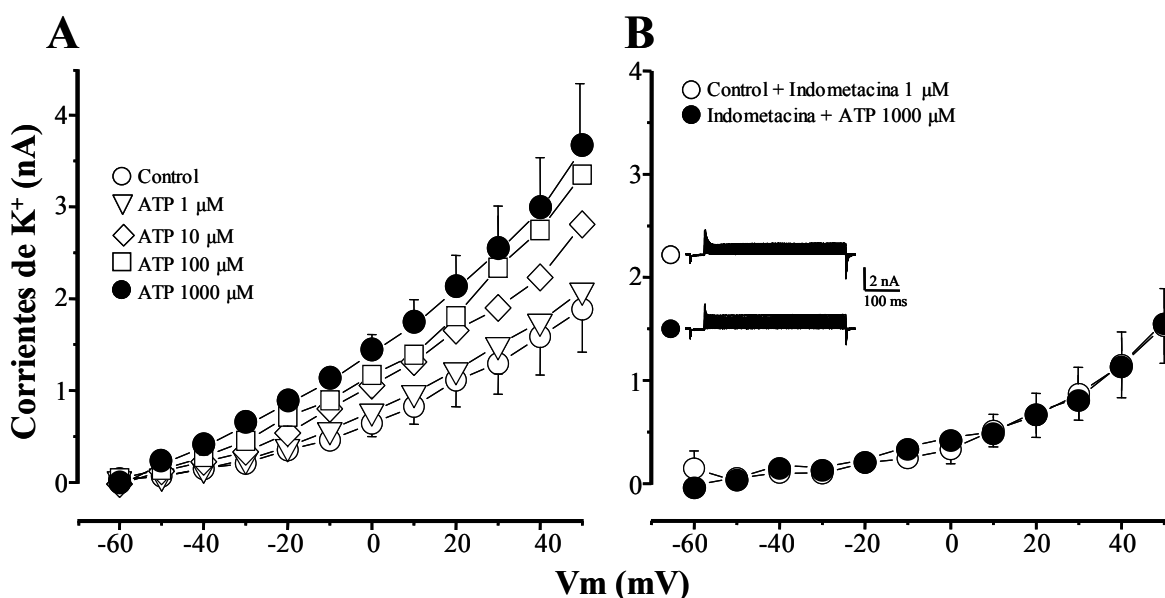


Figura 13

A) Efecto del ATP (1, 10, 100 y 1000  $\mu$ M) sobre las corrientes de  $K^+$ , en cultivos primarios de miocitos traqueales de cobayo. Se observó que el ATP aumenta las corrientes de  $K^+$  de manera dependiente de la concentración. B) Efecto de la indometacina (1  $\mu$ M) sobre las corrientes de  $K^+$  inducidas antes y después del estímulo de ATP. Se observa que la indometacina inhibió el aumento de las corrientes de  $K^+$  inducidas por el ATP (n= 6).

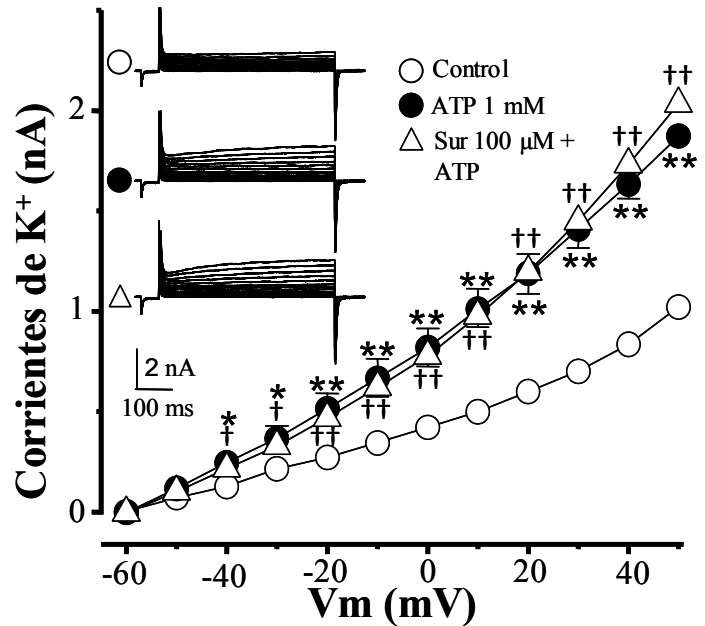


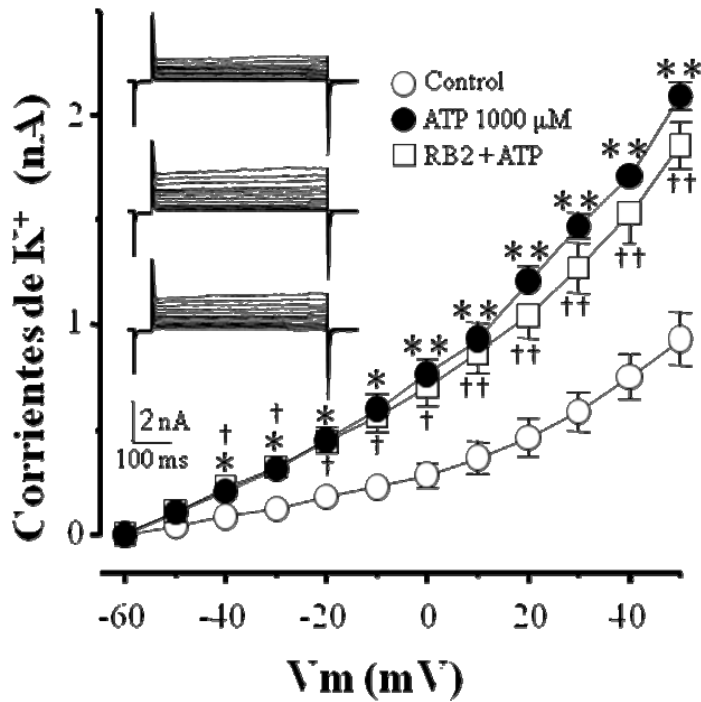
El IK inducido por 1000  $\mu\text{M}$  de ATP, no se modificó por la suramina ( $n=4$ ) (Fig. 14) ni por el RB2 ( $n=5$ ) (Fig.15), pero al utilizar la combinación de ambos antagonistas, este incremento fue anulado completamente ( $n=7$ ) (Fig. 16).

Por otra parte, para determinar la participación de los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje de rectificación tardía ( $\text{Kv}$ ), se incubó a las células con 4-AP (3 mM). Al adicionar ATP (1000  $\mu\text{M}$ ) en presencia de 4-AP, se observó un IK, que a su vez fue bloqueado cuando se añadió Ibtx (100 nM) en presencia de 4-AP. Estos resultados demuestran que el IK inducido por ATP en presencia de 4-AP correspondió a las corrientes de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) (Fig. 17 A). Además, la adición de ATP (1000  $\mu\text{M}$ ) en presencia de Ibtx, también produjo un IK, y dichas corrientes fueron bloqueadas por la 4-AP, indicando la participación de los Kv (Fig. 17 B  $n= 6$ ).

**Figura 14**

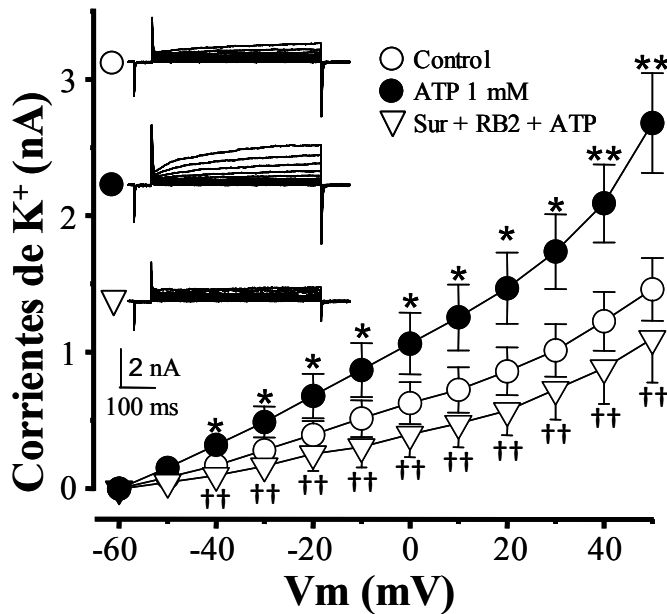
*Efecto de la suramina (100  $\mu\text{M}$ ) sobre las corrientes de  $\text{K}^+$  inducidas por ATP. La aplicación de suramina no produce cambios en estas corrientes ( $n=5$ ).*





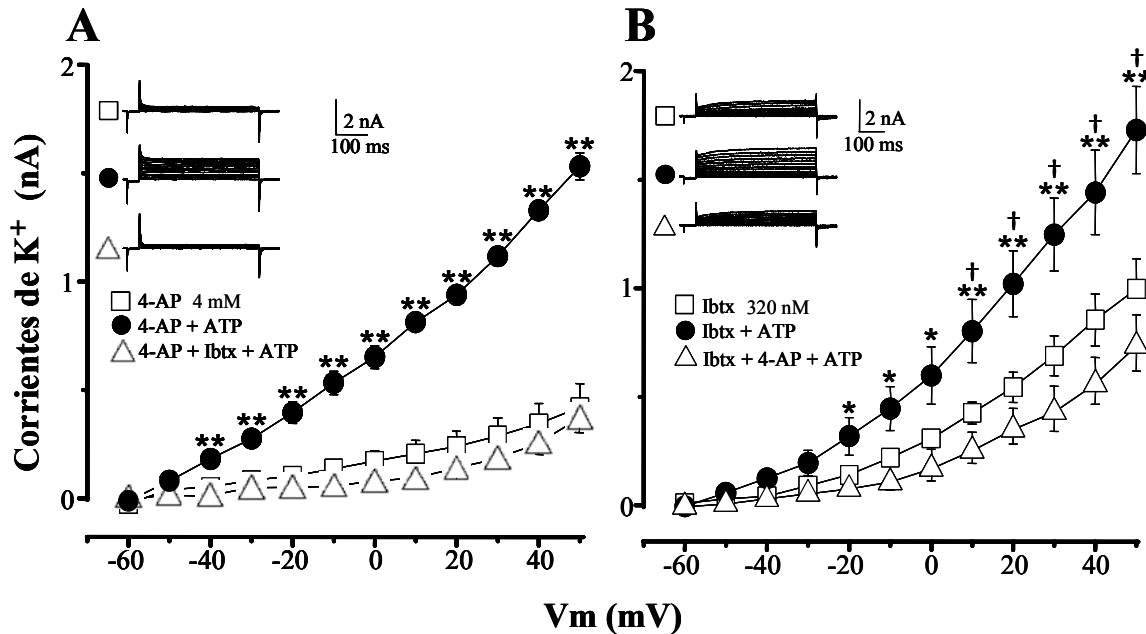
**Figura 15**

*Efecto del RB2 (100  $\mu$ M) sobre las corrientes de  $K^+$  inducidas por ATP. La aplicación del RB2 no tiene efecto sobre las corrientes de  $K^+$  inducidas por ATP (n=5).*



**Figura 16**

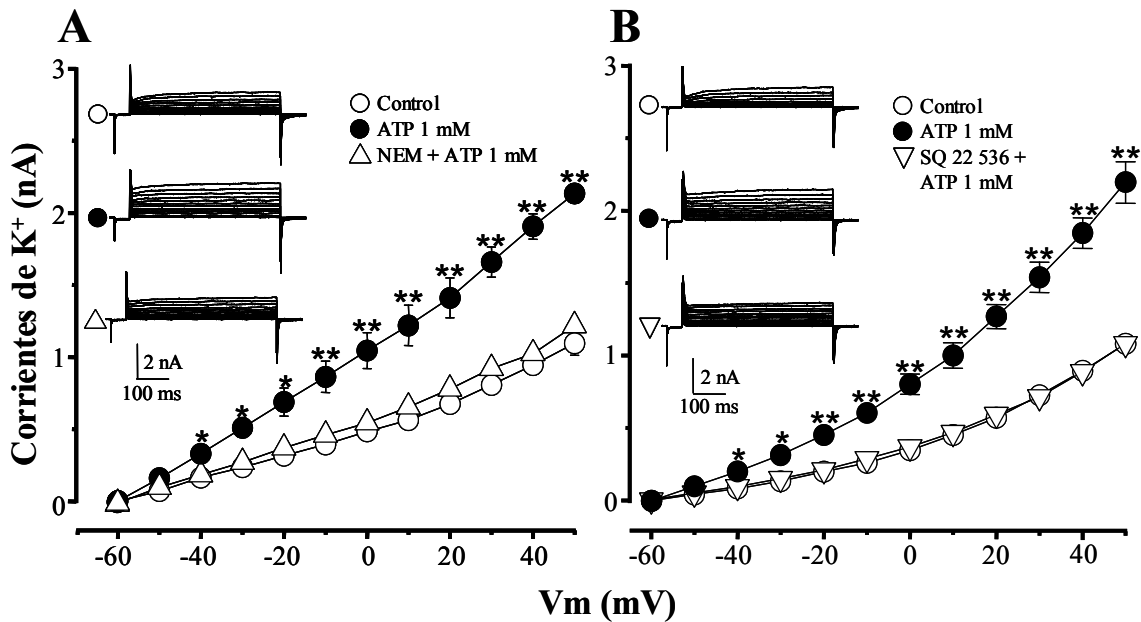
*La combinación de suramina (100  $\mu$ M) y RB2 (100  $\mu$ M) bloquea completamente las corrientes de  $K^+$  inducidas por ATP (n=7). Esto se debe a que la mezcla de estos dos antagonistas inhibe a todos los receptores del tipo P2Y que pudieran estar involucrados en la relajación del músculo liso mediada por ATP, ya que solo los subtipos 1, 2, 4, 6 y 11 liberan  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico, lo que sugiere que más de un receptor P2Y está involucrado en el aumento de las corrientes de  $K^+$  inducidas por el ATP (n=7).*



**Figura 17**

*Participación de los BK<sub>Ca</sub> en el efecto del ATP. A) En presencia de 4-AP( 3 mM), un bloqueador de los Kv, la aplicación de ATP produce un aumento de las corrientes de K<sup>+</sup>. La aplicación posterior de Ibtx (bloqueador de los BK<sub>Ca</sub>) en presencia de 4-AP y ATP genera la disminución de estas corrientes (n=7). Esto hace evidente la participación de los canales BK<sub>Ca</sub> en el efecto producido por la aplicación de ATP. B) Participación de los Kv en la respuesta a la aplicación de ATP. La incubación previa con Ibtx bloquea las corrientes de los BK<sub>Ca</sub>, y en estas condiciones la aplicación de ATP produce un aumento de las corrientes de K<sup>+</sup>. La posterior aplicación de 4-AP en presencia de Ibtx y ATP genera la disminución de estas corrientes (n=8). Estos resultados hacen evidente la participación de los Kv en el efecto producido por la aplicación de ATP.*

En otra serie de experimentos, la incubación con NEM (30 μM, n= 5), bloqueó el IK inducido por ATP, lo que sugiere la participación de receptores acoplados a proteínas G en este fenómeno (Fig.18 A). Asimismo, al inhibir la adenilil ciclasa con el SQ 22,536 (100 μM, n= 6), se anuló el IK inducido por ATP. Estos resultados sugieren que el ATP, probablemente vía una prostaglandina relajadora (PGE<sub>2</sub>), activó a una proteína Gs que a su vez estimuló la producción de AMPc para inducir la relajación del MLVA (Fig.18 B).

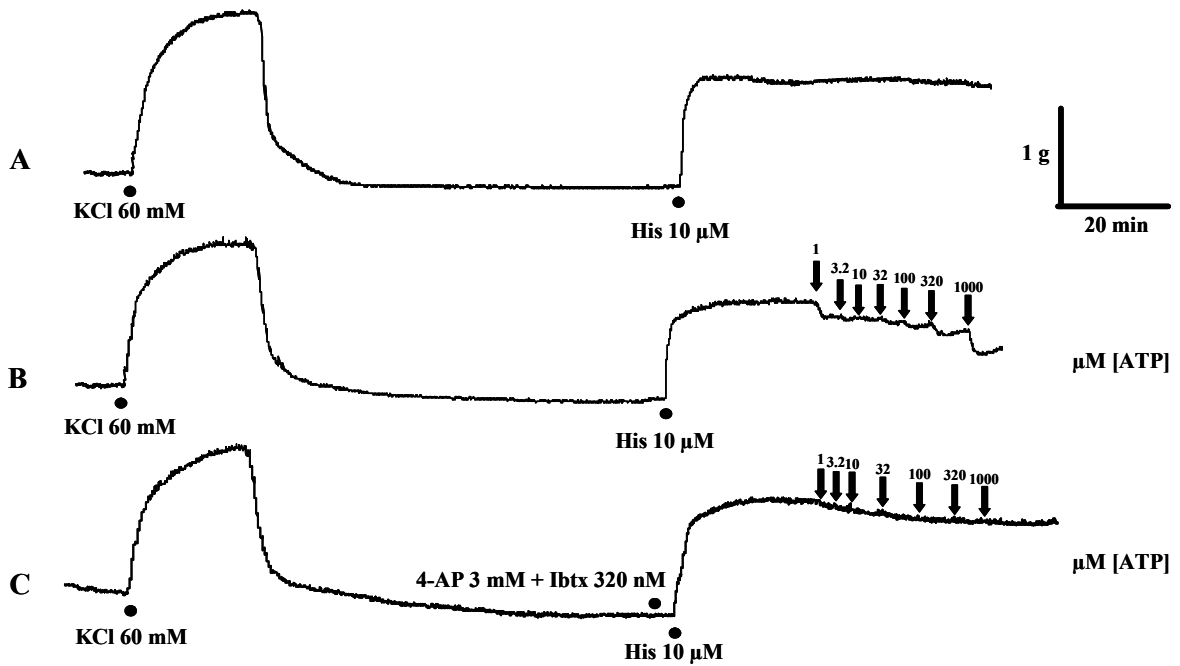


**Figura 18**

*Participación de una proteína G y la adenilil ciclasa en el aumento de las corrientes de  $K^+$  inducidas por la aplicación de ATP. A) La aplicación de NEM (desacoplador de las proteínas G, 30  $\mu M$ ) es capaz de disminuir las corrientes de  $K^+$  inducidas por la aplicación de ATP (1 mM, n=6). B) La aplicación de SQ 22,536 (inhibidor de la adenilil ciclasa, 100  $\mu M$ ) es capaz de disminuir el aumento en las corrientes de  $K^+$  producido por la aplicación de ATP (1 mM, n=6).*

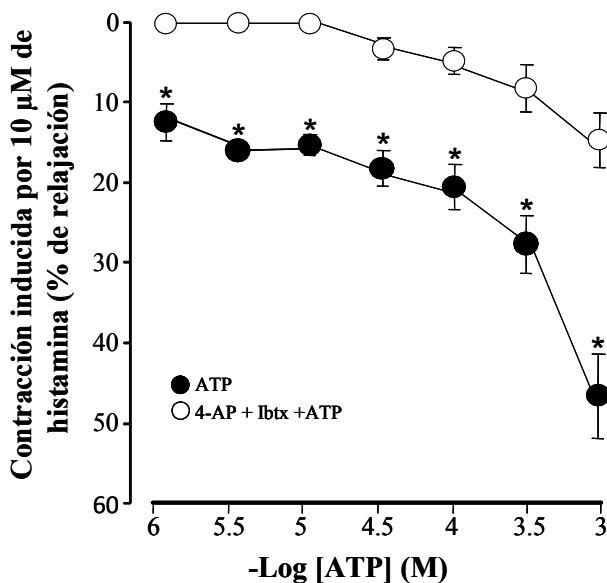
Para corroborar que el IK provocado por el ATP desempeña un papel fisiológico en la relajación inducida por éste nucleótido, se realizaron algunos experimentos en órganos aislados, donde los tejidos precontracturados con histamina (10  $\mu M$ ), fueron sometidos a curvas acumulativas concentración-respuesta de ATP (Fig. 19).

Bajo éstas condiciones, el ATP (n= 5) produjo una relajación dependiente de la concentración. Esta relajación disminuyó significativamente en los tejidos que fueron incubados previamente con 4-AP (3 mM) e IbtX (100 nM) (n= 4), demostrando que los canales  $BK_{Ca}$  y  $K_v$ , son los que tienen mayor importancia en la relajación inducida por el ATP (Fig. 20).



**Figura 19**

Registros originales del protocolo experimental de las curvas acumulativas de la relajación inducida por ATP. A) Después de tres estimulaciones con KCl (60 mM), se administró histamina (10  $\mu$ M) para provocar una contracción sostenida que se mantiene en el tiempo. B) En la meseta de contracción inducida por la histamina, se adicionó ATP de forma acumulativa con las siguientes concentraciones 1, 3.2, 10, 32, 100, 320, 1000  $\mu$ M, observando que la relajación es un fenómeno dependiente de la concentración. C) Curva acumulativa de la relajación inducida por ATP, en presencia de 4-AP (3 mM) e Ibtx (320 nM), se observa que la mezcla de éstos bloqueadores de los canales de  $K^+$  reduce considerablemente la relajación inducida por el ATP.



**Figura 20**

Respuesta de los anillos traqueales de cobayo a la aplicación acumulativa de ATP en presencia de 4-AP (3 mM) e Ibtx (320 nM), se observa que la mezcla de éstos bloqueadores de canales de  $K^+$ , reduce considerablemente la relajación inducida por el ATP.

\*  $p < 0.05$

## Discusión

La relajación del MLVA inducida por ATP ha sido demostrada en varias especies, incluyendo al ser humano (Aksoy y Kelsen, 1994; Fortner *et al.*, 2001; Kamikawa y Shimo, 1976; Mounkaïla *et al.*, 2005). Se ha reportado que esta respuesta es mediada por la producción de PGE<sub>2</sub> en el cobayo (Kamikawa y Shimo, 1976) mientras que en el conejo, la relajación inducida por el ATP se efectúa a través de la activación de receptores P2 localizados en el epitelio de la vía aérea (Aksoy y Kelsen, 1994). Con éste trabajo, se corroboró que la relajación inducida por el ATP en el MLVA de cobayo es dependiente de prostaglandinas ya que ésta se inhibió con el tratamiento con indometacina, no obstante, es independiente de la remoción del epitelio, indicando que las células mismas del músculo liso son productoras de prostaglandinas, sugiriendo un mecanismo autócrino de activación.

La activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), es un paso fundamental en la producción de eicosanoides y es probable que el ATP module su activación en el MLVA al elevar la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>). Existen dos tipos conocidos de PLA<sub>2</sub> citosólicas expresadas en células de músculo liso vascular, una de ellas es independiente de Ca<sup>2+</sup> y otra dependiente de éste ión. La primera de ellas es activada por ATP citosólico a través de un mecanismo que no requiere la participación de cinasas intermediarias. La PLA<sub>2</sub> dependiente de Ca<sup>2+</sup> es activada por incrementos fisiológicos en las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> (Miyake y Gross, 1992). En el músculo liso vascular, se ha propuesto que la activación de los receptores P2Y genera los incrementos en las [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> para activar a la PLA<sub>2</sub>. Al respecto, el ATP a través de la activación de receptores purinérgicos puede elevar las [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en células del MLVA (Flores-Soto *et al.*, 2011) y probablemente este efecto incremente la producción de prostaglandinas por estimulación de la PLA<sub>2</sub> dependiente de Ca<sup>2+</sup> como se ha propuesto en el músculo liso vascular. A la par, la activación de los purinorreceptores en éste músculo liso puede modular la PLA<sub>2</sub> independiente de Ca<sup>2+</sup> a través de un mecanismo hasta ahora desconocido.

Nuestras observaciones farmacológicas y electrofisiológicas indican que los receptores P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>2</sub> son los principales receptores purinérgicos involucrados en la relajación inducida por ATP. Primeramente, el agonista de los receptores P2Y (UTP), indujo una relajación muy parecida a la producida por el ATP, además, esta relajación fue disminuida por el tratamiento con NEM, el cual es conocido como un desacoplador de las proteínas G de varios receptores membranales. Posteriormente, la relajación disminuyó significativamente con la aplicación de la suramina y del RB2. La primera posee un conocido efecto al antagonizar a todos los receptores P2Y exceptuando al P2Y<sub>4</sub> y el segundo previene la activación de todos los receptores P2Y sin incluir al P2Y<sub>2</sub> (von Kugelgen, 2006; Wildman *et al.*, 2003; Van Crombruggen *et al.*, 2007). Estos hallazgos fueron corroborados recientemente por nuestro grupo de trabajo mediante microscopía confocal y western blots donde se encontró la presencia de los receptores P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>2</sub> en el MLVA de cobayo (Montaño *et al.*, 2011).

El ATP activa al menos dos diferentes tipos de canales de  $K^+$ , verificado por el hecho de que el efecto inducido por el ATP sobre las corrientes de  $K^+$  sólo es prevenido por la administración conjunta de la 4-AP y la Ibtx, y no por el uso individual de estos bloqueadores. Ibtx es un bloqueador específico de los  $BK_{Ca}$  de alta conductancia (Liu *et al.*, 2007), mientras que la 4-AP bloquea los canales de  $K^+$  (Kv) en el MLVA (Snetkov VA, Ward, 1999; Zhao *et al.*, 2004), lo que indica que estos canales son los principales involucrados en las corrientes de  $K^+$  activadas por el ATP.

Estudios previos en varios tipos de músculo liso, incluyendo al traqueal de cobayo, reportan la modulación de los canales de  $K^+$  de rectificación tardía y de los dependientes de  $Ca^{2+}$  de alta conductancia por la PKA dependiente de AMPc (Cole *et al.*, 1996; Koh *et al.*, 1996; Aiello *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 2003). Los resultados de éste estudio muestran que los efectos que regulan a los canales de  $K^+$  mediados por ATP se efectúan a través de una vía de señalización que involucra a los receptores P2Y, producción de prostaglandinas (probablemente  $PGE_2$ ), y activación de la adenilil ciclasa, porque los antagonistas de los receptores P2Y, la indometacina (inhibidor de la ciclo-oxigenasa), el NEM (desacoplador de las Proteínas G y el SQ 22,536 (inhibidor de la adenilil ciclasa) nulificaron el efecto.

El fenómeno que el ATP provocó en los canales de  $K^+$  son regulados en conjunto por los receptores P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>2</sub>, ya que el incremento en las corrientes sólo fue prevenido por la combinación de los dos antagonistas de éstos receptores (suramina y RB2) y al usar sólo uno de ellos el incremento se mantuvo. Como se mencionó anteriormente, al usar la mezcla de ambos fármacos, todos los receptores P2Y fueron antagonizados, mientras que al adicionarse individualmente, el receptor P2Y<sub>2</sub> no se ve afectado por el RB2 y el P2Y<sub>4</sub> no es inhibido por la suramina, sugiriendo un rol compensatorio de la función entre éstos dos receptores.

Finalmente, los datos obtenidos en órganos aislados indican que la relajación inducida por ATP en el músculo liso traqueal de cobayo es debida a la activación de los canales de  $K^+$  ya que la administración en conjunto de 4-AP e Ibtx, bloqueadores de éstos canales, redujo el efecto notoriamente.

## Conclusión

El ATP induce relajación en el músculo de vías aéreas de cobayo, principalmente, a través de la activación de receptores purinérgicos del tipo P2Y<sub>4</sub> y el P2Y<sub>2</sub>.

La activación de éstos receptores induce la formación de prostaglandinas broncodilatadoras probablemente del tipo  $E_2$  en las células de músculo liso, las cuales de manera autócrina generan incrementos en los niveles de AMPc, que activan a la PKA, la cual fosforila a los canales de  $K^+$   $BK_{Ca}$  y Kv, para inducir hiperpolarización a nivel celular, y en consecuencia la relajación del MLVA de cobayo.

## Bibliografía

- Miras Portugal MT. *Funciones extracelulares del adenosín trifosfato, ATP, y otros nucleótidos*. Discurso leído en la sesión del día 25 de enero de 2001 para su ingreso como Académico de Número. INSTITUTO DE ESPAÑA REAL ACADEMIA DE FARMACIA.
- Capítulo 4 Energía. *Bioquímica. Las bases moleculares de la vida*. McKee T., McKee JR. Ed. Mc Graw Hill. México. 2009. Págs.115-118.
- Capítulo 1 La bioquímica y la organización de las células. *Bioquímica*. Campbell MK., Farrell SO. Ed. Cengage Learning, S.S. México. 2009. Págs. 28-30.
- Aiello EA, Malcolm AT, Walsh MP, Cole WC.  *$\beta$ -adrenoceptor activation and PKA regulate delayed rectifier  $K^+$  channels of vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol. 1998. 275: H448-459.
- Aksoy MO, Kelsen SG. *Relaxation of rabbit tracheal smooth muscle by adenine nucleotides: Mediation by P2-purinoreceptors*. Am J Respir Cell Mol Biol. 1994. 10:230-236.
- Bodin P, Burnstock G. *Purinergic signalling: ATP release*. Neurochem Res. 2001. 26: 959–969.
- Billington C.K., Penn, R.B. *Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle*. Respiratory Research. 2003. 4: 2.
- Burnstock G. *Purinergic nerves*. Pharmacol Rev. 1972. 24: 509–581.
- Burnstock G. *Historical review: ATP as a neurotransmitter*. Trends Pharmacol Sci. 2006. 27 (3): 166-76.
- Burnstock G. *Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission*. Physiol Rev. 2007. 87(2):659-797.
- Burnstock G. *Purinergic signalling and vascular cell proliferation and death*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002. 22: 364-73
- Burnstock G, Williams M. *P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential*. J Pharmacol Exp Ther. 2000. 295: 862-9



- Bramley AM, Samhoun MN, Piper PJ. *The role of the epithelium in modulating the responses of guinea-pig trachea induced by bradykinin in vitro*. Br. J. Pharmacol. 1990. 99:762-766.
- Cole WC, Clement-Chomienne O, Aiello EA. *Regulation of 4-aminopyridine sensitive, delayed rectifier  $K^+$  channels in vascular smooth muscle by phosphorylation*. Biochem Cell Biol. 1996. 74:439-447.
- Communi D, Govaerts C, Parmentier M, Boeynaems JM. *Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase*. J Biol Chem. 1997. 272: 31969–31973.
- Communi D, Robaye B, Boeynaems JM. *Pharmacological characterization of the human P2Y<sub>11</sub> receptor*. Br J Pharmacol. 1999. 128: 1199– 1206.
- Chambers JK, Macdonald LE, Sarau HM, Ames RS, Freeman K, Foley JJ, Zhu Y, McLaughlin MM, Murdock P, McMillan L, Trill J, Swift A, Aiyar N, Taylor P, Vawter L, Naheed S, Szekeres P, Hervieu G, Scott C, Watson JM, Murphy AJ, Duzic E, Klein C, Bergsma DJ, Wilson S, Livi GP. *A G protein-coupled receptor for UDP-glucose*. J Biol Chem. 2000. 275: 10767– 10771.
- Chizh BA, Illes P. *P2X receptors and nociception*. Pharmacol Rev. 2001. 53(4):553-68.
- Cressman VL, Lazarowski E, Homolya L, Boucher RC, Koller BH, 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.
- Drury AN, Szent-Györgyi A. *The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart*. J Physiol. 1929. 68: 213–237.
- Dubyak GR. *ATP release mechanisms*. En la monografía editada: *Nucleotides and Regulation of Bone Cell Function*, editado por Burnstock G. and Arnett TR. Boca Raton, FL: Taylor & Francis. 2006. págs. 99–158.
- Fabre JE, Nguyen M, Latour A, Keifer JA, Audoly LP, Coffman TM, 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.

- Fitz JG. *Regulation of cellular ATP release*. Trans Amer Clin Climat Asso. 2007. 118: 199-206.
- Flores-Soto E, Carbajal V, Reyes-Garcia J, Garcia-Hernandez LM, Figueroa A, Checa M, Barajas-Lopez C, Montaña LM. *In airways ATP refills sarcoplasmic reticulum via P2X smooth muscle receptors and induces contraction through P2Y epithelial receptors*. Pflugers Arch. 2011. 461:261-275.
- Fortner CN, Breyer RM, Paul RJ. *EP2 receptors mediate airway relaxation to substance P, ATP, and PGE<sub>2</sub>*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001. 281:L469-474.
- Freissmuth M, Selzer E, Schütz W. *Interactions of purified bovine brain A1-adenosine receptors with G-proteins. Reciprocal modulation of agonist and antagonist binding*. Biochem J. 1991. 275: 651-6.
- Galindo F, Flores A. “*De la energética a la neurotransmisión: el adenosín trifosfato y sus receptores*” Rev Neurol. 2006. 43 (11): 667-677.
- Kamikawa Y, Shimo Y. *Mediation of prostaglandin E<sub>2</sub> in the biphasic response to ATP of the isolated tracheal muscle of guinea-pigs*. J Pharm Pharmac. 1976. 28: 294-297.
- Kirley TL. *Complementary DNA cloning and sequencing of the chicken muscle ecto-ATPase*. J Biol Chem. 1997. 272: 1076-81.
- Klinger M, Freissmuth M, Nanoff C. *Adenosine receptors: G protein mediated signalling and the role of accessory proteins*. Cell Signal. 2002.14: 99-108.
- Koh SD, Sanders KM, Carl A. *Regulation of smooth muscle delayed rectifier K<sup>+</sup> channels by protein kinase A*. Pflugers Arch. 1996. 432:401-412.
- Kubista H, Lechner SG, Wolf AM, Boehm S. *Attenuation of the P2Y receptor-mediated control of neuronal Ca<sup>2+</sup> channels in PC12 cells by antithrombotic drugs*. Br J Pharmacol. 2003. 138: 343– 350.
- Kukulski F, Lévesque S, Sévigny J. *Impact of Ectoenzymes on P2 and P1 Receptor Signaling*. Adv Pharmacol. 2011. 61: 263-299.
- Lazarowski ER. *Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release*. Purinergic Signal. 2012. 3: 359-373.

- Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK. *Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules*. Mol Pharmacol. 2003. 64: 785–795.
- Leon C, Vial C, Cazenave JP, Gachet C. *Cloning and sequencing of a human cDNA encoding endothelial P2Y<sub>1</sub> purinoceptor*. Gene. 1996. 171: 295–297.
- Liu B, Freyer AM, Hall. *Bradykinin activates calcium-dependent potassium channels in cultured human airway smooth muscle cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007. 292:L898-907.
- Lustig KD, Shiau AK, Brake AJ, Julius D. *Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells*. Proc Natl Acad Sci. 1993. 90: 5113– 5117.
- Mamedova LK, Joshi BV, Gao ZG, Von Kügelgen I, Jacobson KA. *Diisothiocyanate derivatives as potent, insurmountable antagonists of P2Y<sub>6</sub> nucleotide receptors*. Biochem Pharmacol. 2004. 67: 1763–1770.
- Mazzuco TL, André E, Calixto JB. *Contribution of nitric oxide, prostanoids and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels to the relaxant response of bradykinin in the guinea pig bronchus in vitro*. Naun Schm Arch Pharmacol. 2000. 361: 383-390.
- Miyake R, Gross RW. *Multiple phospholipase A<sub>2</sub> activities in canine vascular smooth muscle*. Biochim Biophys Acta. 1992. 1165:167-176.
- Montañó LM, Cruz-Valderrama JE, Figueroa A, Flores-Soto E, García-Hernández LM, Carbajal V, Segura P, Méndez C, Díaz V, Barajas-López C. *Characterization of P2Y receptors mediating ATP induced relaxation in guinea pig airway smooth muscle: involvement of prostaglandins and K<sup>(+)</sup> channels*. Pflugers Arch. 2011. 462:573-85.
- Millan JL. *Alkaline phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes*. Purinergic Signal. 2006. 2:335-341.
- Mounkaïla B, Marthan R, Roux E. *Biphasic effect of extracellular ATP on human and rat airways is due to multiple P2 purinoceptor activation*. Respir Res. 2005. 6: 143.
- 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.
- Nielsen-Kudsk JE. *Potassium channel modulation: a new drug principle for regulation of smooth muscle contractility.* Studies on isolated airways and arteries. Dan Med Bull. 1996. 43:429-47.
  - North RA, Barnard EA. *Nucleotide receptors.* Curr Opin Neurobiol. 1997. 7(3):346-57.
  - North RA, Surprenant A. *Pharmacology of cloned P2X receptors.* Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2000. 40:563-80.
  - Oonuma H, Iwasawa K, Iida H, Nagata T, Imuta H, Morita Y, Yamamoto K, Nagai R, Omata M, Nakajima T. *Inward rectifier K<sup>+</sup> current in human bronchial smooth muscle cells: inhibition with antisense oligonucleotides targeted to Kir2.1 mRNA.* Am J Respir Cell Mol Biol. 2002. 26(3):371-9.
  - Okada SF, Nicholas RA, Kreda SM, Lazarowski ER, Boucher RC. *Physiological regulation of ATP release at the apical surface of human airway epithelia.* J Biol Chem. 2006. 281: 22992-23002.
  - Palmer TM, Gettys TW, Stiles GL. *Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A3 adenosine receptor.* J Biol Chem. 1995. 270: 16895-902.
  - Parr CE, Sullivan DM, Paradiso AM, Lazarowski ER, Burch LH, Olsen JC, Erb L, Weisman GA, Boucher RC, Turner JT. *Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy.* Proc Natl Acad Sci. 1994. 91: 3275–3279.
  - Pelaia G, Gallelli L, Vatrella A, Grembiale RD, Maselli R, De Sarro GB, Marsico SA. *Potential role of potassium channel openers in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease.* Life Sci. 2002. 9:977-90.
  - Piper AS, Hollingsworth M. *ATP and  $\beta,\gamma$ -methylene ATP produce relaxation of guinea-pig isolated trachealis muscle via actions at P1 purinoreceptors.* Eur Jour Pharmacol. 1996. 307: 183-189.
  - Ralevic V. *Mechanism of prolonged vasorelaxation to ATP in the rat isolated mesenteric arterial bed.* Br J Pharmacol. 2001. 132:685-692.

- Ralevic V, Burnstock G. *Receptors for purines and pyrimidines*. Pharmacol Rev. 1998. 50: 413-92.
- Robson SC, Sévigny J, Zimmerman H. *The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance*. Purinergic Signal. 2006. 2:409–430.
- Sabirov R, Okada Y. *ATP release via anion channels*. Purinergic Signal. 2005. 1: 311–328.
- Schwartz DD, Malik KU. *Renal periarterial nerve stimulation induced vasoconstriction at low frequencies is primarily due to release of a purinergic transmitter in the rat*. J Pharmacol Exp Ther. 1989. 250: 764–771.
- Schwiebert EM, Zsembery A, Geibel JP. *Cellular mechanisms and physiology of nucleotide and nucleoside release from cells: current knowledge, novel assays to detect purinergic agonists, future directions*. Curr Top Membr. 2003. 54: 31–58.
- Snetkov VA, Hirst SJ, Ward JP. *Ion channels in freshly isolated and cultured human bronchial smooth muscle cells*. Exp Physiol. 1996. 81:791-804.
- Snetkov VA, Ward J P. *Ion currents in smooth muscle cells from human small bronchioles: presence of an inward rectifier  $K^+$  current and three types of large conductance  $K^+$  channel*. Exp Physiol. 1999. 84: 835-846.
- Tanaka Y, Yamashita Y, Yamaki F, Horinouchi T, Shigenobu K, Koike K. *MaxiK channel mediates  $\beta$ 2-adrenoceptor-activated relaxation to isoprenaline through cAMP-dependent and -independent mechanisms in guinea-pig tracheal smooth muscle*. J Smooth Muscle Res. 2003. 39:205-219.
- Tilley SL, Hartney JM, Erikson CJ, Jania C, Nguyen M, Stock J, McNeisch J, Valancius C, Panettieri RA, Jr., Penn RB, Koller BH. *Receptors and pathways mediating the effects of prostaglandin  $E_2$  on airway tone*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2003. 284: L599–L606.
- Todorov LD, Mihaylova-Todorova S, Westfall TD, Sneddon P, Kennedy C, Bjur RA, Westfall DP. *Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation*. Nature. 1997. 387: 76-9.

- Van Crombruggen K, Van Nassauw L, Timmermans JP, Lefebvre RA. *Inhibitory purinergic P2 receptor characterisation in rat distal colon*. *Neuropharmacology*. 2007. 53:257-271
- von Kügelgen I. *Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes*. *Pharmacol Ther*. 2006. 110:415-432.
- von Kügelgen I, Wetter A. *Molecular pharmacology of P2Y-receptors*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2000. 362 (4-5): 310-23.
- Wildman SS, Unwin RJ, King BF. *Extended pharmacological profiles of rat P2Y<sub>2</sub> and rat P2Y<sub>4</sub> receptors and their sensitivity to extracellular H<sup>+</sup> and Zn<sup>2+</sup> ions*. *Br J Pharmacol*. 2003. 140: 1177– 1186.
- Zhang Y, Paterson WG. *Excitatory purinergic neurotransmission in smooth muscle of guinea-pig [corrected] taenia caeci*. *J Physiol*. 2005. 15(563):855-65.
- Zhao LM, Xu YJ, Zhang ZX, Ni W, Chen SX. *Effect of passive sensitization by serum from allergic asthmatic patients on the activity and expression of voltage-dependent delayed rectifier potassium channel in human bronchial smooth muscle cells*. *Chin Med J (Engl)*. 2004. 117:1630-1636.
- Zimmermann H. *Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function*. *Trends Pharmacol Sci*. 1999. 20: 231-6.
- Zimmermann H. *Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system*. *Prog Neurobiol*. 1996. 49: 589-618.

## Characterization of P2Y receptors mediating ATP induced relaxation in guinea pig airway smooth muscle: involvement of prostaglandins and K<sup>+</sup> channels

Luis M. Montaña · José E. Cruz-Valderrama · Alejandra Figueroa ·  
Edgar Flores-Soto · Luz M. García-Hernández · Verónica Carbajal · Patricia Segura ·  
Carmen Méndez · Verónica Díaz · Carlos Barajas-López

Received: 10 February 2011 / Revised: 14 June 2011 / Accepted: 15 July 2011 / Published online: 29 July 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** In airway smooth muscle (ASM), adenosine 5'-triphosphate (ATP) induces a relaxation associated with prostaglandin production. We explored the role of K<sup>+</sup> currents (*I<sub>K</sub>*) in this relaxation. ATP relaxed the ASM, and this effect was abolished by indomethacin. Removal of airway epithelium slightly diminished the ATP-induced relaxation at lower concentration without modifying the responses to ATP at higher concentrations. ATP $\gamma$ S and UTP induced a concentration-dependent relaxation similar to ATP;  $\alpha,\beta$ -methylene-ATP was inactive from 1 to 100  $\mu$ M. Suramin or reactive blue 2 (RB2), P2Y receptor antagonists, did not modify the relaxation, but their combination significantly reduced this effect of ATP. The relaxation was also inhibited by *N*-ethylmaleimide (NEM; which uncouples G proteins). In myocytes, the ATP-induced *I<sub>K</sub>*

increment was not modified by suramin or RB2 but the combination of both drugs abolished it. This increment in the *I<sub>K</sub>* was also completely nullified by NEM and SQ 22,536. 4-Aminopyridine or iberiotoxin diminished the ATP-induced *I<sub>K</sub>* increment, and the combination of both substances diminished ATP-induced relaxation. The presence of P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>4</sub> receptors in smooth muscle was corroborated by Western blot and confocal images. In conclusion, ATP: (1) produces relaxation by inducing the production of bronchodilator prostaglandins in airway smooth muscle, most likely by acting on P2Y<sub>4</sub> and P2Y<sub>2</sub> receptors; (2) induces *I<sub>K</sub>* increment through activation of the delayed rectifier K<sup>+</sup> channels and the high-conductance Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels, therefore both channels are implicated in the ATP-induced relaxation; and (3) this *I<sub>K</sub>* increment is mediated by prostaglandin production which in turns increase cAMP signaling pathway.

L. M. Montaña (✉) · J. E. Cruz-Valderrama · A. Figueroa ·  
E. Flores-Soto · L. M. García-Hernández  
Departamento de Farmacología, Edificio de Investigación,  
sexto piso, laboratorio 3, Facultad de Medicina, Universidad  
Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria,  
04510 Mexico, DF, Mexico  
e-mail: lmmr@servidor.unam.mx

C. Méndez · V. Díaz  
Departamento de Embriología, Facultad de Medicina,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
Mexico, DF, Mexico

V. Carbajal · P. Segura  
Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial,  
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias,  
Mexico, DF, Mexico

C. Barajas-López  
División de Biología Molecular, Instituto Potosino  
de Investigación Científica y Tecnológica,  
San Luis Potosí, SLP, Mexico

**Keywords** ATP · Airway smooth muscle · Relaxation ·  
Purinergic receptors · K<sup>+</sup> channels

### Introduction

Adenosine 5'-triphosphate (ATP) acts as an extracellular mediator with significant biological effects mediated by purinergic 2 (P2) receptors. These receptors are classified in P2X<sub>1-7</sub> and P2Y<sub>1,2,4,6,11,12,13,14</sub> subtypes [7]. P2X receptors are ligand-gated channels [20] and P2Y receptors are coupled to G proteins linked to IP<sub>3</sub> synthesis [4, 11].

It has been well documented, in airway smooth muscle of different species, including human bronchial rings, that ATP induces a biphasic response: a contraction followed by relaxation [12, 19]. The relaxing phase of this biphasic

response has been proposed to be dependent of purinoceptor desensitization, prostaglandin  $E_2$  production and  $pK_a$  activation [3, 10, 12, 19]. Additionally, in rabbit tracheal smooth muscle, the ATP-induced relaxation was reported to be mediated by P2 receptors on the airway epithelium [3]. However, Pipper and Hollingsworth [21] postulated that relaxation of the guinea pig tracheal smooth muscle at higher ATP concentrations may occur through enzymatic hydrolysis of ATP to adenosine involving P1 receptors.

In other smooth muscles, opening of  $K^+$  channels has been involved in the ATP-induced relaxation. In rat mesenteric artery and mouse aorta smooth muscle, glibenclamide-sensitive  $K^+$  channels and delayed  $K^+$  currents, respectively, have been associated with the ATP-induced vasorelaxation, and in the first study, P2Y receptors were involved [22, 24]. Furthermore, in murine colonic smooth muscle cells and in rat vas deferens, ATP induced hyperpolarization by activating small-conductance  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  and cAMP-dependent  $K^+$  channels via P2Y receptors [14, 23].

The aim of the present work was to investigate the potential role of several relaxing mechanisms triggered by ATP in guinea pig airway smooth muscle, including the role of airway epithelium, the high-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$ , and the delayed rectifier  $K^+$  channels through cAMP signaling and the involvement of P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>4</sub> subtype receptors.

## Materials and methods

### Animals

Male Hartley guinea pigs (350–400 g) bred in conventional conditions in our institutional animal facilities (filtered conditioned air at  $21 \pm 1^\circ C$ , 50–70% humidity, and sterilized bed) and fed with Harlan® pellets and sterilized water were used. The protocol was approved by the Scientific and Bioethics Committees of the Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. The experiments were conducted in accordance with the published Guiding Principles in the Care and Use of Animals, approved by the American Physiological Society.

### Organ baths

Animals were deeply anesthetized with pentobarbital sodium ( $35 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.) and exsanguinated. Major airways were dissected and cleaned of connective tissue; eight rings were obtained from the trachea (each ring was submitted to different experimental conditions) and hung in a 5-ml organ bath filled with Krebs solution (in mM): 118 NaCl, 25  $\text{NaHCO}_3$ , 4.6 KCl, 1.2  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2  $\text{MgSO}_4$ , 11 glucose, and 2  $\text{CaCl}_2$ . Preparations were maintained at  $37^\circ C$  and

bubbled with 5%  $\text{CO}_2$  in oxygen at pH 7.4. Tissues were attached to an isometric force transducer (model FT03; Grass Instruments, West Warwick, RI, USA) connected to a system of signal conditioner (CyberAmp 380, Axon Instruments, Foster City, CA, USA) plus an analog–digital interface (Digidata 1440A, Axon Instruments). Recordings were stored in a microcomputer and analyzed using data acquisition and analysis software (AxoScope version 10.2; Axon). Preparations were equilibrated for 30 min under a resting tension of 1 g before testing.

Tissues were stimulated three times with KCl (60 mM), and then the temporal course of the responses to ATP was evaluated by adding single concentrations of this drug (1, 10, 100, and 1,000  $\mu\text{M}$ ) to different tracheal rings.

In order to evaluate the relaxing effect of ATP, tracheal rings were precontracted with 10  $\mu\text{M}$  histamine, and then single concentrations (1, 3.2, 10, 32, 100, 320, and 1,000  $\mu\text{M}$ ) of ATP, ATP $\gamma\text{S}$  (non-hydrolyzable analog),  $\alpha,\beta$ -methylene-ATP (P2X agonist), and UTP (P2Y agonist) [31] were added to different tissue preparations. Other tissues were preincubated with one of the following drugs during 15 min before the addition of the non-cumulative concentration response curve to ATP: suramin (P2X and P2Y<sub>1,2,6,11,12,13</sub> receptor antagonist, 100 and 200  $\mu\text{M}$ ) [7, 30, 31, 33], pyridoxal phosphate-6-azo(benzene-2,4-disulfonic acid) (PPADS, P2X receptor antagonist, 30  $\mu\text{M}$ ), reactive blue 2 (RB2; P2Y<sub>1,4,6,11,12,13</sub> receptor antagonist, 100 and 200  $\mu\text{M}$ ) [7, 30, 31, 33], a combination of suramin (100  $\mu\text{M}$ )+RB2 (100  $\mu\text{M}$ ), ARL 67156 (ecto-ATPase inhibitor, 100  $\mu\text{M}$ ) and *N*-ethylmaleimide (NEM; 30  $\mu\text{M}$ ), which uncouples G proteins from several receptors [25, 26]. We corroborated that, at this concentration, NEM did not modify the concentration response curve to histamine (data not shown). In some tissues, indomethacin (1  $\mu\text{M}$ ) was added or the airway epithelium was removed. The epithelium removal (~70–90%) was verified by histological examination (hematoxylin and eosin staining). Additionally, we pharmacologically corroborated the adequacy of this procedure as reported elsewhere [5]; shortly, when the epithelium was adequately removed from the tracheal rings, 320 nM bradykinin produced a contraction instead of the relaxation observed in tracheal rings with epithelium. Finally, to assess the role of  $K^+$  channels in the ATP-induced relaxation, some tissues were incubated with 3 mM 4-aminopyridine (4-AP; voltage-dependent delayed rectifier  $K^+$  channels blocker) [27, 34] and 320 nM iberiotoxin (IBTX; a high-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels blocker) [16]. In this last experiment, we constructed a cumulative concentration response curve to ATP.

### Patch clamp recordings

Isolated myocytes from guinea pig trachea were obtained as follows. Tracheal airway smooth muscle freed from any



residual connective tissue was placed in 5 ml Hanks solution containing 2 mg cysteine and  $0.05 \text{ U ml}^{-1}$  papain and incubated for 10 min at  $37^\circ\text{C}$ . The tissue was washed with Leibovitz's solution to remove the enzyme excess and then placed in Hanks solution containing  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  collagenase type I and  $4 \text{ mg ml}^{-1}$  dispase II (neutral protease) during  $\sim 20$  min at  $37^\circ\text{C}$ . The tissue was gently dispersed by mechanical agitation until detached cells were observed. Enzymatic activity was stopped by adding Leibovitz's solution, the cells were centrifuged at 800 rpm at  $20^\circ\text{C}$  during 5 min, and the supernatant was discarded. This last step was repeated once. For myocytes culture, the cell pellet was suspended in minimum essential medium containing 5% guinea pig serum, 2 mM L-glutamine,  $10 \text{ U ml}^{-1}$  penicillin,  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  streptomycin, and 15 mM glucose and plated on rounded coverslips coated with sterile rat tail collagen. Cell culture was performed at  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$  in oxygen during 24–48 h. Airway smooth muscle cells were allowed to settle down in the bottom of a 0.7-ml coverglass submerged in a perfusion chamber. The chamber was perfused by gravity ( $\sim 1.5\text{--}2.0 \text{ ml min}^{-1}$ ) with external solution (in mM): 130 NaCl, 5 KCl, 1  $\text{CaCl}_2$ , 10 HEPES, 10 glucose, 0.5  $\text{MgCl}_2$ , 3  $\text{NaHCO}_3$ , 1.2  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , and 0.1 niflumic acid (pH 7.4, adjusted with NaOH). Experiments were performed at room temperature ( $\sim 22^\circ\text{C}$ ). The standard whole-cell configuration and an Axopatch 200A amplifier (Axon) were used to record the membrane  $\text{K}^+$  currents activated by depolarizing voltage steps (i.e., voltage clamp). Patch pipettes were made with 1B200F-6 glass (World Precision Instruments, Sarasota, FL) using a horizontal micropipette puller (P-87, Sutter Instruments Co, Novato, CA). Pipette resistance ranged from 2 to 4 M $\Omega$ . The internal solution was (in mM): 140 potassium gluconate, 5 NaCl, 5 HEPES, 1 EGTA, 5 ATP disodium, 0.1 GTP sodium, and 0.1 leupeptin (pH 7.3, adjusted with KOH). Whole-cell currents were filtered at 1–5 kHz using the analogical filter of the amplifier, digitized (Digidata 1200, Axon instruments) at 10 kHz, and stored in a computer for later analysis through special software (pClamp v10.0, Axon). A series of hyperpolarizing and depolarizing square pulses (from  $-60$  to  $+50$  mV) was applied to the myocytes in 10 mV increments from a holding potential of  $-60$  mV during 500 ms at 1 Hz to observe outward  $\text{K}^+$  currents. Once a basal recording of  $\text{K}^+$  currents was obtained after the control protocol, a concentration response curve to ATP or UTP (1, 10, 100, and 1,000  $\mu\text{M}$ ) was constructed and changes in the  $\text{K}^+$  currents were quantified. Some myocytes were perfused with indomethacin (1  $\mu\text{M}$ ) and stimulated with 1 mM ATP (maximal response). Other cells were preincubated with one of the following drugs during 10 min before the addition of 1 mM ATP: suramin (100  $\mu\text{M}$ ), RB2 (100–200  $\mu\text{M}$ ) or the combination of both

drugs, SQ 22,536 (100  $\mu\text{M}$ , adenylyl cyclase inhibitor), and 30  $\mu\text{M}$  NEM.

The protocol to evaluate the participation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  currents ( $I_{\text{K}(\text{Ca})}$ ) and the delayed rectifier  $\text{K}^+$  currents ( $I_{\text{Kv}}$ ) on the 1-mM ATP-induced  $\text{K}^+$  currents was as follows. Once a basal recording of  $\text{K}^+$  currents was obtained, voltage-dependent delayed rectifier  $\text{K}^+$  channels ( $\text{K}_v$ ) were blocked by continuously perfusing the cell with 3 mM 4-AP, then the effect of ATP was evaluated by adding 1 mM of this drug to the perfusion system, and finally the role of high-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) was evaluated by adding 100 nM IBTX (a  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  selective blocker). After each treatment,  $\text{K}^+$  currents were recorded. To evaluate the role of the delayed rectifier  $\text{K}^+$  channels, this last protocol was repeated in another set of experiments, in which 100 nM IBTX was added first.

#### Western blotting for P2Y receptors

Guinea pig tracheal smooth muscle strips without epithelium were collected and immediately frozen in liquid nitrogen and remained stored until analysis. Each tissue was homogenized (Polytron PT 1200 E, Kinematica, Luzern, Switzerland) in 500  $\mu\text{l}$  of lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM  $\text{Na}_2\text{VO}_4$ , 1% Triton X-100, 50 mM NaF,  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  leupeptin, and  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  aprotinin as protease inhibitors [6]. Homogenized samples were filtered through a prewashed Amicon® Ultra-4 (30,000 MWCO, cat. no. UFC803096, Millipore, Country Cork, Ireland) centrifugal filter device. Samples were centrifuged at  $4^\circ\text{C}$  and 3,000 rpm, for 15 min. Total protein content was determined using a commercial kit (DC Protein Assay, cat. 500-0116, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Forty micrograms of the sample were loaded in different lanes of a 10% SDS polyacrylamide gel and subjected to electrophoresis under reducing conditions. Afterwards, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, cat. no. 162-0112) and blocked with 5% nonfat dry milk in TBS-tween (Tween 20, 0.1%) at room temperature for 1.5 h. Membranes were incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$  with rabbit polyclonal antibody raised against  $\text{P2Y}_1$  (cat. no. APR-009),  $\text{P2Y}_2$  (cat. no. APR-010), and  $\text{P2Y}_4$  (cat. no. APR-006), obtained from Alomone Labs (Jerusalem, Israel). Antibody raised against  $\text{P2Y}_6$  was obtained from Santa Cruz Biotechnology (cat. no. sc-20127, CA, USA). All antibodies were used at 1:200. Afterwards, membranes were incubated with a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (1:1,000, cat. no. 12-348, Millipore, CA, USA) for 1 h, at  $37^\circ\text{C}$ . Immunoblots were developed using an enhanced chemiluminescent reactant (LumiGlo 20X, cat. no. 7003, Cell Signaling Technology, MA, USA).

P2Y immunoblots were analyzed by densitometry using ImageJ NIH software, <http://rsbweb.nih.gov/ij/index/html>. Mouse monoclonal  $\alpha$ -actin antibody (1:2,500, Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA) was blotted as a control for protein load in another set of experiments. These membranes were incubated with a horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG secondary antibody (1:2000, cat. no. NA9310V, Amersham, Buckinghamshire, UK). To determine specificity of immunolabeling, the antigenic peptide (1  $\mu$ g peptide/1  $\mu$ g antibody to P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, or P2Y<sub>4</sub>) was used to saturate the primary antibody. Since antigen for P2Y<sub>6</sub> antibody was not available, we used guinea pig brain as positive control.

#### Immunofluorescence

Guinea pigs were deeply anaesthetized with pentobarbital sodium (35 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) and exsanguinated. Lung tissues were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 2.5 h and then placed in ethanol (30%) until their inclusion in paraffin. Once paraffinized, tissue blocks were cut into thin slices (5  $\mu$ m) and placed over silane-prep slides (Sigma).

Paraffin was removed by incubation in xylol, followed by graded alcohols. Lung slices were soaked in phosphate-buffered saline (PBS), three times for 5 min each. Heat-induced antigen retrieval was performed by placing slides in a pressure cooker in 0.01 M citrate buffer at pH 6 for 3 min. Slices were transferred into PBS and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS. To block nonspecific binding to proteins, 5% horse serum was applied on the slices for 2 h. The primary antibodies, P2Y<sub>1</sub> (cat. no. APR-009), P2Y<sub>2</sub> (cat. no. APR-010), P2Y<sub>4</sub> (cat. no. APR-006), and P2Y<sub>6</sub> (cat. no. sc-20127), were incubated (1:50) overnight at 4°C. The slices were rinsed with PBS four times for 5 min each. The secondary antibody, a goat anti-rabbit IgG conjugated with Cy3 (AP187C, Millipore, CA, USA), was incubated (1:100) for 1 h under dark conditions and then rinsed with PBS four times for 5 min each. Afterwards, slices were fixed with 4% PFA for 10 min and rinsed with PBS.

To incubate the next primary antibody, the above-described protocol was also used to incubate slides with mouse monoclonal antibody raised against  $\alpha$ -actin (Santa Cruz Biotechnology, cat. no. sc-58669) but using 1% horse serum to block nonspecific binding to proteins, and Alexa fluor 488 donkey anti-mouse (A21202 Molecular probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA) was used as a secondary antibody. Tissue sections were mounted with VectaShield mounting Set (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). To determine the specificity of immunolabelling, the antigen for P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, and P2Y<sub>4</sub> was used to saturate the primary antibody. In the case of P2Y<sub>6</sub>, the primary

antibody was omitted. All slides were counterstained with DAPI (Sigma, cat. no. D9542).

The immunolabelled slices were observed using a confocal laser microscope (Leica TCS SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). The resolution of all images obtained with the confocal microscope using a  $\times 40$  oil immersion objective was originally 1,024 $\times$ 1,024 pixels. For display purposes, merged images were constructed in which the P2Y receptors were in red and  $\alpha$ -actin was in green.

#### Drugs

ATP disodium salt, adenosine 5'-[ $\gamma$ -thio]triphosphate tetralithium salt,  $\alpha,\beta$ -methyleneadenosine 5'-triphosphate lithium salt, uridine 5'-triphosphate trisodium salt hydrate, *N*-ethylmaleimide, suramin disodium salt, RB2, pyridoxal phosphate-6-azo(benzene-2,4-disulfonic acid) tetrasodium salt, indomethacin, SQ 22,536, IBTX, and ARL 67156 were all purchased from Sigma Chem. Co. (St Louis, MO, USA). 4-AP was acquired from Research Chemicals LTD (Ward Hill, MA, USA).

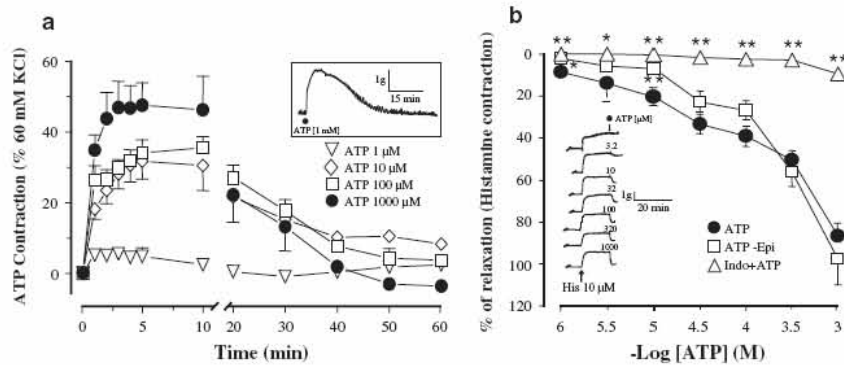
#### Statistical analysis

Differences in the response of tracheal rings were evaluated through one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparisons test. Single cells (patch clamp experiments) were evaluated through repeated measures of analysis of variance followed by Tukey–Kramer multiple comparisons test. In some experiments, we used the unpaired Student's *t* test. Statistical significance was set at two-tailed  $p < 0.05$ . Data are expressed in the text and illustrations as mean  $\pm$  SEM; *n* represents the number of animals used. For single cell experiments, *n* corresponds to the number of cells, and only one experiment was performed per animal.

#### Results

ATP induces relaxation in tracheal rings in a prostaglandin-dependent manner but independently from the epithelium

All non-cumulative concentrations of ATP induced a biphasic response (contraction followed by relaxation,  $n = 5–7$ ) in tracheal rings (Fig. 1a). To corroborate that the relaxation induced by ATP was not due to a desensitization process, tissues were precontracted with 10  $\mu$ M histamine, which induces a sustained contraction, and then single concentrations of ATP were added. Under this condition, ATP ( $n = 4–9$ ) produced a relaxation which was concentration dependent. Inhibition of prostaglandin synthesis by



**Fig. 1** Effect of ATP on the contraction-relaxation activity in guinea pig tracheal smooth muscle. **a** Time course biphasic responses of guinea pig tracheal rings to different single concentrations of ATP. These responses (contraction-relaxation) were observed at each ATP concentration used ( $n=5-7$ ). **b** Relaxation induced by ATP is prostaglandin dependent with minimal participation of the epithelium. Non-cumulative concentration-response curve to ATP in guinea pig tracheal rings precontracted with 10  $\mu\text{M}$  histamine and the effect of indomethacin (*Indo*) and epithelium (*Epi*). ATP ( $n=4-9$ ) produced a concentration-dependent relaxation and *Indo* (1  $\mu\text{M}$ ,  $n=5-7$ ) completely abolished the response to ATP from 1 to 100  $\mu\text{M}$  and

essentially almost blocked the effect of 1,000  $\mu\text{M}$ . The removal of *Epi* ( $n=4-8$ ) significantly diminished the relaxation induced by ATP but only from 1 to 10  $\mu\text{M}$ , without affecting the relaxation at higher concentrations. This ATP-induced relaxation required prostaglandin production since it was not observed in the presence of indomethacin, and it is likely a direct effect on smooth muscle cells because it persists after epithelium removal. *Insets* correspond to original recordings. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  with respect to the ATP group (one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparisons test). Symbols represent mean  $\pm$  SEM

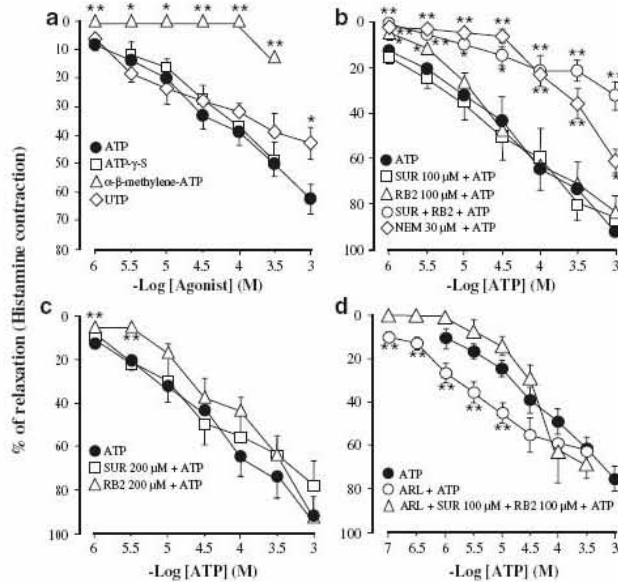
1  $\mu\text{M}$  indomethacin ( $n=5-7$ ), completely prevented the effects of ATP at concentrations below 320  $\mu\text{M}$  but a very small relaxation was evident at 1 mM (Fig. 1b). The removal of airway epithelium ( $n=4-8$ ), significantly diminished the ATP-induced relaxation at lower concentrations (1–10  $\mu\text{M}$ ) only, without modifying the responses to ATP at higher concentrations. This ATP-induced relaxation seems to require prostaglandin production, since it was not observed in the presence of indomethacin and it is likely caused by a direct effect on smooth muscle cells because it persists after epithelium removal.

P2Y are the major purinergic receptors involved in the ATP-induced relaxation in tracheal rings

The possible role of P2Y and P2X receptors in the relaxation induced by ATP was evaluated through several agonists and antagonists. As can be seen in Fig. 2a, ATP $\gamma\text{S}$  (non-hydrolyzable ATP analog,  $n=4-7$ ) and UTP (P2Y agonist,  $n=5-10$ ) induced a concentration dependent relaxation response similar to ATP ( $n=4-8$ ) from 1 to 320  $\mu\text{M}$ , and only the relaxation observed at 1,000  $\mu\text{M}$  UTP was smaller.  $\alpha,\beta$ -Methylene-ATP (a P2X agonist,  $n=4$ ) did not produce any relaxation from 1 to 100  $\mu\text{M}$  and only induced a small relaxation at 320  $\mu\text{M}$ . PPADS (30  $\mu\text{M}$ , P2X receptor antagonist) did not change the concentration-response curve to ATP ( $\text{EC}_{50}$ ,  $37.9 \pm 13.9 \mu\text{M}$

vs.  $26.2 \pm 5.1 \mu\text{M}$ ,  $n=4$ ). Suramin (100 and 200  $\mu\text{M}$ , P2X and P2Y $_{1,2,6,11,12,13}$  receptor antagonist,  $n=4-6$ ) did not modify the relaxation induced by ATP. Because P2Y $_4$  is the only P2Y receptor with the lowest sensitivity to suramin ( $\text{IC}_{50} > 1 \text{ mM}$  [33]), we hypothesized that such receptor is essential for the ATP effect. To further investigate this issue, we tested the effect of RB2 (100 and 200  $\mu\text{M}$ ,  $n=5-6$ ), a potent antagonist ( $\text{IC}_{50} = 18.5 \mu\text{M}$  [33]) of P2Y $_4$  receptor. This antagonist significantly diminished the relaxation but only at low concentrations of ATP (1 and 3.2  $\mu\text{M}$ ; Fig. 2b, c), which would indicate that another P2Y suramin sensitive, is involved. P2Y $_2$  receptor is known to be resistant to RB2 ( $\text{IC}_{50} > 10 \text{ mM}$  [33]) but sensitive to suramin ( $\text{IC}_{50} > 8.9 \mu\text{M}$  [33]). Thus, we co-administer both drugs, which significantly reduced the effect of ATP (Fig. 2b) suggesting that P2Y $_2$  and P2Y $_4$  are essential for the ATP-induced relaxation.

Inhibition of the ectonucleotidases shifted to the left the concentration response curve to ATP ( $\text{EC}_{50}$ ,  $2.0 \pm 0.55 \mu\text{M}$  ( $n=5$ ) vs. control group,  $29.9 \pm 4.4 \mu\text{M}$ ;  $p < 0.01$ ) suggesting that, under our experimental conditions, this nucleotide is enzymatically hydrolyzed by the ectonucleotidases (Fig. 2d). In the presence of ARL, 100  $\mu\text{M}$  suramin plus 100  $\mu\text{M}$  RB2 significantly inhibit ATP effects at  $\leq 10 \mu\text{M}$ , and at higher ATP concentrations, the effect of the antagonists were surmounted. Altogether, these results suggest that, during the relaxation induced by ATP, P2Y receptors are the main purinergic receptors involved in this response. NEM ( $n=5-6$ ), which



**Fig. 2** The ATP-induced relaxation is mimicked by P2Y receptor agonists and inhibited by the combination of two P2Y receptor antagonists. Effect of different agonists and antagonists to ATP in guinea pig tracheal rings precontracted with 10  $\mu$ M histamine. a ATP $\gamma$ S (non-hydrolyzable analog,  $n=4-7$ ) and UTP (P2Y agonist,  $n=5-10$ ) induced a relaxation response similar to ATP ( $n=4-8$ ) from 1 to 320  $\mu$ M, and only the relaxation observed at 1,000  $\mu$ M UTP was smaller.  $\alpha$ - $\beta$ -Methylene-ATP (P2X agonist,  $n=4$ ) did not produce any relaxation from 1 to 100  $\mu$ M and only induced a small relaxation at 320  $\mu$ M. b Suramin (Sur; P2X and P2Y<sub>1,2,6,11,12,13</sub> receptor antagonist,  $n=4-6$ ) and RB2 (P<sub>2</sub>Y<sub>1,4,6,11,12,13</sub> receptor antagonist,  $n=5-6$ ) alone did not modify the relaxation induced by ATP ( $n=5-8$ ), and only the combination of both drugs ( $n=5$ ) significantly reduced the effect of ATP. c Higher concentrations of suramin ( $n=6$ ) did not change the relaxation produced by ATP, whereas RB2 ( $n=8$ ) was only

effective to block relaxation at low ATP concentrations (1 and 3.2  $\mu$ M). d ARL 67156 (ARL, 100  $\mu$ M, an inhibitor of ectonucleotidases) shifted to the left the concentration response curve to ATP ( $EC_{50}$ ,  $2.0 \pm 0.55$   $\mu$ M ( $n=5$ ) vs. control group,  $29.9 \pm 4.4$   $\mu$ M;  $p < 0.01$ ). In the presence of ARL, 100  $\mu$ M suramin plus 100  $\mu$ M RB2, significantly inhibit ATP effects at  $\leq 10$   $\mu$ M, and at higher ATP concentrations, the effect of the antagonists were prevented. These results suggest that P2Y<sub>4</sub> and P2Y<sub>2</sub> receptors are involved in the relaxation induced by ATP. N-Ethylmaleimide (NEM,  $n=5-6$ ), which uncouples G proteins from several receptors, also inhibited the relaxation induced by ATP, consistently with the idea that this effect develops through P2Y receptors. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  with respect to the ATP group (one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparisons test). In (d), \*\* $p < 0.01$  with respect to ARL+Sur+RB2 group. Symbols represent mean $\pm$ SEM

uncouples G proteins from several receptors, also inhibited the relaxation induced by ATP, corroborating that this effect is through receptors coupled to G proteins.

#### ATP activates K<sup>+</sup> currents in single cells

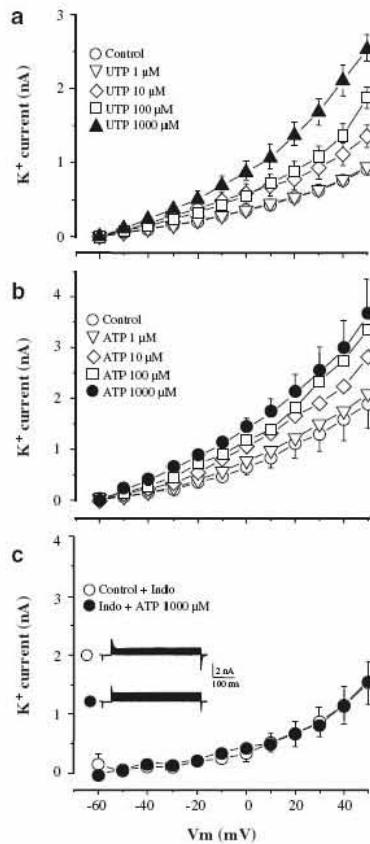
In the voltage clamp experiments with single myocytes, outward K<sup>+</sup> currents ( $I_K$ ) were activated when step depolarizations from  $-60$  to  $50$  mV were applied from a holding potential of  $-60$  mV (Fig. 3, control group). ATP and UTP produced a similar increment in the  $I_K$  which was concentration dependent, and the maximal response was observed at 1,000  $\mu$ M, suggesting a role of P2Y receptors in this phenomenon (Fig. 3a, b). This ATP increment in the  $I_K$  was completely abolished by indomethacin (1  $\mu$ M,  $n=$

6), indicating that this phenomenon is mostly mediated by prostaglandins production in the smooth muscle (Fig. 3c).

The ATP-induced  $I_K$  increment (1 mM) was not modified by suramin (P2X and P2Y<sub>1,2,6,11,12,13</sub> receptor antagonist, 100  $\mu$ M,  $n=4$ ) nor by RB2 (P<sub>2</sub>Y<sub>1,4,6,11,12,13</sub> receptor antagonist, 100 or 200  $\mu$ M (data not shown for 200  $\mu$ M),  $n=5$ ; Fig. 4a, b). However, the combination of both drugs completely abolished the ATP-induced  $I_K$  increment ( $n=7$ ; Fig. 4c).

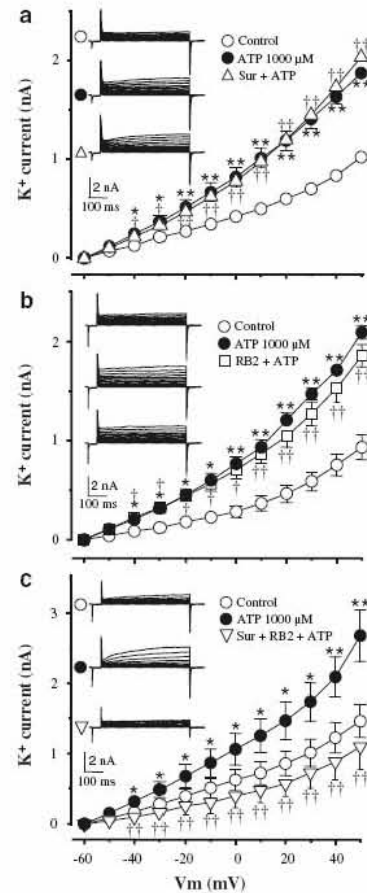
In order to rule out the voltage-dependent K<sup>+</sup> channels (delayed rectifier) participation in this phenomenon, some cells received 3 mM 4-AP. Addition of 1 mM ATP in the presence of 4-AP, notably increased K<sup>+</sup> currents, which in turn were blocked by 100 nM IBX (a BK<sub>Ca</sub> selective blocker), thus corroborating that they corresponded to Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> currents ( $I_{K(Ca)}$ ) (Fig. 5a). Furthermore, ATP addition in the



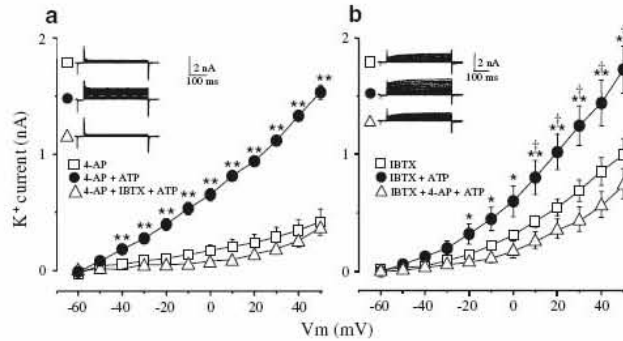


**Fig. 3** UTP and ATP increase whole-cell K<sup>+</sup> currents ( $I_K$ ), in a prostaglandin-dependent manner. Effect of different UTP and ATP concentrations on the  $I_K$  in single-airway smooth muscle cells from guinea pig and the effect of indomethacin (*Indo*).  $I_K$  were evoked by step depolarization from  $-60$  to  $50$  mV (control group,  $n=6$ ). **a** UTP ( $n=6$ ) and **b** ATP ( $n=6$ ) produced an increment in the  $I_K$  which was concentration dependent, and the maximal response was observed at  $1,000$  μM. **c** The ATP increment in the  $I_K$  was completely abolished by *Indo* ( $1$  μM,  $n=6$ ), indicating that this phenomenon is mostly mediated by prostaglandins production in the smooth muscle. *Insets* correspond to examples of the original recordings of the K<sup>+</sup> currents. *Symbols* represent mean±SEM

presence of  $100$  nM IBTX, also increased the  $I_K$  which were blocked by 4-AP, supporting that they correspond to  $I_{Kv}$  ( $n=6$ ; Fig. 5b). Moreover, in a separate set of experiments, *N*-ethylmaleimide ( $30$  μM,  $n=5$ ) and SQ 22,536 ( $100$  μM,  $n=6$ ), completely abolished the ATP-induced  $I_K$  increment (Fig. 6). All these results in single cells indicate that ATP probably induces the production of PGE<sub>2</sub> in the smooth



**Fig. 4** The  $I_K$  increment induced by ATP was completely abolished by the combination of two P2Y receptor antagonists. Effect of suramin (*Sur*) and RB2 on the ATP-induced  $I_K$  increment in single-airway smooth muscle cells from guinea pig.  $I_K$  were evoked by step depolarization from  $-60$  to  $50$  mV. ATP ( $1,000$  μM) induced a significant increment in the  $I_K$ , this effect was not modified by suramin (P2X and P2Y<sub>1,2,6,11,12,13</sub> receptor antagonist,  $100$  μM,  $n=4$ ) nor by RB2 (P2Y<sub>1,4,6,11,12,13</sub> receptor antagonist,  $100$  μM,  $n=5$ ) (b). However, combination of both drugs completely abolished the ATP-induced  $I_K$  increment ( $n=7$ ) (c). These results might suggest that during the ATP-induced  $I_K$  increment, P2Y<sub>2</sub> or P2Y<sub>4</sub> are the main purinergic receptors involved in this response. *Insets* correspond to examples of the original recordings of K<sup>+</sup> currents after each treatment. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$  (ATP group vs. control group); † $p<0.05$ ; †† $p<0.01$  (a, b, Sur+ATP and RB2+ATP groups vs. control group; c Sur+RB2+ATP group vs. ATP group; repeated measures of analysis of variance followed by Tukey–Kramer multiple comparisons test). *Insets* correspond to examples of the original recordings of K<sup>+</sup> currents. *Symbols* represent mean±SEM



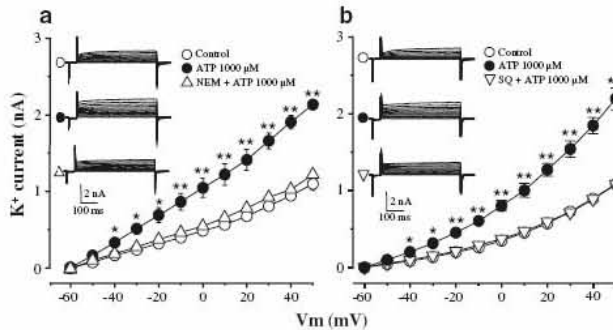
**Fig. 5** The ATP-induced  $I_K$  increment is mediated at least by two types of  $K^+$  channels. Effect of 4-aminopyridine (4-AP; a delayed rectifier  $K^+$  channels blocker) and iberiotoxin (IBTX; a high-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels blocker) on the ATP-induced  $I_K$  increment in single tracheal smooth muscle cells from guinea pig.  $I_K$  were evoked by step depolarization from  $-60$  to  $50$  mV. The addition of  $1,000 \mu\text{M}$  ATP in the presence of 4-AP ( $3 \text{ mM}$ ), increased  $I_K$  which were blocked by IBTX ( $n=7$ ). Furthermore, ATP addition in the presence of IBTX, also increased

$I_K$  which were blocked by 4-AP ( $n=6$ ). These results suggest that ATP activates a high-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  and a delayed rectifier  $K^+$  channels. Insets correspond to examples of the original recordings of  $K^+$  currents after each treatment. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , between 4-AP group or IBTX group with respect to their respective experimental groups (repeated measures of analysis of variance followed by Tukey–Kramer multiple comparisons test). Symbols represent mean  $\pm$  SEM

muscle, which in turns activates a G protein, most likely Gs, and the adenylyl cyclase to induce relaxation of the airway smooth muscle.

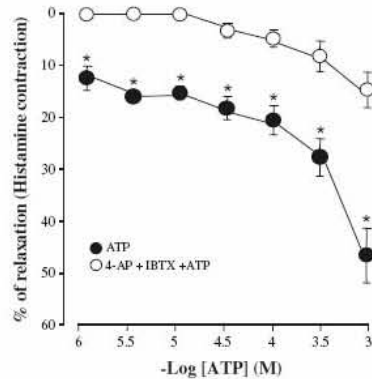
To corroborate that the  $K^+$  currents activated by ATP had a physiological role in the relaxation induced by this purine, we performed some experiments in organ baths. Tissues were precontracted with  $10 \mu\text{M}$  histamine, and then a cumulative concentration response curve to ATP was

constructed. Under this condition, ATP ( $n=5$ ) produced a relaxation which was concentration dependent. This ATP-induced relaxation was significantly diminished by the combination of  $3 \text{ mM}$  4-AP and  $320 \text{ nM}$  IBTX ( $n=4$ ), demonstrating that voltage-dependent  $K^+$  and  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  channels activated by ATP play a major role in this relaxation (Fig. 7).



**Fig. 6** G proteins and adenylyl cyclase activity are required for the ATP effect on  $I_K$ . Effect of SQ 22,536 (SQ; adenylyl cyclase inhibitor) and *N*-ethylmaleimide (NEM; which uncouples G proteins from several receptors) on the ATP-induced  $I_K$  increment in single tracheal smooth muscle cells from guinea pig.  $I_K$  were evoked by step depolarization from  $-60$  to  $50$  mV. ATP produced an increment in the  $I_K$ . This ATP increment in the  $I_K$  was completely abolished by NEM (a

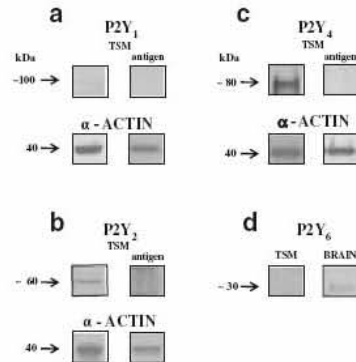
$30 \mu\text{M}$ ,  $n=5$ ) and SQ (b  $100 \mu\text{M}$ ,  $n=6$ ) indicating that ATP most likely through  $\text{PGE}_2$ , is activating a G protein, probably a Gs, and, subsequently, the adenylyl cyclase to increase cAMP and the  $I_K$ . \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (repeated measures of analysis of variance followed by Tukey–Kramer multiple comparisons test). Insets correspond to examples of the original recordings of  $K^+$  currents. Symbols represent mean  $\pm$  SEM



**Fig. 7** The relaxation induced by ATP was inhibited by two  $K^+$  channels antagonists. Effect of 4-aminopyridine (4-AP; 3 mM, a delayed rectifier  $K^+$  channels blocker) and ibenotoxin (IBTX, 320 nM, a high-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels blocker) on the ATP-induced relaxation in histamine (10  $\mu$ M) precontracted airway smooth muscle ( $n=4$ ). In this figure, we constructed a cumulative concentration response curve to ATP ( $n=5$ ). These results suggest that ATP activates a high-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  and a delayed rectifier  $K^+$  channels to produce relaxation of the airway smooth muscle. \* $p<0.01$ ; symbols represent mean $\pm$ SEM

P2Y<sub>4</sub> and P2Y<sub>2</sub> are the main purinergic receptors found in airway smooth muscle

Analysis of densitometry data from Western blots showed that, from the four P2Y receptors explored,



**Fig. 8** P2Y<sub>4</sub> and P2Y<sub>2</sub> are the main purinergic receptor expressed in tracheal airway smooth muscle (TSM) from guinea pig. Panels a–d correspond to representative blots for P2Y<sub>1</sub> (~100 kDa), P2Y<sub>2</sub> (~60 kDa), P2Y<sub>4</sub> (~80 kDa), and P2Y<sub>6</sub> (~30 kDa), shown by an arrow. The molecular mass is expressed according to the specifications of the antibody commercial data sheets.  $\alpha$ -Actin (40 kDa) was blotted as a control for protein load. To determine specificity of immunolab-

elling, the antigen was used to saturate the primary antibody. Since antigen for P2Y<sub>6</sub> antibody was not available, we used brain as positive control. **e** Densitometry data analysis from P2Y receptors Western blot from guinea pig tracheal smooth muscle. Bars represent mean $\pm$ SEM. \* $p<0.01$  compared with P2Y<sub>1</sub> receptors ( $n=6$ ); † $p<0.01$  compared with P2Y<sub>2</sub> receptors ( $n=4$ ), analysis of variance followed by Tukey's multiple comparisons test. P2Y<sub>4</sub> ( $n=4$ ) and P2Y<sub>6</sub> ( $n=6$ )

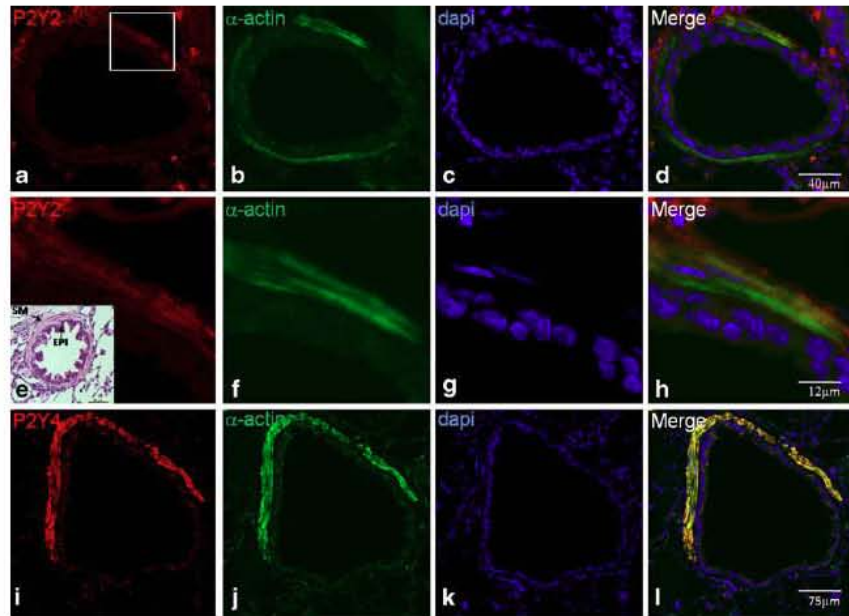
P2Y<sub>4</sub> and P2Y<sub>2</sub> are the main receptors found in guinea pig airway smooth muscle and the P2Y<sub>1</sub> receptor seems to be less expressed in this tissue, while P2Y<sub>6</sub> was not found (Fig. 8). We only performed Western blots experiments for P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, and P2Y<sub>6</sub>, because they are the main purinergic receptors found in human airway smooth muscle [11].

Confocal images obtained from guinea pig lungs showed fluorescence, mainly to P2Y<sub>4</sub> and P2Y<sub>2</sub> receptors in airway smooth muscle (stained red) although with less intensity for P2Y<sub>2</sub> receptors (Fig. 9a, e, and i). Antibody against  $\alpha$ -actin shows fluorescence (stained green) in the bronchial smooth muscle (Fig. 9b, f, and j). Merged images show (Fig. 9d, h, and l) that P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>4</sub> receptors are located in the bronchial smooth muscle. The negative control using the antigen to saturate the primary antibody to P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>4</sub> receptors did not show any fluorescence (Fig. 10a, e). Antibodies against P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>6</sub> receptors did not show fluorescence to these receptors in the airway smooth muscle (Fig. 11a, e). Thus, these results demonstrate that, from the purinergic receptors considered in this study, P2Y<sub>4</sub> and P2Y<sub>2</sub> are the main receptors expressed in airway smooth muscle.

## Discussion

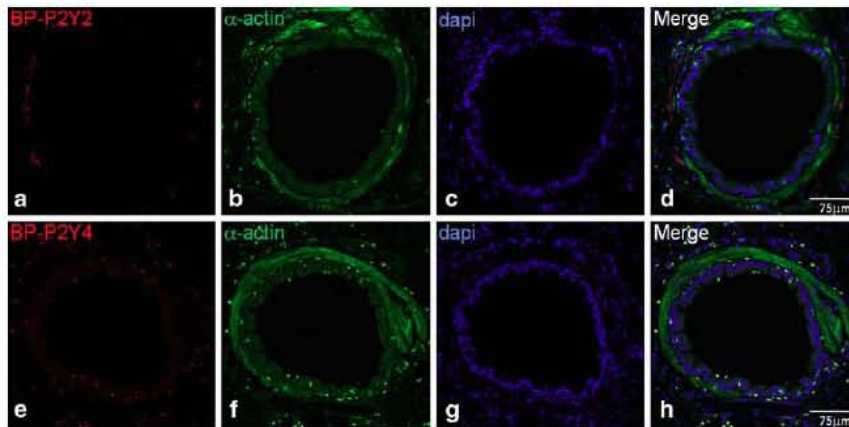
Our main observations are that ATP action on at least two different P2Y receptors, likely P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>4</sub>, mediates relaxation in the guinea pig airway smooth muscle, which





**Fig. 9** Confocal microscopy for P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>4</sub> receptors in guinea pig airway smooth muscle. Confocal images obtained from guinea pig lungs showed fluorescence, mainly to P2Y<sub>2</sub> (a) and P2Y<sub>4</sub> (i) receptors (stained *red*) although with less intensity for P2Y<sub>2</sub>. Antibody against  $\alpha$ -actin shows fluorescence (stained *green*) in the bronchial smooth muscle (b, f, and j). d, h, and i Illustration of a merged image of (a,

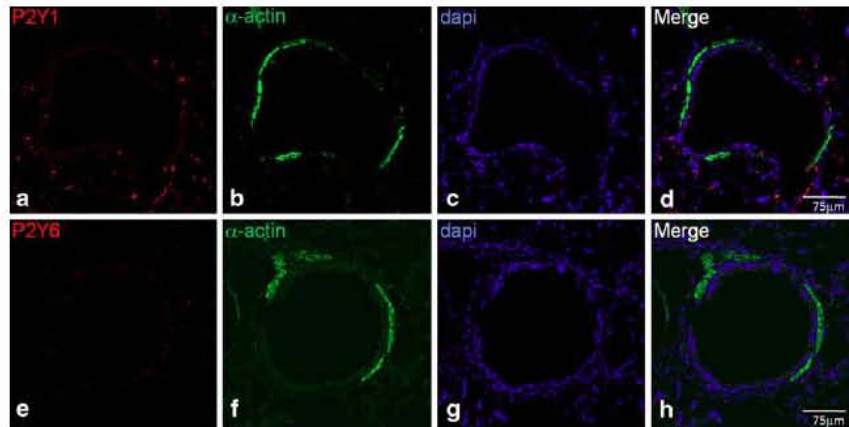
b, e, f, i, and j), showing that P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>4</sub> receptors are located in the bronchial smooth muscle. e–h Illustration of an amplified area (the *square* in (a)) of (a–d). e, g, and k Stained with dapi to observe the nucleus of the cells. The *insert* in (e) corresponds to hematoxylin–eosin staining and shows location of smooth muscle (SM) and airway epithelium (EPI)



**Fig. 10** Confocal images showing the negative controls using the blocking peptide (BP) to saturate the primary antibody to P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>4</sub> receptors. In these images, there is no fluorescence for either of the P2Y receptors in the bronchial smooth muscle from guinea pig

lungs. In (a) and (e), there is some fluorescence after the incubation with the BP, which probably corresponds to nonspecific binding to erythrocytes





**Fig. 11** Confocal microscopy for P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>6</sub> receptors in guinea pig airway smooth muscle. Confocal images obtained from guinea pig lungs showed no fluorescence to P2Y<sub>1</sub> (a) nor for P2Y<sub>6</sub> (e) receptors. Antibody against  $\alpha$ -actin shows fluorescence (stained green) in the airway smooth muscle (b, f). In (d) and (h), merged images of (a) and

(b) are shown while in (e) and (f), it is shown that P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>6</sub> receptors are not located in the bronchial smooth muscle. In (c) and (g), the slides were stained with dapi to observe the nucleus of the cells

occurs by smooth muscle prostaglandin production (epithelium independent), and subsequent activation of voltage-dependent K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels. Activation of these K<sup>+</sup> channels occurs through adenylate cyclase-cAMP pathway.

The airway smooth muscle relaxation induced by ATP has been demonstrated in various animal species, including humans [3, 10, 12, 19]. In guinea pig, this response has been reported to be mediated by PGE<sub>2</sub> production [12] and in rabbit tracheal smooth muscle the ATP-induced relaxation was reported to be mediated by P2 receptors on the airway epithelium [3]. In this manuscript, we corroborated that the ATP induces relaxation in tracheal rings is a prostaglandin-dependent since it was prevented by indomethacin treatment, but independent from the epithelium. Recently, we have shown that ATP-induced contraction is also prevented by the same treatment or by epithelium removal [9]. The relaxation however, persisted after the removal of the epithelium, indicating that the muscle cells are producing prostaglandins themselves, probably PGE<sub>2</sub>. The relaxation effect of PGE<sub>2</sub> in airway smooth muscle has been demonstrated to be mediated by the stimulation of EP<sub>2</sub>/EP<sub>4</sub> receptors producing the accumulation of cAMP and pKa-dependent phosphorylation [29].

Activation of phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) is an obligated step for eicosanoids production (i.e., PGE<sub>2</sub>) and it is likely that ATP modulates PLA<sub>2</sub> in airway smooth muscle by elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>). Two types of cytosolic PLA<sub>2</sub> are known to be expressed in

vascular smooth muscle cells, one Ca<sup>2+</sup> independent and another Ca<sup>2+</sup> dependent. The former PLA<sub>2</sub> is activated by cytosolic ATP through a mechanism that is independent of substrate organization and does not require participation of intermediary kinases. The Ca<sup>2+</sup>-dependent PLA<sub>2</sub> is activated by physiologic increments in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> [18]. In a previous study, we showed that ATP, through P2 receptors, can raise [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in airway smooth muscle cells [9], and therefore, it is likely that this effect increases prostaglandins production (PGE<sub>2</sub>) by stimulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent PLA<sub>2</sub>. Alternatively, activation of purinoceptors in this smooth muscle might modulate the Ca<sup>2+</sup> independent PLA<sub>2</sub> through an unknown mechanism.

Various observations would indicate that P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>4</sub> are the main purinoceptors involved in the ATP-induced relaxation. First, the relaxation was mimicked by P2Y receptor agonists (UTP and ATP $\gamma$ S) and was inhibited by NEM, which is known to uncouple G proteins from several membrane receptors. NEM findings are in agreement with our previous results [9], which indicated that P2Y receptors are coupled to G<sub>q/11</sub> in airway smooth muscle. Therefore, when stimulated, P2Y receptors promote IP<sub>3</sub>, initiating the signal pathway for [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase, and this induces relaxation [9]. Second, this relaxation was only inhibited by co-application of suramin and RB2, the former is known to antagonize all P2Y receptors but not P2Y<sub>4</sub> and the latter inhibits all P2Y receptors but has no activity on P2Y<sub>2</sub> [7, 30, 31, 33]. Third, the presence of P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>4</sub> receptors was also demonstrated in smooth muscle cells by Western

blot and confocal microscopy. P2Y<sub>11</sub> receptors have been found in other smooth muscles such as colonic smooth muscle [13]. This purinoceptor can couple both to Gs and Gq/11 proteins [1]. Thus, the activation of this receptor would be expected to induce relaxation, directly in the smooth muscle, through Gs/cAMP. However, it is unlikely that P2Y<sub>11</sub> receptor play an essential role in the ATP-induced relaxation because this effect was abolished by indomethacin. If there is any participation of this purinoceptor, we should be observing some relaxation in the presence of indomethacin, which does not occur. It is also unlikely that activation P2Y<sub>12</sub> and P2Y<sub>13</sub> mediate the ATP-induced relaxation reported here because these receptors cause inhibition of adenylate cyclase activity [31] and the relaxation involves activation of this enzyme. In fact, P2Y<sub>12</sub> and P2Y<sub>13</sub> receptors have been involved in vascular contraction and remodeling of the pulmonary artery adventitial vasa vasorum endothelial cells [17, 32]. Thus, a possible role of these purinoceptors in the relaxation induced by ATP in airway smooth muscle is improbable.

Inhibition of ectonucleotidases in the guinea pig tracheal rings with ARL 67156 shifted the concentration response curve to ATP to the left, suggesting that, in our experimental conditions, this purine is enzymatically hydrolyzed. Under these conditions, the inhibitory effects of suramin plus RB2 were surmounted at high concentrations of ATP, which is consistent with previous findings indicating that these two antagonists are competitive on P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>4</sub> receptors [33]. Similarly, The ATP-induced relaxation resistant to suramin plus RB2, in the absence of ARL, could be the result of the competitive effect of these antagonists. Another possible explanation is that the remaining relaxation is mediated by adenosine acting through P1 receptors as proposed by Pipper and Hollingsworth [21]. In support to this hypothesis, at least part of the ATP appears to be hydrolyzed under our experimental conditions, and it is well known that its hydrolysis produces adenosine.

ATP activates at least two different populations of K<sup>+</sup> channels, which is supported by the fact that ATP-induced effect on I<sub>K</sub> was totally prevented by the co-administration of IBTX and 4-AP but not by the individual administration of any of these antagonists. IBTX is a specific blocker of the high-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels [16], whereas, 4-AP is known to block the voltage-dependent delayed rectifier K<sup>+</sup> channels in airway smooth muscle [27, 34], which indicate that these channels mediate most of the effects of ATP on I<sub>K</sub>. Previous studies in several smooth muscles, including guinea pig tracheal preparations, have reported the modulation of delayed rectifier K<sup>+</sup> channels as well as the high-conductance calcium-dependent potassium channels by cAMP-dependent pKa [2, 8, 15, 28]. Our evidence shows that the ATP modulatory effects on K<sup>+</sup> channels are through a biochemical cascade that involves

P2Y receptors, prostaglandin production (probably PGE<sub>2</sub>), that in turns activates adenylyl cyclase activity, because they were prevented by NEM, P2Y receptor blockers, indomethacin, and SQ 22,536.

ATP stimulatory effect on K<sup>+</sup> channels is also likely mediated by both, P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>4</sub> receptors. Thus, this effect was prevented by the combination of suramin and RB2 and not by the individual application of any of these P2Y receptor antagonists. As it was discussed previously, the co-administration of both antagonists can be expected to block all P2Y receptors but individual applications would spare either P2Y<sub>2</sub> (resistant to RB2) or P2Y<sub>4</sub> (resistant to suramin) receptors.

Additionally, our data in tracheal rings indicate that activation of K<sup>+</sup> channels mediates ATP-induced relaxation since co-administration of K<sup>+</sup> channels blockers 4-AP and IBTX significantly diminished this ATP effect.

Altogether, these data point out that in airway smooth muscle, ATP activates P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>4</sub> receptors, inducing [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase as reported previously [9] and favoring PGE<sub>2</sub> release from this tissue, which in turn activates cAMP-dependent K<sup>+</sup> channels to produce relaxation.

In conclusion, our results suggested that ATP: (1) produces airway smooth muscle relaxation by inducing the production of bronchodilator prostaglandins, most likely involving smooth muscle P2Y<sub>4</sub> and P2Y<sub>2</sub> receptors; (2) induces I<sub>K</sub> increment through the activation of the delayed rectifier K<sup>+</sup> channels and the high-conductance Ca<sup>2+</sup>-dependent potassium channels; (3) this I<sub>K</sub> increment is mediated by smooth muscle prostaglandin production which in turns increase cAMP signaling pathway and these channels are implicated in the ATP-induced relaxation.

**Acknowledgments** We acknowledge the Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Medicina, UNAM, and CONACYT for the scholarship to Erik Cruz-Valderrama. We thank Bettina Sommer from the Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial, INER, for her English correction of this manuscript. This study was partly supported by a grant from CONACYT (81409) and DGAPA-UNAM (IN201810-3) to Dr Luis M. Montaño.

**Disclosures** No conflicts of interest are declared by the author(s).

## References

1. Abbacchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA (2006) International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 58:281–341
2. Aiello EA, Malcolm AT, Walsh MP, Cole WC (1998)  $\beta$ -Adrenoceptor activation and pKa regulate delayed rectifier K<sup>+</sup> channels of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 275: H448–459

3. Aksoy MO, Kelsen SG (1994) Relaxation of rabbit tracheal smooth muscle by adenine nucleotides: mediation by P<sub>2</sub>-purinoceptors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10:230–236
4. Bergner A, Sanderson MJ (2002) ATP stimulates Ca<sup>2+</sup> oscillations and contraction in airway smooth muscle cells of mouse lung slices. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L1271–1279
5. Bramley AM, Samhoun MN, Piper PJ (1990) The role of the epithelium in modulating the responses of guinea-pig trachea induced by bradykinin in vitro. *Br J Pharmacol* 99:762–766
6. Breslin JW, Pappas PJ, Cerveira JJ, Hobson RW 2nd, Duran WN (2003) VEGF increases endothelial permeability by separate signaling pathways involving ERK-1/2 and nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H92–H100
7. Burnstock G (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87:659–797
8. Cole WC, Clement-Chomienne O, Aiello EA (1996) Regulation of 4-aminopyridine-sensitive, delayed rectifier K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle by phosphorylation. *Biochem Cell Biol* 74:439–447
9. Flores-Soto E, Carbajal V, Reyes-Garcia J, Garcia-Hernandez LM, Figueroa A, Checa M, Barajas-Lopez C, Montano LM (2011) In airways ATP refills sarcoplasmic reticulum via P<sub>2</sub>X smooth muscle receptors and induces contraction through P<sub>2</sub>Y epithelial receptors. *Pflugers Arch* 461:261–275
10. Fortner CN, Breyer RM, Paul RJ (2001) EP<sub>2</sub> receptors mediate airway relaxation to substance P, ATP and PGE<sub>2</sub>. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281:L469–474
11. Govindaraju V, Martin JG, Maghni K, Ferraro P, Michoud MC (2005) The effects of extracellular purines and pyrimidines on human airway smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 315:941–948
12. Kamikawa Y, Shimo Y (1976) Mediation of prostaglandin E<sub>2</sub> in the biphasic response to ATP of the isolated tracheal muscle of guinea-pigs. *J Pharm Pharmacol* 28:294–297
13. King BF, Townsend-Nicholson A (2008) Involvement of P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> and P<sub>2</sub>Y<sub>11</sub> purinoceptors in parasympathetic inhibition of colonic smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 324:1055–1063
14. Koh SD, Dick GM, Sanders KM (1997) Small-conductance Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels activated by ATP in murine colonic smooth muscle. *Am J Physiol* 273:C2010–2021
15. Koh SD, Sanders KM, Carl A (1996) Regulation of smooth muscle delayed rectifier K<sup>+</sup> channels by protein kinase A. *Pflugers Arch* 432:401–412
16. Liu B, Freyer AM, Hall IP (2007) Bradykinin activates calcium-dependent potassium channels in cultured human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L898–907
17. Lyubchenko T, Woodward H, Veo KD, Burns N, Nijmeh H, Lyubchenko GA, Stenmark KR, Gerasimovskaya EV (2011) P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> and P<sub>2</sub>Y<sub>13</sub> purinergic receptors mediate Ca<sup>2+</sup> signaling and proliferative responses in pulmonary artery vasa vasorum endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 300:C266–275
18. Miyake R, Gross RW (1992) Multiple phospholipase A<sub>2</sub> activities in canine vascular smooth muscle. *Biochim Biophys Acta* 1165:167–176
19. Mounkaila B, Marthan R, Roux E (2005) Biphasic effect of extracellular ATP on human and rat airways is due to multiple P<sub>2</sub> purinoceptor activation. *Respir Res* 6:143
20. North RA (2002) Molecular physiology of P<sub>2</sub>X receptors. *Physiol Rev* 82:1013–1067
21. Piper AS, Hollingsworth M (1996) ATP and β, γ-methylene ATP produce relaxation of guinea-pig isolated trachealis muscle via actions at P<sub>1</sub> purinoceptors. *Eur J Pharmacol* 307:183–189
22. Ralevic V (2001) Mechanism of prolonged vasorelaxation to ATP in the rat isolated mesenteric arterial bed. *Br J Pharmacol* 132:685–692
23. Ruan YC, Wang Z, Du JY, Zuo WL, Guo JH, Zhang J, Wu ZL, Wong HY, Chung YW, Chan HC, Zhou WL (2008) Regulation of smooth muscle contractility by the epithelium in rat vas deferens: role of ATP-induced release of PGE<sub>2</sub>. *J Physiol* 586:4843–4857
24. Serir K, Hayoz S, Fanchaouy M, Beny JL, Bychkov R (2006) A delayed ATP-elicited K<sup>+</sup> current in freshly isolated smooth muscle cells from mouse aorta. *Br J Pharmacol* 147:45–54
25. Shapiro MS, Wölmuth LP, Hille B (1994) Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by PTX-sensitive G-proteins is blocked by N-ethylmaleimide in rat sympathetic neurons. *J Neurosci* 14:7109–7116
26. Smith MM, Harden TK (1984) Modification of receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase in NG108-15 neuroblastoma X glioma cells by n-ethylmaleimide. *J Pharmacol Exp Ther* 228:425–433
27. Snetkov VA, Ward JP (1999) Ion currents in smooth muscle cells from human small bronchioles: presence of an inward rectifier K<sup>+</sup> current and three types of large conductance K<sup>+</sup> channel. *Exp Physiol* 84:835–846
28. Tanaka Y, Yamashita Y, Yamaki F, Horinouchi T, Shigenobu K, Koike K (2003) MaxiK channel mediates β<sub>2</sub>-adrenoceptor-activated relaxation to isoprenaline through cAMP-dependent and -independent mechanisms in guinea-pig tracheal smooth muscle. *J Smooth Muscle Res* 39:205–219
29. Tilley SL, Hartney JM, Erikson CJ, Jania C, Nguyen M, Stock J, McNeisch J, Valancius C, Panettieri RA Jr, Penn RB, Koller BH (2003) Receptors and pathways mediating the effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on airway tone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284:L599–606
30. Van Crombruggen K, Van Nassauw L, Timmermans JP, Lefebvre RA (2007) Inhibitory purinergic P<sub>2</sub> receptor characterisation in rat distal colon. *Neuropharmacology* 53:257–271
31. von Kugelgen I (2006) Pharmacological profiles of cloned mammalian P<sub>2</sub>Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* 110:415–432
32. Wihlborg AK, Wang L, Braun OO, Eyjolfsson A, Gustafsson R, Gudbjartsson T, Erlinge D (2004) ADP receptor P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> is expressed in vascular smooth muscle cells and stimulates contraction in human blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1810–1815
33. Wildman SS, Unwin RJ, King BF (2003) Extended pharmacological profiles of rat P<sub>2</sub>Y<sub>2</sub> and rat P<sub>2</sub>Y<sub>4</sub> receptors and their sensitivity to extracellular H<sup>+</sup> and Zn<sup>2+</sup> ions. *Br J Pharmacol* 140:1177–1186
34. Zhao LM, Xu YJ, Zhang ZX, Ni W, Chen SX (2004) Effect of passive sensitization by serum from allergic asthmatic patients on the activity and expression of voltage-dependent delayed rectifier potassium channel in human bronchial smooth muscle cells. *Chin Med J (Engl)* 117:1630–1636