

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

EN EL MUSCULO LISO DE LAS VIAS AEREAS EL ATP
FAVORECE LA ENTRADA DE Ca^{2+} AL RETICULO
SARCOPLASMICO VIA RECEPTORES P2X E INDUCE
CONTRACCION A TRAVES DE RECEPTORES P2Y
EPITELIALES.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

LQC. EDGAR FLORES SOTO

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS MANUEL MONTANO RAMIREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	4
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN	11
El ion Ca^{2+} y su participación en la <u>contracción</u> del músculo liso de las vías aéreas	11
Principales mecanismos que mantienen las $[\text{Ca}^{2+}]_i$	13
Importancia fisiológica del $\text{NCX Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ en su forma reversa	14
Estructura y función del ATP	16
El ATP como neurotransmisor	18
Almacenamiento, liberación y degradación del ATP	18
Papel fisiológico de los receptores purinérgicos	20
Papel del ATP en la regulación del Ca^{2+} en el MLVA de cobayo	29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
HIPÓTESIS	31
OBJETIVO GENERAL	31
MATERIAL Y MÉTODOS	32
Órganos Aislados	32
Medición de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células de músculo liso traqueal de cobayo.	33

	3
Mediciones simultaneas de contracción y $[Ca^{2+}]_i$	36
Patch clamp	37
Western blot	38
FÁRMACOS	39
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	39
RESULTADOS	40
El ATP induce contracción a traves de la producción de Tromboxano A ₂	40
El incremento de $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por el ATP no participan en la contracción	42
El ATP activa al NCX_{REV} via receptores P2X	44
El KB-R7943 no modifica las corrientes de Ca^{2+} y disminuye ligeramente la contracción	53
Los receptores P2X ₁ , P2X ₃ , se localizan principalmente en el MLVA	55
DISCUSIÓN	56
CONCLUSIÓN	60
BIBLIOGRAFIA	61
ANEXO I	76
ANEXO II	83
ANEXO III	98
ANEXO IV	110

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
ADA	Adenosina Desaminasa
Ach	Acetilcolina
ADP	Adenosina Difosfato
AMP	Adenosina Monofosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
ATP	γ -S Sal disódica de 5'-trifosfato de Adenosina (ATP), sal tetralitio de 5' [γ -tio] trifosfato de adenosina
Ca ²⁺	Calcio
[Ca ²⁺] _i	Concentraciones de Ca ²⁺ intracelular
DAG	Diacilglicerol
D-MEM	Medio esencial mínimo
DPCPX	8-ciclopentil-1,3-dimetilxantina
D-600	Metoxiverapamil
5-HT	5- Hidrotriptamina, serotonina
I _{clca}	Corriente de cloro dependiente de Ca ²⁺
IP3	1,4-5 trifosfato de inositol
KB-R7993	2-[2-[4-(4-nitrobenziloxi)fenil]etil]isotiourea mesilato
KD	Kilo Daltones
LiCl	Cloruro de Litio
LVA	Canales de Ca ²⁺ Activado por bajo Voltaje
MLC	Cadena ligera de la miosina
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de la miosina
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de la miosina

MLVA	Músculo liso de las vías aéreas.
NCX	Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
NCX_{REV}	Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en su forma reversa
NEM	N-etilmaleimida
NSCCs	Canales cationicos inespecíficos
PLC_β	Fosfolipasa C_β
PMCA	ATP-asa de Ca^{2+} de membrana plasmática
PPADS	Sal tetrasódica de piridoxal fosfato-6-azo(benzeno-2,4- ácido di sulfónico)
RAPG	Receptores acoplados a proteínas G
RB2	Reactivo Azul 2
ROC	Canales operados por el receptor
ROCK	RhoA- Cinasa
RS	Retículo Sarcoplásmico
RyR	Receptor de Rianodina
R-max	Cociente de fluorescencia máxima 340/380
R-min	Cociente de fluorescencia mínima 340/380
SEA 0400	[2-[4-[(2,5-Difluorofenil)methoxy]fenoxi]-5-etoxianiline]
SERCA	ATP-asa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico
SK-F96365	1-[2-(4-Metoxifenil)-2-[3-(4-metoxifenil)propoxy]etil-1 <i>H</i> -imidazole hydrochloride
SN-6	(2-[[4-[(4-nitrofenil)metoxi]fenil]metil]-4-tiazol dinocarboxílico ácido etil ester)
SOC	Canal operado por el almacén o Entrada Capacitativa
TNP-ATP	2', 3'-O-(2,4,6-trinitrofenil) sal trisódica de 5'-trifosfato de adenosina monolítico

TMB-8	8-(Dietilamino)octil-3,4,5-trimetoxibenzoato hidrocloruro
UDP	Uridina difosfato
UTP	Uridina Trifosfato
VDC	Canales de Ca ²⁺ Activado por alto Voltaje

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA	TITULO	PÁGINA
1	Estructura del ATP	17
2	Estructura molecular y selectividad de los receptores purinérgicos P2X, P2Y y P1	23
3	Efecto del ATP y del ATP γ -S con y sin indometacina en el músculo liso traqueal de cobayo.	40
4	Efecto de los antagonistas de los receptores purinérgicos (P2) en la respuesta de contracción inducida por 100 μ M de ATP en anillos traqueales de cobayos.	42
5	Registros originales de mediciones simultaneas de las [Ca ²⁺] _i y la contracción en tiras de músculo liso traqueal de cobayo inducidas por el ATP con y sin indometacina	43
6	Efecto del ATP en las [Ca ²⁺] _i y la contracción en tiras de músculo liso traqueal de cobayo sin epitelio.	44
7	Efecto de la Indometacina (Indo, 1 μ M) en la curva concentración respuesta de ATP en células traqueales de cobayo.	45
8	Efecto de los antagonista P2 y del KB-R7943 en los incrementos del [Ca ²⁺] _i inducido por ATP	46
9	Caracterización de los mecanismos de transducción que incrementan las [Ca ²⁺] _i inducidos por el ATP.	47
10	Efecto del ATP sobre el NCX _{REV} en células de MLVA de cobayo	50
11	Papel del P2X y del NXC _{REV} en el relleno de Ca ²⁺ del RS en células de MLVA de cobayos.	52

12	Efecto del KB-R7943 (10 μ M) en los estímulos sucesivos por ATP (100 μ M) en anillos traqueales de cobayo.	53
13	Efecto del KB-R7943, nifedipina y D-600 en la contracción y las corrientes de Ba ²⁺ .	54
14	Caracterización de los receptores P2X en el MLVA a través de Western blot	55

TABLAS	TITULO	PÁGINA
1	Enzimas que participan en el metabolismo del ATP extracelular	20
2	Características de los subtipos de los receptores canal P2X	28
3	Características de los receptores metabotropicos P2Y	29

RESUMEN

En el músculo liso de las vías aéreas el ATP favorece la entrada de Ca^{2+} al retículo sarcoplásmico vía receptores P2X e induce contracción a través de receptores P2Y epiteliales.

En músculo liso de las vías aéreas (MLVA), el ATP induce una contracción asociada con incrementos en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). El Ca^{2+} citosólico es sacado al espacio extracelular por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) en su forma normal. Algunos agonistas activan al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ a su forma reversa (NCX_{REV}), induciendo la entrada de Ca^{2+} al espacio citoplasmático. En este trabajo investigamos si el ATP a través de su receptor P2X, activa al NCX_{REV} y si el incremento de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es utilizado para la contracción o para favorecer la entrada de Ca^{2+} al retículo sarcoplásmico (RS) en MLVA de cobayo. El ATP produce una contracción en el MLVA, este efecto fue bloqueado por la indometacina. La suramina y el RB2 disminuyen la contracción inducida por el ATP; El PPADS no modifica esta respuesta. En células recién dissociadas, el ATP produce un incremento en las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que no es modificado por la indometacina. En tiras traqueales, mediante la técnica de mediciones simultáneas, el ATP produce cambios bifásicos en las $[\text{Ca}^{2+}]_i$, (un pico seguido de una meseta) acompañados por una contracción. La eliminación del epitelio y la indometacina abaten la contracción, pero no el pico de Ca^{2+} , mientras que la meseta fue disminuida por la indometacina. En células recién dissociadas, el incremento de Ca^{2+} inducido por ATP fue inhibido por suramina (~96%), PPADS (~40%) y RB2 (~57%). El ATP aumento la actividad del NCX_{REV} y este efecto fue bloqueado por SKF 96365 y TNP-ATP. Los receptores P2X₁ y P2X₃ fueron corroborados por Western blot en el MLVA. La activación del NCX_{REV} y el ATP en presencia de RB2 favorecen el relleno de Ca^{2+} del RS. En anillos traqueales la estimulación sucesiva con ATP fue disminuida con KB-R7943. Por lo tanto, podemos concluir que el ATP: 1) Indirectamente promueve la contracción del MLVA vía receptores epiteliales P2Y y vía la liberación de tromboxano A₂; 2) Los incrementos de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ son a través de receptores P2X y P2Y en el MLVA e independientes de prostaglandinas; 3) La activación de los receptores P2X₁ y P2X₃ y el NCX_{REV} favorecen el relleno de Ca^{2+} del RS.

ABSTRACT.

In airways ATP refills sarcoplasmic reticulum via P2X smooth muscle receptors and induces contraction through P2Y epithelial receptors.

In airway smooth muscle (ASM), ATP induces a contraction associated with the increase of $[Ca^{2+}]_i$. Cytosolic Ca^{2+} is extruded to the extracellular space by the Na^+/Ca^{2+} exchanger (NCX) in its normal mode. Some agonists activate the reverse mode of the NCX (NCX_{REV}), inducing Ca^{2+} entry. We investigated whether ATP, via P2X receptors, activates the NCX_{REV} and whether the increment in $[Ca^{2+}]_i$ is used for contraction or for the sarcoplasmic reticulum (SR) refilling in guinea pig ASM. ATP contracted the ASM and this effect was blocked by indomethacin. Suramin and RB2 diminished the contraction induced by ATP; PPADS did not modify this response. In myocytes, ATP produces an increase in $[Ca^{2+}]_i$ not modified by indomethacin. In tracheal strips, using simultaneous measurements, ATP induced a biphasic change in $[Ca^{2+}]_i$, (a Ca^{2+} peak followed by a plateau) accompanied by a contraction. Indomethacin or epithelium removal abolished this contraction, but not the Ca^{2+} peak, whereas the plateau was decreased by indomethacin. In myocytes, the ATP-induced $[Ca^{2+}]_i$ increment was inhibited by suramin (~96%), PPADS (~40%), and RB2 (~57%). ATP augmented the NCX_{REV} and this effect was abolished by SKF 96365 and TNP-ATP. P2X₁ and P2X₃ receptors were corroborated by immunoblotting of ASM. NCX_{REV} activation and ATP in the presence of RB2 favor the SR Ca^{2+} refilling. In tracheal rings, successive ATP stimulations were reduced with KB-R7943. Therefore, ATP: (1) indirectly promotes muscle contraction via epithelial P2Y receptors and prostaglandins release; (2) increases the $[Ca^{2+}]_i$ through a prostaglandin-independent manner by activating P2X and P2Y receptors in smooth muscle; and (3) activates P2X₁ and P2X₃ receptors and the NCX_{REV} which refills the SR.

INTRODUCCIÓN

El ion Ca^{2+} y su participación en la contracción del músculo liso de las vías aéreas.

El calcio (Ca^{2+}), es el mensajero intracelular más importante y el catión divalente de mayor prevalencia del organismo; es altamente versátil y puede regular diferentes funciones celulares como la exocitosis, transcripción, fertilización, proliferación celular, apoptosis y contracción de diferentes músculos (Berridge y col., 2003).

El músculo liso de la vía aérea (MLVA) es una célula mesenquimal habilitada para expresar una notable plasticidad fenotípica, cuya contracción y relajación están sometidas a regulación neurohumoral y moduladas por un complejo conjunto de mecanismos diseñados para funcionar de manera integrada y balanceada (Dettbarn y col., 1994, Horowitz y col., 1996). Su maquinaria contráctil está constituida básicamente por: *a*) filamentos gruesos (~ 12-15 nm) paralelos de miosina; *b*) filamentos finos (~ 7 nm) formados mediante unidades repetidas de actina, a la cual se encuentran unidas otras proteínas como la tropomiosina, la calponina y la caldesmina. *c*) otras estructuras proteínicas (cuerpos densos, filamentos intermedios (~10 nm)), compuesto por desmina en los músculos viscerales o vimentina en los tejidos vasculares, aportan cierta rigidez al miocito y son responsables, en parte, del mantenimiento del tono (Marín y col., 1999). La miosina es un hexámero que contiene un par de cadenas asimétricas pesadas (200-204 kDa), cada una de las cuales contiene cadenas ligeras de miosina (CLM) de 17 y 20 kDa. Las cadenas pesadas se asemejan a bastones de golf, de forma que es posible distinguir un cuerpo, en el que los bastones se enrollan entre sí en espiral, y dos cabezas globulares con sus cadenas ligeras asociadas, dispuestas como proyecciones laterales que sobresalen fuera del filamento; las cadenas ligeras se ubican 2 a cada lado de estas cabezas globulares (Marín y col., 1999). De acuerdo con la teoría de la contracción muscular por deslizamiento de los filamentos, el desarrollo de la tensión y contracción del MLVA aparece como resultado de las interacciones actina-miosina que producen movimientos relativos entre los filamentos gruesos y delgados (Kamm & Stull, 1985, Horowitz y col., 1996). Se ha demostrado que, para que estos deslizamientos se efectúen, es imprescindible que la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) haya fosforilado a la CLM de 20 kDa. Para que todo este proceso de contracción se active, Previamente, un agonista contráctil tiene que estimular a sus respectivos receptores

membranales acoplados a proteínas G (RAPG) específicas. Los RAPG tienen siete dominios ricos en residuos hidrófobos y que son transmembranales. Aunque los RAPG generalmente se esquematizan con el modelo de “serpentina”, se ha demostrado que están organizados como una canasta compuesta por los dominios transmembranales (Rohrer & Kobilka, 1998, Hockerman y col., 1996, Strader y col., 1995). De esta manera se forma una “bolsa” hidrófoba que parece indispensable para la interacción del ligando y el receptor. Los RAPG se han clasificado estructural y funcionalmente a través de su subunidad α . La familia $G\alpha_q$ tiene cinco miembros $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$, $G\alpha_{16}$. Una vez activada la $G\alpha_{q11}$ estimula a la fosfolipasa $C\beta$ ($PLC-\beta$) (Smrcka y col., 1991, Taylor y col., 1990). La $PLC\beta$ hidroliza al 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol y genera dos segundos mensajeros: el diacilglicerol (DAG) y el 1,4, 5-trifosfato de inositol (IP_3). En el MLVA, el IP_3 induce la movilización de calcio desde los almacenes citoplasmáticos, principalmente del retículo sarcoplásmico (RS), al ocupar los receptores de IP_3 que se encuentran en la membrana de éste organelo. La entrada de Ca^{2+} extracelular a través de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L también contribuye a la elevación de la concentración de Ca^{2+} intracelular y, principalmente, al relleno del RS. Se han identificado múltiples subtipos de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Tsien y col., 1988, 1991); estos canales pueden dividirse en función de su umbral de activación: activados por voltaje bajo (low-voltage activated; LVA) o activados por voltaje alto (high-voltage-activated; VDC) (Catterell y col., 2005). Este último grupo incluye a los canales tipo L, los más abundantes en el MLVA; se distinguen por su perfil farmacológico ya que son sensibles a dihidropiridinas, (Xu & Lipscombe, 2001). El incremento de las $[Ca^{2+}]_i$, promueve la interacción del complejo Ca^{2+} - calmodulina con la subunidad catalítica de la MLCK. La formación de este complejo permite la fosforilación de la cadena ligera de la miosina en la serina 19 (Ser 19) de la CLM de 20 kDa. La miosina fosforilada cataliza, en presencia de actina, la hidrólisis de adenosina trifosfato (ATP) a adenosina difosfato (ADP) y la liberación de energía subsiguiente posibilita el desplazamiento de los filamentos de actina a lo largo de la miosina, iniciando el proceso de contracción muscular (Horowitz y col. 1996). Al mismo tiempo, se activa otra vía de señalización, la RhoA-Cinasa (ROCK) cuya función es inactivar a la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP) para mantener la contracción. La disminución de las $[Ca^{2+}]_i$ a niveles basales, inactiva a ROCK, permitiendo

que la MLCP desfosforile a la cadena ligera de la miosina de 20 kDa y el músculo se relaje. (Somlyo & Somlyo, 2003)

Principales mecanismos que mantienen las $[Ca^{2+}]_i$.

Existen en el músculo liso de las vías aéreas, al menos tres transportadores responsables de mantener la $[Ca^{2+}]_i \sim 128$ nM en estado es reposo (Carvajal y col., 2005, Montañó & Bazan Perkins, 2005): 1) La ATPasa de Ca^{2+} de membrana plasmática (PMCA) que funciona transportando Ca^{2+} del citoplasma hacia el medio extracelular. 2) La ATPasa de Ca^{2+} de retículo sarcoplásmico (SERCA) que transporta Ca^{2+} del citoplasma al interior de retículo sarcoplásmico. Ambas proteínas utilizan ATP como fuente de energía para transportar Ca^{2+} en contra del gradiente electroquímico. 3) El intercambiador Na^+/Ca^{2+} en su fase normal (NCX), su función principal es sacar Ca^{2+} del citoplasma al espacio extracelular e introducir Na^+ del espacio extracelular al citoplasma (Sieck y col 1997).

Uno de los principales objetivos de esta tesis, es el estudio del NCX, ya que hasta la fecha su participación en la fisiología del músculo liso parece ser controversial. El NCX es una proteína que se localiza en la membrana plasmática de la mayoría de células del organismo. Su función principal es sacar 1 Ca^{2+} del citoplasma al espacio extracelular e introducir 3 Na^+ del espacio extracelular al citoplasma, sin gasto de ATP, utilizando la carga neta positiva del Na^+ .

Las primeras evidencias acerca de la existencia del intercambiador Na^+/Ca^{2+} se obtuvieron en la década de los 60's en miocitos cardiacos de cobayos por Reuter y Seits. En este contexto, otros investigadores publicaron el hallazgo sobre el sistema cotransportador o intercambiador Na^+/Ca^{2+} en axones de calamares (Baker y col., 1969). Posteriormente, se encontró en músculo cardiaco de cobayo, que el flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula era proporcional a la $[Na^+]_i$, es decir, se encontró una respuesta inotrópica positiva en la aurícula con un incremento intracelular de éste ión (Glitsch y col., 1970). Desde entonces, este intercambiador ha sido detectado prácticamente en todos los tejidos (DiPolo & Beauge, 2006).

Una de las características más importantes del NCX, desde el punto de vista funcional, es su capacidad de actuar en ambas direcciones; el factor principal que determina la dirección hacia la cual actúa, es el gradiente electroquímico del Na^+ y la despolarización de

la membrana plasmática. El incremento en las concentraciones intracelulares de Na^+ , en la región subplasmalemal (por debajo de la membrana plasmática, cercana al intercambiador), tiene la capacidad de revertir la dirección del NCX, es decir en su modo reverso (NCX_{REV}), lo cual produciría que el flujo de Ca^{2+} se dirija hacia el interior de la célula y el flujo de sodio hacia el exterior de la misma, dicho de otra forma, la dirección final a la cual se moverá el Ca^{2+} , está determinada principalmente por el gradiente de Na^+ , aunque también depende, en menor medida, del gradiente de K^+ y Ca^{2+} a través de la membrana plasmática. (Blaustein & Lederer, 1999, Matsuda y col., 1997, Watanabe y col., 2006).

Importancia fisiológica del $\text{NCX Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ en su forma reversa.

En células excitables como las de músculo liso cardíaco se ha reportado que durante un potencial de acción se incrementan temporalmente las $[\text{Na}^+]_i$, revirtiendo la dirección operacional del intercambiador, que resulta en un ingreso de Ca^{2+} . Una vez que la concentración de Na^+ disminuye en el interior de la célula, el intercambiador revierte su acción y el flujo de Ca^{2+} es dirigido hacia el exterior de la célula (Niggli y col., 1991). En este tejido el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ocurre por la activación de los VDC y el NCX_{REV} . Este incremento de Ca^{2+} intracelular es responsable de activar la liberación de Ca^{2+} del RS por los receptores de rianodina (RyR), mediante un evento denominado “liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} ”. Estos mecanismos parecen ser los responsables en gran medida del acople excitación-contracción en células cardíacas (Niggli y col., 1991, Bers, 1991, Fabiato 1985 y Lederer y col., 1989).

Las primeras evidencias experimentales del NCX en el MLVA mostraron resultados contradictorios entre las especies estudiadas. A mediados de los 90's, los primeros reportes evidenciaban una importante participación del NCX en el flujo de Ca^{2+} al espacio extracelular y la subsecuente disminución de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$, durante la estimulación por un agonista β_2 -adrenérgico en MLVA de bovino (Hirsch y col., 1996). Un año después un grupo de investigadores descartaban la importancia funcional del NCX en los mecanismos de regulación del Ca^{2+} en MLVA de perro (Janssen y col., 1997). Un par de años después, se encontró que las bajas temperaturas disminuían la función del NCX resultando en incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que originaban broncoconstricción en MLVA de ovejas (Mustafa y col., 1999).

A partir del 2000 varios autores han reportado e involucrado directamente la participación del NCX_{REV} como uno de los principales mecanismos responsables en la regulación del Ca^{2+} intracelular y de la contracción. Hirota y col., (2007), encontraron en el MLVA de bovino que la estimulación con diferentes agonistas (ACh, Histamina y 5-HT) movilizaban Ca^{2+} del RS, proponiendo que el vaciamiento del RS activaba a los canales de entrada capacitativa u operados por el almacén (SOC) así como a los canales catiónicos inespecíficos operados por receptor (ROC). Ambos mecanismos permiten la entrada de Ca^{2+} y Na^+ al citoplasma, este último induce la fase reversa del NCX en MLVA de bovino, permitiendo la entrada de Ca^{2+} al citoplasma para favorecer el relleno del RS (Hirota y col., 2007, Hirota & Janssen, 2007). Recientemente, también reportaron en el músculo liso de cobayo que la Histamina, vía su receptor H_1 , estimula la producción de IP_3 , produciendo liberación de Ca^{2+} del RS activando a SOC y ROC favoreciendo el modo reverso del NCX, incrementando los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Asimismo, encontraron que este incremento de Ca^{2+} activaba a las corrientes de cloro dependientes de Ca^{2+} (I_{ClCa}) produciendo una despolarización y una apertura en los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, postulando que los incrementos de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a través del NCX_{REV} son importantes para sostener la contracción inducida por la histamina en este tejido (Algara-Suárez y col., 2007). Asimismo, en el músculo liso bronquial de humano, se reportó que la acetilcolina induce ondas de Ca^{2+} asincrónicas, donde, el NCX_{REV} , los VDC tipo L, la SERCA, los RYR y los canales catiónicos inespecíficos (SOC, ROC), están implicados en la generación de estas ondas y de mantener la contracción tónica (Dai y col., 2007, Cobar y col., 2010).

Se han encontrado varias isoformas del NCX en diferentes tejidos (NCX_1 , NCX_2 y NCX_3) y en MLVA se ha reportado que se encuentra la isoforma NCX_1 (Mejía-elizondo y col., 2001) y en vista de la importancia del NCX_{REV} en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, se sintetizaron varios inhibidores de esta fase. Al principio se utilizó la amilorida, este compuesto inhibe varios transportadores dependientes de Na^+ como el $\text{NCX}_{\text{Na}^+/\text{H}^+}$ y $\text{NCX}_{\text{Na}^+/\text{K}^+}$ (Uetani y col., 2003, Kleyman & Cragoe, 1998). En los años 90's, se desarrolló el KB-R7943 (2-[2-[4(4-nitrobenziloxi) fenil]-etil]isotiurea metanensulfonato). La molécula de KB-R7943 tiene selectividad dependiendo de la isoforma e inhibe al NCX_3 aproximadamente 3 veces más que el NCX_1 o el NCX_2 (Iwamoto y col., 1996, Watano y col., 1996, Iwamoto & Kita, 1996). Sin embargo, este compuesto es inespecífico, ya que

además de inhibir al NCX_{REV} también se une al transportador de norepinefrina, bloquea al receptor nicotínico de acetilcolina, a los canales de Ca^{2+} (SOC y VDC), K^+ y Na^+ (Matsuda y col., 2001). Recientemente se sintetizó un nuevo inhibidor del NCX_{REV} probado inicialmente en neuronas y miocitos cardiacos, llamado SEA0400 (2-(4-(2,5-difluorofenil)metoxi-fenoxi)-5-etoxianilina), el cual tiene mayor potencia que el KB-R7943 ya que su IC_{50} es de 30-40 nM y a diferencia del KB-R7943 (IC_{50} de 5-10 μM) parece no tener efectos sobre canales o receptores membranales cuando se usa a concentraciones nanomolares (Tanaka y col., 2002, Beaugé & DiPolo, 2006). Por último, también se desarrolló el SN-6, un inhibidor selectivo del NCX_{REV} , cuya IC_{50} es de 2.9 μM , es específico ya que no bloquea a otros tipos de transportadores que involucran al Na^+ , K^+ , Ca^{2+} o al H^+ y en la actualidad está siendo ampliamente utilizado (Kita & Iwamoto, 2007). Recientemente encontramos en miocitos traqueales de cobayo, que la incubación de SN-6 a concentraciones (3.2, 10 μM), no muestra eficacia para bloquear al NCX_{REV} y la incubación a concentraciones de (32 μM) disminuye ligeramente al NCX_{REV} . Se ha reportado que los cardiomiocitos y el MLVA expresa diferentes isoformas, NCX1 : NCX1:1 y NCX1.3 , respectivamente (Mejía-Elizondo y col., 2002, Philipson y col., 2002). Por lo tanto una probable explicación para la baja eficacia del SN-6 en el MLVA es que tiene menor afinidad al NCX1.3 y una alta afinidad al NCX1 , NCX1.1 , localizado en cardiomiocitos. (Flores-Soto y col., enviado al EJP, 2011).

ESTRUCTURA Y FUNCION DEL ATP

Durante las últimas cuatro décadas se han acumulado evidencias claras de que el ATP puede funcionar como factor de señalización extracelular. El ATP es un nucleótido constituido por una adenina (base nitrogenada), una ribosa y una unidad trifosfato (Fig. 1). Constituye una molécula rica en energía debido a que su unidad trifosfato contiene dos enlaces fosfoanhídrido. Una gran cantidad de energía se libera cuando el ATP se hidroliza a adenosina difosfato (ADP) y ortofosfato (Pi) o cuando se hidroliza a adenosina monofosfato (AMP) y pirofosfato (PPi). El ATP es el principal donador inmediato de energía en los sistemas biológicos. En una célula típica, la molécula de ATP se consume dentro del primer minuto que sigue a su formación, por lo que el movimiento, el transporte activo, la amplificación de señales y los procesos de biosíntesis pueden ocurrir sólo si el

ATP se regenera continuamente (Stryer, 1998). Junto al papel clásico que el ATP desempeña en el metabolismo celular donde actúa como un cofactor enzimático y como una fuente de energía a través de su enlace fosfato (Stryer, 1998), también funciona como un neurotransmisor o un autacoide que se almacena en grandes cantidades en plaquetas, células epiteliales, células cebadas, etc. En las células blanco actúa mediante su acople a miembros específicos de la familia de receptores de la superficie celular llamados purinoreceptores P2, que se localizan en diferentes tejidos incluyendo al sistema respiratorio (Ravelic & Burnstock, 1998).

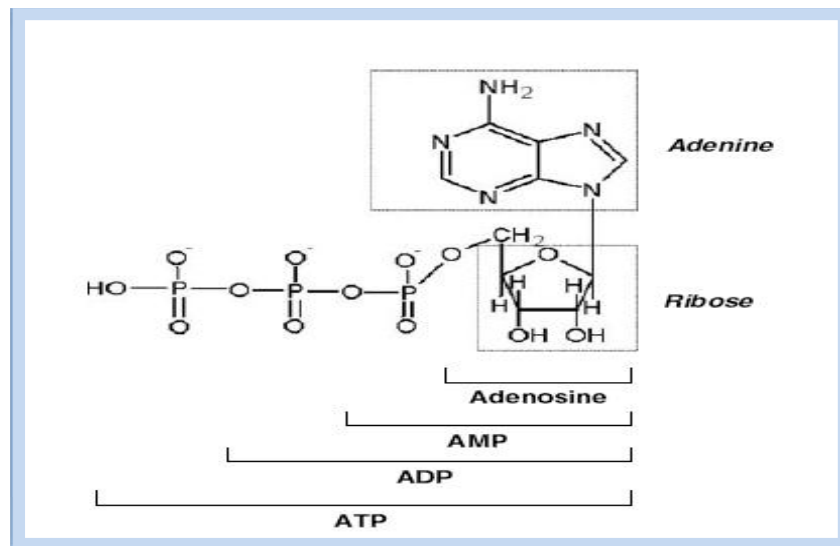


Figura 1. La molécula de ATP se encuentra conformada por una base púrica (adenina), un azúcar (ribosa) y tres grupos fosfatos en cuyos enlaces se almacena una gran cantidad de energía la cual se libera al romperse los enlaces y es empleada por la célula en diferentes procesos.

Por otro lado, también es conocido que, el ATP y otros compuestos como el uridín trifosfato (UTP), un nucleótido pirimídico, al igual que los nucleótidos ADP y uridín difosfato (UDP) pueden modular la función celular mediante la activación de los receptores P2. Por ello, el ATP puede desempeñar importantes y diversas funciones celulares, como la neurotransmisión excitatoria, la función pulmonar, la nocicepción, la audición, la apoptosis, la agregación plaquetaria, la contracción o relajación del músculo liso, etc. (Burnstock & Williams, 2000, Burnstock, 2002).

El ATP como neurotransmisor

Dado que el ATP como los demás nucleótidos no atraviesan libremente la membrana plasmática, se supuso durante mucho tiempo que estas moléculas solo podrían existir en el interior de la célula. Esta visión era reforzada principalmente por ser el ATP la moneda energética de las reacciones intracelulares. Dado que las células poseen complejos mecanismos de síntesis y reserva de nucleótidos, era de esperarse que también tuvieran mecanismos que evitaran la salida de estos componentes. Este concepto cambio cuando en la década de los 70s Burnstock G, pionero en el estudio de la señalización purinergica, postulara que el ATP era una sustancia liberada de nervios no adrenérgicos y no colinérgicos, ya que la respuesta a la administración de ATP en el músculo liso mimetiza la respuesta de la estimulación nerviosa (Burnstock y col., 1970).

El primer sitio en donde se localizaron los cuerpos celulares de los nervios purinérgicos fue en la pared intestinal, en particular en el plexo de Auerbach (Burnstock, 1972). Se demostró la liberación conjunta de ATP y de catecolaminas en glándulas suprarrenales (Douglas & Poisner, 1966) y años más tarde en nervios simpáticos (Geffen & Livett, 1971). Silinsky y col., confirmaron que el ATP se liberaba junto con la acetilcolina (ACh) de los nervios frénicos de la rata (Silinsky & Hubbard, 1973). En 1974, Dowdall y col., reportaron la presencia de vesículas que almacenaban ATP y ACh en una terminal de tipo colinérgico (Dowdall y col., 1974). A inicios de los 90's existía cierto desconocimiento en cuanto a la cantidad exacta de neurotransmisor dentro de una vesícula o en un *quantum* liberado; lo que sí está claro es que los nucleótidos se almacenan en un rango milimolar (Zimmermann, 1994). Tuvieron que pasar 20 años para que se aceptara definitivamente la idea de que los nucleótidos actúan como neurotransmisores (Burnstock, 2007).

Almacenamiento, liberación y degradación del ATP

Actualmente se conoce que en el citoplasma de las mayorías de las neuronas se almacenan ~2-5 mM de ATP, y que la mayor concentración de ATP (~100 mM) se encuentran en las vesículas sinápticas. Estas vesículas sinápticas también contienen nucleótidos tales como ADP, AMP, Ap4, Ap5A, y GTP, pero en concentraciones más bajas. En los últimos años, en otros tipos celulares como los espermatozoides, las células tumorales, las células epiteliales, las células cebadas, los gránulos en células cromafínés adrenales, las células de

Merkel, las plaquetas y las células β contenedoras de insulina pancreática, se ha reportado que contienen importantes cantidades de ATP (Novak, 2003, Sperlágh & Vizi, 1996).

Por lo general se creía que la única fuente de ATP extracelular que actuaban sobre los receptores purinérgicos era a través de células dañadas o muertas, pero ahora se conoce que el ATP se libera de células sanas en respuestas a estímulos fisiológicos (Bodin & Burnstock, 2001, Dubyak, 2006, Lazarowski y col., 2003, Schwartz & Malik, 1989). El ATP no solo se libera de neuronas periféricas y centrales (Burnstock y col., 1970, Katsuragi & Su C, 1980, Pankratov y col., 2006, Su C y col., 1971), sino también de muchos tipos de células no neuronales durante diversos procesos fisiológicos y patológicos como: estímulos mecánicos o de presión que deforman la paredes de las membranas en las células, estiramiento de los músculos, aumentos en la presión osmótica, hipoxia, inflamación y la estimulación por diversos agentes químicos y físicos (Bodin & Burnstock, 2001, Boudreault & Grygorczyk, 2004).

Actualmente existe un gran debate sobre los mecanismos de transporte que participan en la liberación de ATP. Por una parte, existen pruebas convincentes de la liberación de ATP por exocitosis vesicular de los nervios. Por otro lado, se desconocen los mecanismos de liberación de ATP a partir de células no neuronales y se han propuesto varios modelos de transporte, incluyendo transportadores (ABC) acoplados a ATP, hemicanales de anexina o conexina, receptor canal P2X₇ o canales de aniones dependiente de voltaje de la membrana plasmática, así como la liberación vesicular (Bodin & Burnstock, 2001, Dowe y col., 1970, Sabirov & Okada, 2005, Schwiebert y col., 2003, Spray y col., 2006). El ATP liberado de los nervios o por mecanismos autocrinos y paracrinos de las células no neuronales, están involucrados en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, como la transmisión y la modulación sináptica, la percepción del dolor y el tacto, los efectos vasomotores, la agregación plaquetaria, liberación de agentes broncoconstrictores y broncodilatadores de las células epiteliales, liberación de vasodilatadores de células endoteliales, defensa inmune, el transporte de iones en el epitelio, así como proliferación celular, migración, diferenciación y muerte celular.

El ATP liberado de las células está regulado por una serie de proteínas que tienen su sitio catalítico en el lado exterior de la membrana plasmática (Beaudoin y col., 1996, Zimmermann, 1999) y se conocen con el nombre de ectonucleotidasas capaces de

hidrolizar el ATP liberado de las neuronas y de las células no neuronales. La familia de estas enzimas incluyen: 1) Las aspirasas o ecto-nucleosidos trifosfato difosfohidrolasas (E-NTPDasas), 2) ecto-nucleótido pirofosfatasa (E-NPP) y la 3) la ecto-5'- nucleotidasa. Las E-NTDasas remueven secuencialmente al fosfato (Pi) terminal de los di nucleótidos (NDPs) y trinucleotidos (NTPs). Las E-NPP remueven ambos fosfatos (β y γ) juntos de los NTPs, liberando pirofosfatos (PPi). La 5'-nucleotidasa promueve la formación del nucleósidos a partir del correspondiente nucleótido monofosfato (NMPs). La desaminasa de adenosina (ADA) convierte la adenosina en inosina (otro nucleósido). Los nucleósidos generados como resultados de estas actividades son captados por la célula a través de transportadores específicos, sirviendo de substrato para la síntesis de NTPS y UDP glucosa (Todorov y col., 1997, Kirley, 1997, Zimmermann, 1996).

NUCLEOTIDASAS	REACCION
Ecto-ATPasa	$ATP \rightarrow ADP + Pi$
Ecto-ADPasa	$ADP \rightarrow AMP + Pi$
Ecto-ATPasa-difosfohidrolasa (apirasa)	$ATP \rightarrow AMP + 2Pi$
Ectoadenilatocinasa (miocinasa)	$ATP + AMP \rightarrow 2ADP$
Ecto-5'-nucleotidasa	$AMP \rightarrow Adenosina + Pi$
Ectoalcalinofosfatasa	$ATP \rightarrow ADP \rightarrow AMP \rightarrow Adenosina + 3Pi$

Tabla 1. Diferentes enzimas participan en el metabolismo del ATP extracelular y sustancias a las que dan origen. Tomada y modificada de (Galindo F & Flores A, 2006).

Papel fisiológico de los receptores purinérgicos

En 1978 Burnstock provee una importante contribución al proponer a una familia de receptores capaces de responder a los nucleótidos y nucleósidos denominándolos purinoreceptores o receptores purinérgicos y que corresponden a los P1 y los P2 (Abracchio & Burnstock, 1978).

Se han clonado 4 tipos de receptores P1 o receptores de adenosina y son denominados como A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 , este receptor tiene la capacidad de responder principalmente a la adenosina. Todos los receptores P1 pertenecen a la familia de los receptores acoplados a

proteínas G, el receptor A_1 está acoplado a proteínas G inhibitorias, (G_i y G_o) (Freissmuth M y col., 1991), el receptor A_3 también se encuentra acoplado a una proteína G_i . Los receptores (A_{2A} y A_{2B}) tienen la capacidad de interactuar con la proteína G estimuladora (G_s) (Palmer y col., 1995), estos receptores son antagonizados por bajas concentraciones de metilxantinas que produce la inhibición de la fosfodiesterasas (Klinger y col., 2002).

Los receptores P2 son activados principalmente por ATP, ADP, UDP Y UTP. La categoría P2 es además subdividida en dos subtipos de receptores llamados P2X y P2Y (Shulman y col., 1999, Burnstock, 2007, North & Suprenant, 2000). El subtipo P2Y son metabotrópicos, es decir, están acoplados a proteínas G (North, 1997) ligados a incrementos de Ca^{2+} a través de la hidrólisis de inositol trifosfato (Bergner & Sanderson, 2002; Govindaraju y col., 2005), aunque se han propuesto otros mecanismos adicionales como la generación de AMP cíclico y la movilización de ácido araquidónico (Ralevic & Burnstock, 1998). Presentan siete dominios transmembranales con el amino terminal localizado en el lado extracelular, y el grupo carboxilo, en la porción intracelular. Los sitios en donde se une el ATP a este receptor han sido identificados en los dominios transmembranales sexto y séptimo de la molécula (Von Kugelgen & Wetter, 2000). La activación farmacológica para este receptor está bien caracterizado, presentando el siguiente orden de afinidad general: ATP>UTP>ADP>2MeATP> α,β -metATP. La familia de los P2Y consta de 8 subtipos humanos (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄) que están bien clonados y funcionalmente definidos y encontrados en muchos vertebrados: Los receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁ están acoplados a la estimulación de la fosfolipasa C_β . El receptor P2Y₁₁ también estimula la producción de adenilato ciclasa. En contraste, la activación de los receptores P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄ causan la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa. (Von Kugelgen, 2006).

La expresión del receptor P2Y₁ es muy amplia, ha sido detectada en varias especies de mamíferos incluyendo el humano, se ha demostrado que funciona en una variedad de tejidos incluyendo el músculo liso, endotelio y tejido neuronal (Ralevic & Burnstock, 1998). Estos receptores están involucrados en la relajación muscular y la liberación de prostaglandinas, en la agregación plaquetaria y neuromodulación (Fabre y col., 1999; León y col., 1996). El receptor P2Y₂ está distribuido en varios tejidos y se encuentran en altos niveles en células pulmonares, corazón, músculo esquelético, bazo, riñones e hígado

(Lustig y col., 1993; Parr y col., 1994). Estudios en ratones mutados del receptor P2Y₂ verificaron la importancia de estos receptores en la regulación del transporte de iones cloro en el epitelio del MLVA (Creemas y col., 1999). Recientemente Montaña y col., 2011 encontraron que el receptor P2Y₂ participa en la relajación de MLVA de cobayo produciendo prostaglandinas en el MLVA independiente de epitelio. Este receptor es activado por ATP, UTP y sus análogos no hidrolizables (son requeridos los 3 fosfatos para la activación de este receptor) y es antagonizado competitivamente por la suramina, en contraste, no es antagonizado por el RB₂ y el PPADS (Nicholas y col., 1996, Wildman y col., 2003). Los receptores P2Y₄ tienen una restringida distribución; estos receptores son expresados en placenta y en niveles muy bajos en músculo liso vascular, recientemente se encontró que el receptor P2Y₄ en MLVA de cobayo es el principal receptor P2Y expresado en este tejido (Montaña y col., 2011). Tiene mayor preferencia al UTP en el humano que al ATP (Nicholas y col., 1996), es antagonizado por el RB₂ y en menor proporción por el PPADS dependiendo la especie a estudiar (Wildman y col., 2003). Una de las características farmacológicas más importantes de este receptor es que la suramina no lo antagoniza como lo hace con el receptor P2Y₂ (Ralevic & Burnstock, 1998). El receptor P2Y₆ se encuentra en el corazón, los vasos sanguíneos y el cerebro, tiene mayor afinidad al UDP y es ~100 veces más potente que el UTP (Nicholas y col., 1996), es bloqueado selectivamente por el MRS2567 (1,2-di-(4-isotiocianofenil) etano) sin mostrar algún efecto sobre los receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₁₁ (Mamedova, 2004). Los receptores P2Y₁₁ están altamente expresados en células hematopoyéticas y juegan un papel importante en la diferenciación de estas células (Communi y col., 1997). Este receptor es activado por ATP y su análogo el ARC67085 (2-propiltio-β,γ-diclorometileno-D-ATP) y es antagonizado por el RB₂ y la suramina, pero no por PPADS (Communi y col., 1999). El receptor P2Y₁₂ ha sido encontrado en plaquetas y tejidos neuronales, participa en forma muy importante en la agregación plaquetaria y actúa como inhibidor de receptores neuronales. En vasos sanguíneos de humanos, la activación de receptores P2Y₁₂ contribuye a la vasoconstricción, se activan por ADP y por 2-metil-tio-ADP y antagonizado por el AR-C69931MX ó Cangrelor (N6-(2metiltioetil)-2-(3,3,3,-trifluoropropiltio)-β,γ-diclorometileno-ATP), estos antagonistas P2Y₁₂ se utilizan en el tratamiento farmacológico para inhibir la agregación plaquetaria (Kubista y col., 2003). El receptor P2Y₁₃ es expresado en células de origen

hematopoyético y en neuronas, se activan por ADP y 2-metiltio-ADP y es antagonizado selectivamente por el MRS2211 (2-cloro-5-nitro piridoxal-fosfato análogo 6-(2'-cloro-5'-nitro-azofenil)-piridoxal- α 5-fosfato). El receptor P2Y₁₄ es altamente distribuido en placenta, tejido adiposo, estomago, e intestino humano. En rata este receptor es altamente expresado en células hematopoyéticas, es activado por UDP-glucosa a concentraciones nanomolares, aún no se conocen antagonistas para estos receptores (Chambers y col., 2000).

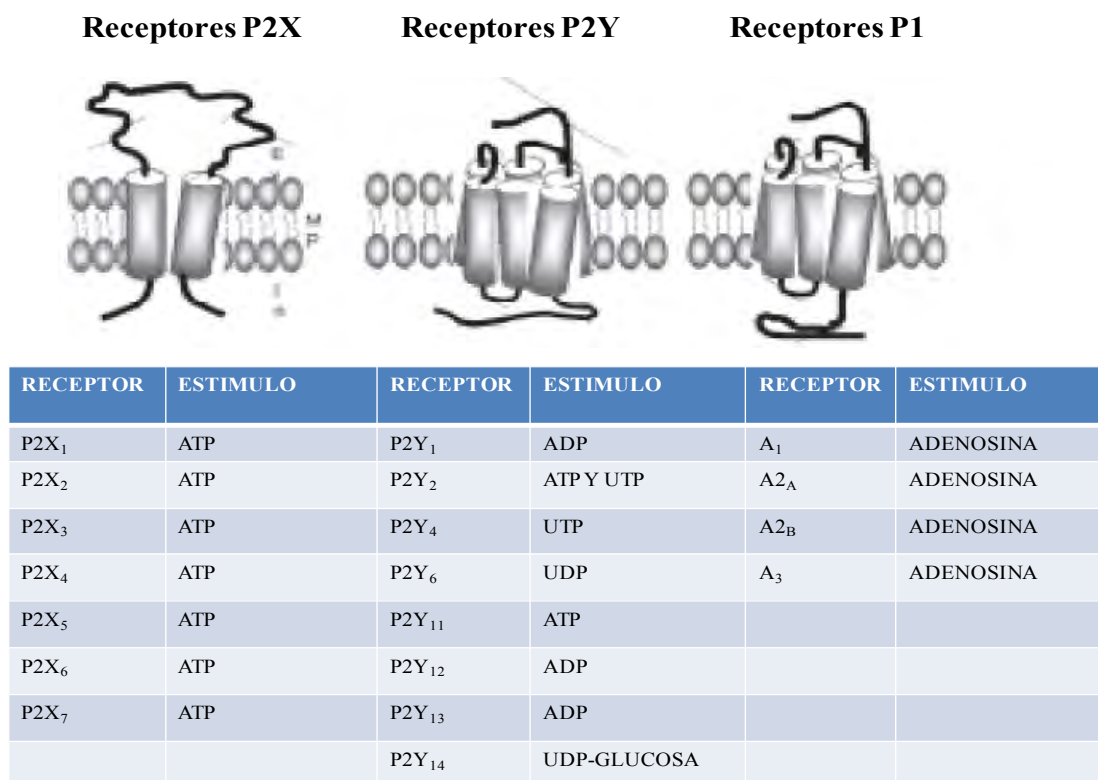


Figura 2. Estructura y selectividad de los receptores purinérgicos P2X, P2Y y P1. El esquema ilustra los dominios hidrofóbicos dispuestos en la membrana plasmática (MP), y los dominios hidrofílicos que se expanden hacia el interior (In) o el exterior (Ex) de la célula. En la parte inferior se indican las selectividades de los distintos receptores purinérgicos por los nucleótidos y nucleósidos (imagen modificada de Lazarowski E, 2009).

Por otro lado, La familia de receptores P2X es ionotrópica, conforman poros (Burnstock, 2006, Ralevic & Burnstock, 1998) o canales catiónicos inespecíficos (receptor canal) en la membrana plasmática y son activados solo por ATP extracelular. Ni el ADP, ni la adenosina, ni los nucleótidos de uridina activan a estos receptores. Su activación resulta en

la apertura de un canal selectivo a cationes como Ca^{2+} , Na^+ y K^+ , son modulados por Ca^{2+} extracelular, Mg^{2+} , H^+ ó iones metálicos tales como: Zn^{2+} , y/o Cu^{2+} (North, 2002). A la fecha, han sido clonadas siete subtipos P2X (P2X₁₋₇) en diferentes tejidos de mamíferos adultos y están distribuidos ampliamente en los tejidos y se cree que juegan un papel importante en diversas funciones fisiológicas como: la transmisión neuronal central, periférica, contracción de los músculos lisos, agregación plaquetaria e inflamación.

El rango de identidad entre los subtipos (P2X₁-P2X₇) se encuentra entre el 26 y el 47%, con una longitud que oscila entre los 379 y los 595 aminoácidos, siendo el P2X₆ el más pequeño y el P2X₇ el de mayor tamaño. Estos receptores muestra una similitud en la estructura molecular que consiste en dos dominios transmembranales (TM1 y TM2) unidos por una asa extracelular hidrofílica, sus grupos NH_2 y COOH terminales son intracelulares. TM1 es responsable de la compuerta del canal y TM2 forma el poro del canal. El asa extracelular (~270 aminoácidos) se sugiere que está involucrada en la unión de dos moléculas de ATP, así como en la estructura terciaria de la proteína, ya que se encuentran conservados 10 residuos de cisteínas, que al ser oxidados forman puentes disulfuros, los cuales pueden ser importantes para estabilizar el sitio de unión a los ligandos, una situación parecida a lo que sucede con los receptores nicotínicos en las denominadas “asa- Cys-Cys”. Todas las subunidades P2X tienen secuencias consenso para glicosilación (Asn-X-Ser/Thr), y algunas glicosilaciones son esenciales para el tráfico de los receptores a la superficie (North, 2002). La estructura molecular de un receptor P2X es probablemente como trímero. Dichos trímeros pueden estar compuestos de la misma o diferentes subunidades formando receptores homoméricos o heteroméricos, respectivamente.

En la actualidad se sabe que la farmacología de los receptores P2X es muy compleja. No existen a la fecha agonistas o antagonistas específicos para la mayoría de los receptores P2X. Inclusive la sensibilidad a agonistas o antagonistas depende no solo del subtipo de receptor P2X sino además de la especie de donde fue obtenido el receptor. Por ejemplo, mientras que los receptores P2X₄ de rata son poco sensibles al antagonista PPADS ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$), el P2X₄ de humano es notablemente más sensible a este antagonista ($\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$) (Jones y col., 2000).

Los receptores P2X también pueden ser influenciados por moduladores alostéricos como son cationes divalentes, por ejemplo el Zn^{2+} el cual potencia los receptores P2X₂ y P2X_{2/3},

mientras que inhibe a los receptores P2X₁ y P2X₇ (Roberts & Evans, 2004). La ivermectina es un modulador positivo específico de los receptores P2X₄ y P2X_{4/6}, mientras que es inactivo sobre los receptores P2X₂, P2X₃, P2X_{2/3}, y P2X₇ (Khakh y col., 1999). Estas moléculas pueden ser importantes herramientas farmacológicas para la caracterización de los receptores P2X expresadas endógenamente en los tejidos nativos.

Los receptores canales P2X₁ homoméricos se localiza ampliamente en el músculo liso de varios órganos incluyendo la vejiga urinaria, intestinos, arterias, conducto deferentes, plaquetas y vías aéreas, pueden regular la contracción del músculo liso y varias funciones protrombóticas (agregación, secreción, adhesión y crecimiento del trombo bajo condiciones *in vitro*) (Burnstock y col., 2004, Collo y col., 1996, Mulryan y col., 2000, Valera y col., 1994, Valera y col., 1995). Este receptor tiene dos características de activación muy definidas que son sensibles a la α,β -MeATP y una cinética de desensibilización rápida. Los primeros antagonistas que bloqueaban a los canales P2X₁ fueron la suramina (antagonista no selectivo de P2) y el PPADS (antagonista no selectivo de P2X), subsecuentemente fueron sintetizándose varios análogos de la suramina (NF023, NF279) y el PPADS (MRS2220), que incrementaron la potencia y la selectividad sobre el receptor P2X₁. Algunos nucleótidos han demostrado también ser potentes antagonistas P2X₁ como el TNP-ATP y otros análogos de ATP tinitrofenil relacionados como el (TNP-ADP, TNP-AMP y el TNP-GTP) (Bianchi y col., 199, Evans y col., 1995, Torres y col., 1998, Valera y col., 1994, Valera y col., 1995).

Los receptores canal P2X₂ se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central y periférico y en varios tipos de células no neuronales, incluyendo células endoteliales y epiteliales, músculo esquelético, cardíaco, liso y linfocitos (Hansen y col., 1998, Hansen y col., 1999, Jiang y col., 2005, Lee y col., 2000). Estos receptores pueden tener amplias funciones en la regulación de varios procesos del SNC como la memoria y el aprendizaje, la función motora, coordinación autonómica e integración sensorial. El papel del P2X₂ en muchos de estos tejidos es controversial, pero puede involucrar funciones del ATP, como la regulación autocrina o paracrina en la liberación hormonal, regulación de endocitosis o exocitosis, contracción del músculo liso o actividad de marcapasos. Estos canales muestran una cinética lenta de desensibilización similar a la presentada por los P2X₄ y P2X₅. Los agonistas más potentes de estos canales son el ATP, ATP- γ -S y 2-

MeSATP. También se han descrito a las Bz-ATP como agonistas parciales o menos potentes. Una propiedad de estos canales es que son potenciados por condiciones ácidas y también muestran el mismo efecto con el Zn, pero inhibidas por altas concentraciones extracelulares (1-7 mM) de cationes divalentes (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} y Ba^{2+}). No se conoce antagonistas selectivos o altamente potentes para los $P2X_2$, aunque el PPADS, TNP-ATP y el RB2 son inhibidores que se han utilizado (Bianchi y col., 1999, King y col., 1997, Lynch y col., 1999, Virginio y col., 1998).

Los receptores canales $P2X_3$ homoméricos y $P2X_{2/3}$ heterotrimericos son predominantemente localizados en las terminales centrales o periféricas de las fibras C mielinizadas y en las neuronas sensoriales $A\delta$ dentro de la raíz dorsal, trigémino y de los ganglios sensoriales nudosos, los canales $P2X_3$ y $P2X_{2/3}$ están presentes en las terminales periféricas y centrales de las vías aferentes sensoriales que se proyectan hacia un número de órganos somatosensorial y visceral como la piel, articulaciones, huesos, pulmón, vejiga urinaria, uretra y del tracto gastrointestinal (Bian X y col., 2003, Galligan, 2004, Poole y col., 2002, Van Nassauw y col., 2002). Estudios recientes han demostrado que los tejidos epiteliales, incluyendo epitelio de la vejiga, de las vías respiratorias, y cuerpos neuroepiteliales pulmonares, expresan canales $P2X_3$ y $P2X_{2/3}$, donde modulan mecanismos sensoriales o respuestas quimiosensoriales. Los receptores $P2X_3$ y $P2X_{2/3}$ son farmacológicamente similares a los $P2X_1$, son activados por el α,β -MeATP. Estos canales son sensibles al TNP-ATP a concentraciones nanomolares (Burgard y col., 2000, Vial Evans, 2002).

Los receptores canal $P2X_4$ se encuentran ampliamente distribuidos en las neuronas y los tejidos no neuronales como; arteria de músculo liso, osteoclastos, riñón, pulmón, páncreas, linfocito B de humanos (Bo y col., 2003, Glass y col., 2000). Estos canales $P2X_4$ canales localizados en la microglía están implicados en los procesos inflamatorios crónicos y neuropático como el dolor y recientemente se encontró que este canal es el responsable de la contracción del músculo liso de la vía aérea de cerdo. Estos canales homoméricos generalmente produce una lenta desensibilización de la corriente entrante inducida por el ATP y son principalmente activados por ATP, pero también pueden ser activados por el 2-MeSATP con menor potencia. Una propiedad inusual de este canal es que no es bloqueado

por los antagonistas no selectivos de P2X como la suramina y el PPADS pero aumentan su respuesta con la ivermectina (Jones y col., 2000, Soto y col., 1996).

Los receptores canales P2X₅ homoméricos y P2X_{1/5} heteroméricos, han estado más estrechamente vinculados con diferenciación de las células, particularmente en el músculo esquelético, piel, células epiteliales de la mucosa nasal, vejiga y uréteres. El ATP y 2 MeSATP son por lo general los agonistas completos con una EC₅₀ similar que va desde 4,8 a 5,7 en todas las especies estudiadas. Estos receptores son antagonizados por el PPADS y la suramina a concentraciones menores a 1 μM y por el TNP-ATP a concentraciones de 1 μM (Diaz-Hernandez y col., 2002, Jensiky col, 2001).

Los receptores canal P2X₆ homoméricos están presentes en todo el sistema nerviosos central y a menudo se colocan con los P2X₂ y con los P2X₄. El receptor P2X₆ puede ser activado por α, β-MeATP y bloqueados por TNP-ATP. Los receptores heteroméricos P2X_{2/6} y P2X_{4/6} conservan muchas características de los receptores P2X₂ y P2X₄ homoméricos y es difícil distinguirlos entre ellos. Los canales P2X₆ homoméricos difieren de los canales P2X₆ heteroméricos en la sensibilidad a los agonistas como α, β-MeATP, pH, la ivermectina y a los antagonistas como TNP-ATP, PPADS y suramina (Jones y col., 2004, Le y col., 1998).

Los receptores canales P2X₇ o anteriormente conocido como receptor P2Z citolítico, son localizados en células inmunes (como los macrófagos, monocitos, células dendríticas, linfocitos y células cebadas) y en células gliales del sistema nervioso central y periférico que incluyen microglía, astrocitos, oligodendrocitos, y las células de Schwann y recientemente fue encontrado en neuronas mientéricas de intestino de cobayo (Baricordi y col., 1996, Blanchard y col., 1995, Gartland y col., 2001., Valdez-Morales y col., 2011). Participan en la liberación de citocinas proinflamatorias, la proliferación celular y apoptosis. Los P2X₇ son muy insensibles a la activación por nucleótidos, se requieren concentraciones milimolares para activarlos y generalmente son activados por BzATP. Como en la mayoría de los otros receptores homomérico y heteroméricos el PPADS es el inhibidor de los P2X₇, aunque recientemente Barajas y col., (2011) mostraron que este receptor es sensible al Azul G Brillante (BBG) (Chessell y col., 1998, Surprenant y col., 1996, Valdez-Morales y col., 2011).

A continuación detallo características importantes de los receptores P2X y P2Y:

Subunidad	N.º de aminoácidos	Desensibilización	Agonistas	Antagonistas
P2X ₁	399	Rápida	$\alpha, \beta\text{-meATP} = \text{ATP} = 2\text{-MeSATP} \gg \text{ADP}$	Suramina, PPADS, TNP-ATP, MRS2220, NF023, NF449, IP51.
P2X ₂	472	Lenta	$\text{ATP} \geq \text{ATP}\gamma\text{S} \geq 2\text{-MeSATP} \gg \alpha, \beta\text{-meATP}$ (sensible al pH y Zinc)	Suramina, isoPPADS, NF770, RB2.
P2X ₃	397	Rápida	$2\text{-MeSATP} \geq \text{ATP} \geq \alpha, \beta\text{-meATP} > \text{Ap4A}$	Suramina, PPADS, TNP-ATP, NF023, A317491
P2X ₄	388	Lenta	$\text{ATP} \gg 2\text{-MeATP} > \text{CTP}$, ivermectina	TNP-ATP, BBG
P2X ₅	417	Lenta	$\text{ATP} = \text{ATP}\gamma\text{S} = \alpha, \beta\text{-MeSATP}$	Suramina, PPADS, BBG
P2X ₆	379	Lenta	$\text{ATP} = 2\text{-MeATP} > 2\text{-cloroATP} = \text{ADP}$	Suramina, PPADS, NF023
P2X ₇	595	Lenta	BzATP \gg ATP	Calmidazolium, KN04, KN62, MRS2427

Tabla 2. Características de los subtipos que conforman a los receptores P2X. Estas siete subunidades son las únicas aceptadas por la IUPHAR y su homología oscila entre el 26 y el 47%. (Tabla tomada y modificada de Burnstock G, 2006 y Galindo F & Flores A, 2006). **Abreviaciones:** ATP: adenosín trifosfato; ADP: adenosín difosfato; 2-MeSATP: 2-metiltio-ATP; $\alpha, \beta\text{-meATP}$: α, β -metileno-ATP; ATP γ S: adenosín 5'-O-(γ -tiotriofosfato); $\beta\gamma\text{-meATP}$: $\beta\gamma$ -metileno-ATP; PPADS: piridoxal-fosfato-6-azofenil 2',4'-disulfonato, Ap4A; di adenosina tetrafosfato; BBG: Verde Azul Brillante.

Receptor	Proteína G acoplada	Segundo Mensajero	Agonistas	Antagonistas
P2Y ₁	Gq/11	↑ IP3/DAG	2-MeSATP>2-MeSATP=ADP>ATP	Suramina, RB2, MRS2179, MRS2500
P2Y ₂	Gq/11, Gq/12, Gi/o	↑ IP3/DAG, RhoA, Rac	ATP≈UTP>ATPγS, INS37217	Suramina>RB2, ARC126313
P2Y ₄	Gq/11	↑ IP3/DAG	UTP≥UTP, UTPγS	RB2>Suramina
P2Y ₆	Gq/11	↑ IP3/DAG	UDP>>UTP>ATP=ADP	Suramina, MRS2578
P2Y ₁₁	Gq/11, Gs	↑ IP3/DAG, ↑ AMPc	ARC67085,>BzATP>ATPγS>ATP	Suramina, RB2, NF157
P2Y ₁₂	Gi	↓ AMPc	2-MeSADP>ADP>>ATP	AR-C69931MX, CT50547, INS49266, AZD6140, PSB0413
P2Y ₁₃	Gi/o	↓ AMPc	ADP=2-MeSADP>>ATP=2-MeSATP	MRS2211
P2Y ₁₄	Gi/o	-----	UDP-glucosa > UDP-galactosa	-----

Tabla 3. Características de los receptores P2Y actualmente aceptados por la IUPHAR. (Tabla tomada y modificada de Burnstock G, 2006). **Abreviaciones:** IP₃: inositol 1,4,5-trifosfato; DAG: diacilglicerol; AMPc: adenosín monofosfato cíclico; UTP: uridín trifosfato; UDP: uridín difosfato; 2MeSADP: 2-metiltio-ADP.

Papel del ATP en la regulación del Ca²⁺ en MLVA de cobayo.

Recientemente, el papel del ATP y la señalización purinérgica ha sido implicada en la patogénesis del asma induciendo inflamación eosinofílica de las vías aéreas, producción de citocina Th2 e hiperreactividad (Idzco y col., 2007). Por lo tanto, es importante comprender mejor el efecto fisiológico del ATP sobre el músculo liso de las vías aéreas.

Desde muchos años atrás ha sido bien documentado en diferentes especies, incluyendo al humano, que el ATP induce contracción del músculo liso de la vía aérea e incremento de Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]_i) (Kamikawa y col., 1976, Fedan y col., 1993, Mounkaila y col., 2005, Michoud y col., 1999, Bergner & Sanderson, 2002). La mayoría de los autores han asociado el efecto de contracción inducido por el ATP con incrementos [Ca²⁺]_i; sin embargo, la contracción inducida por ATP en tráquea de cobayo se ha reportado dependiente del epitelio, relacionada a la producción de prostaglandinas y tromboxanos (Advenier y col., 1982, Fedan y col., 1992). En consecuencia, la contracción inducida por el ATP en tráquea de cobayo es un efecto indirecto, que no implica una estimulación de

receptores purinérgicos en células de músculo liso de las vías aéreas para producir contracción. No obstante, El ATP induce incrementos de $[Ca^{2+}]_i$ que están asociadas a la estimulación de receptores P2Y y P2X en células de músculo liso de vías aéreas (Bergner, 2002, Govindaraju y col., 2005, Mounkaila y col., 2005). Recientemente se demostró que el pretratamiento de ATP induce hiperreactividad a las respuestas de metacolina por fenómenos de sensibilización al Ca^{2+} vía la activación de los receptores P2X en el músculo liso de cobayo, sugiriendo un posible papel de las vías de la Rho-Cinasas y Src (Oguma y col., 2007). Por otro lado, en músculo liso traqueal de cerdo se demostró por primera vez que la activación del receptor P2X₄ produce un incremento de las $[Ca^{2+}]_i$, las cuales son responsables de la contracción de este tejido (Nagaoka y col., 2009).

En el presente trabajo investigamos el efecto del ATP en la contracción del MLVA y caracterizamos a los receptores P2 involucrados en dicha contracción, así como, exploramos el efecto del ATP en los incrementos de las $[Ca^{2+}]_i$ y la caracterización de los receptores involucrados en estos incrementos en miocitos traqueales de cobayo. Asimismo, estudiamos si este nucleótido activa el modo reverso del NCX, vía receptores P2X o P2Y, para rellenar el RS.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En vista de que los receptores P2X (Canales catiónicos inespecíficos [NSCCs]) y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en su fase reversa pudieran ser responsables del incremento de Ca^{2+} intracelular inducido por el ATP, resulta importante explorar su participación, ya que hasta la fecha no existen evidencias experimentales al respecto. Asimismo, explorar cual es la función del incremento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por el ATP ya que este efecto parece no estar participando (o es mínima su influencia) en la contracción del músculo liso. Por otro lado, investigar el subtipo de receptores P2X involucrado.

HIPÓTESIS

El ATP produce un incremento en las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del músculo liso traqueal de cobayo vía P2X (canales catiónicos inespecíficos, NSCCs) y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en su fase reversa y éste incremento sirve para rellenar los almacenes intracelulares de Ca^{2+} y no para producir contracción.

OBJETIVOS GENERAL

Explorar los mecanismos involucrados en el incremento de Ca^{2+} intracelular inducido por el ATP y su relación con la contracción en el músculo liso traqueal de cobayo.

MATERIAL Y METODOS

Experimentos de órganos aislados

Estudios funcionales.

Para estos experimentos los cobayos fueron sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (35mg/Kg i.p.) y desangrado, se le extrajo la tráquea y a esta se le eliminó el exceso de tejido conjuntivo adyacente bajo microscopio estereoscópico. Posteriormente, de la tráquea se obtuvieron 8 anillos, los cuales fueron destinados a diferentes condiciones experimentales.

Cada uno de los anillos traqueales fueron colocados en una cámara individual de órganos aislados conteniendo 5 ml de solución Krebs burbujeada con 5% de CO₂ y 95% de O₂ (carbógeno) con la siguiente composición (mM): NaCl 118, NaHCO₃ 25, KCl 4.6, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, glucosa 11, CaCl₂ 2.0. Se mantuvieron a una temperatura de 37°C, con burbujeo constante para mantener el pH de 7.4 en todo el experimento. Cada uno de los anillos traqueales fue sujetado a un transductor de tensión isométrica (Modelo FT03; Grass instruments, West Warwick, RI, USA) conectado a un amplificador (CyberAmp 380, Axon instruments, Foster City, CA, USA) y que a su vez está conectado a un convertidor análogo digital (Digidata 1440A; Axon). La tensión generada fue registrada, almacenada y analizada en una computadora mediante el programa (AxoScope versión 10.2; Axon). Las preparaciones se mantuvieron en reposo por 30 minutos a una tensión de 1 g antes de iniciar los diferentes protocolos experimentales.

Con el propósito de normalizar las respuestas de los tejidos, estos se estimularon tres veces con KCl (60 mM) durante 20 minutos o hasta alcanzar la respuesta máxima de contracción; posteriormente se realizó una curva concentración-respuesta para ATP y ATP γ S (análogo no hidrolizable) mediante la adición de concentraciones únicas (1, 3.2, 10, 100, 320 y 1000 μ M) a diferentes anillos traqueales. En otros experimentos, después de la estimulación con ATP, los tejidos fueron incubados con indometacina (1 μ M) durante 1 hora antes de la segunda curva concentración-respuesta a ATP. En algunos experimentos, los anillos traqueales fueron incubados durante 15 min, previos a la adición de ATP (100 M), con los siguientes compuestos: suramina (antagonistas de receptores P2Y y P2X, 30-300 M), sal tetrasódica de piridoxal fosfato-6-azo(benzeno-2,4- ácido di sulfónico)

(PPADS, antagonistas del receptor P2X, 30 μ M), reactivo azul 2 (RB2, antagonista del receptor P2Y, 30-300 μ M), 8-ciclopentil-1,3-dimetilxantina, antagonista del receptor A₁, 100 nM) y KBR-7943 (inhibidor del modo reverso del NCX, 10 μ M). Todas las respuestas fueron expresadas como el porcentaje de respuesta al tercer estímulo de KCl.

Medición de $[Ca^{2+}]_i$ en células de músculo liso traqueal de cobayo.

Disgregación celular y procedimientos para registros por microfluorometría.

La tráquea de cobayo fue obtenida como se describió anteriormente e inmediatamente se realizó la disección del músculo liso traqueal, se cortó longitudinalmente a la tráquea en la parte cartilaginosa para exponer la parte membranosa y colocarla ventralmente en el silgar mediante pequeños alfileres. Una vez obtenido el músculo liso traqueal se incubó en 5 ml de solución de Hanks (GIBCO, New York, EUA) que contenía 0.05 unidades de papaína (56 mg/ml, Worthington) y 2 mg de L-cistienina (Sigma, Alemania) durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente el tejido fue lavado con solución de Leibovitz (GIBCO, L15 New York, EUA) para remover el exceso de enzima y después el tejido fue incubado en 5 ml de solución de Hanks conteniendo 1 mg/ml de colagenasa tipo 1 y 4 mg/ml de dispasa II (proteasa neutra) durante aproximadamente 10 minutos a 37°C. Posteriormente, se realizó la disociación mecánica del tejido con una pipeta Pasteur aspirando y soltando el tejido a través de la pipeta hacia las paredes del tubo, este procedimiento se realizó unas 15 veces. Después de esto se volvió a incubar nuevamente con la solución de colagenasa-dispasa, por otros 10 minutos y se realizó el mismo procedimiento mecánico para la disociación, pero solo diez veces o menos dependiendo del número de células observadas en un microscopio. Finalmente, la actividad enzima fue detenida adicionando solución L15 al tubo, se centrifugaron a 600 rpm durante 5 min desechando el sobrenadante, este último procedimiento se realizó dos veces más. Ya obtenidas las células fueron incubadas con 0.5 μ M de fura-2/AM en concentraciones bajas de Ca^{2+} (0.1mM) a temperatura ambiente (22-25°C), durante 1 h. Las células cargadas con fura 2/AM fueron colocadas en una cámara de perfusión durante 30 min, con el propósito de facilitar que las células se adhieran a la base de la cámara que tiene un cubre objetos de vidrio en su base cubierta de colágena de cola de rata. Posteriormente esta cámara fue colocada sobre un microscopio invertido (Diaphot 200, Nikon, Tokio, Japón) y las células adheridas al vidrio fueron perfundidas a un flujo de

2-2.5 ml/min con una solución Krebs conteniendo (mM) NaCl 118, NaHCO₃ 25, KCl 4.6, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, glucosa 11, CaCl₂ 2.0. Se mantuvieron a una temperatura de 37°C, con burbujeo constante de 95% O₂ y 5% CO₂ para mantener el pH de 7.4 (Carbajal y col., 2005).

Las células musculares lisas cargadas con fura-2/AM fueron excitadas alternadamente con un haz de luz con dos longitudes de onda de excitación que corresponde a 340 y 380 nm, la luz emitida fue colectada a 510 nm usando un microfluorometro (Photon Technology Internacional, Modelo D-104, Princeton, NJ, EUA). La fluorescencia basal fue determinada removiendo cualquier célula que se encontrara en el campo óptico del microscopio por donde pasa el haz de luz, durante los experimentos fue sustraída automáticamente por el programa. La concentración de calcio intracelular ([Ca²⁺]_i) se calculó de acuerdo a la formula de Grynkiewicz y col.(1985):

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \beta \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R}$$

donde: K_d corresponde a la constante de disociación del fura 2, que se consideró de 386 nM (Kajita y col. 1993); β corresponde al cociente de fluorescencia observada a 380 nm en ausencia de Ca²⁺/presencia de Ca²⁺ saturante que tuvo un valor promedio de 4.23; R_{max} y R_{min} corresponde a los cocientes de fluorescencia 340/380 mínimo y máximo respectivamente que se obtuvieron en ausencia de Ca²⁺ + EGTA (1.11 mM) y en presencia de Ca²⁺ saturante (10 mM) + ionomicina (10 μM) en la solución Krebs, respectivamente. El promedio de R_{max} fue de 6.06 y el de R_{min} fue de 0.39. Los registros obtenidos fueron almacenados en una computadora y analizados usando un programa de análisis y adquisición de datos (Félix v. 1.2.1, Photon Technology International).

Después de corroborar la viabilidad celular a través de la estimulación con 10 mM de cafeína, las células de músculo liso traqueal fueron estimuladas con 1, 10, 100, 1000 μM de ATP. Algunas células fueron perfundidas con indometacina (1 μM , 1h) y la curva concentración-respuesta de ATP se repitió. Otras células fueron estimuladas con una concentración seleccionada de ATP (100 μM) y preincubadas durante 5 min con los siguientes fármacos, previos a una segunda estimulación de ATP: suramina (30, 100 μM , n= 4), PPADS (30 μM , n= 6), RB2 (100 μM , n= 7), SKF 96365 (30 μM , bloqueador de canales cationicos no selectivos, n= 5), KBR-7943 (10 μM , n= 6), TMB-8 (50 μM , n= 4, antagonista del receptor de IP_3), D-600 (30 μM , n= 4) y NEM (30 μM , n=4, preincubado 15 minutos). En otra serie de experimentos, los miocitos se estimularon con ATP en medio libre de Ca^{2+} (n= 6). También, corroboramos que los incrementos de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por 10 μM de carbacol (309 ± 28 nM, n=3) fuera completamente bloqueado por TMB-8.

Además, para corroborar, en los miocitos traqueales, la presencia del modo reverso del NCX (NCX_{REV}), se substituyó el NaCl y NaHCO_3 (146 mM) de la solución de Krebs por cloruro de litio (LiCl). En estas condiciones, previo a la substitución por LiCl, algunas células fueron perfundidas con KBR-7943 (10 μM , n=3), (PPADS, 30 μM , n= 3), SKF 96365 (30 μM , n = 7), Sal trisodica de 5'-trifosfato de adenosina monolitio (TNP, 100nM, antagonista de receptores P2X_1 , $\text{P2X}_{2/3}$, P2X_3 , n= 7) (Virginio y col., 1998) o ATP (100 μM , n=6).

Con el fin de evaluar indirectamente la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de retículo sarcoplásmico (SERCA), nosotros medimos la capacidad de los miocitos para rellenar las pozas de Ca^{2+} del RS. Antes de los experimentos, se evaluó la viabilidad de las células a través de la estimulación con cafeína 10 mM. Posteriormente, los miocitos fueron perfundidos con una solución libre de Ca^{2+} y 1 min después se estimuló con cafeína (S1) durante 10 min. La estimulación de cafeína en un medio libre de Ca^{2+} vacía completamente las pozas de Ca^{2+} del RS (Bazan-Perkins y col., 2003). Después, las células se lavaron en un medio libre de Ca^{2+} para eliminar la cafeína e inmediatamente fueron perfundidas con Krebs (2.0 mM de Ca^{2+}) durante 10 min para permitir el relleno de Ca^{2+} del RS. Por último, La estimulación con cafeína fue repetida (S2) bajo las misma condiciones libres de Ca^{2+} . En estos experimentos, la relación S2/S1 corresponde al grado de relleno de Ca^{2+} .

del RS. En algunos experimentos las células fueron estimuladas con LiCl (2 min) 4 minutos antes de S2.

Mediciones simultaneas de contracción y $[Ca^{2+}]_i$

Las tiras de músculo liso de tráqueas de cobayos (3 mm de ancho y 2 mm de largo) fueron incubados, durante 3.5 h a 37°C, burbujeado con carbógeno, en Krebs con Ca^{2+} , con 20 mM de fura-2/AM) más 1 mM de probenecid y 0.01 % de ácido plurónico para facilitar la incorporación del fluoroforo. Posteriormente, las tiras se lavaron durante 10-15 min con solución Krebs para eliminar el fluoroforo del medio extracelular. Cada preparación fue montada verticalmente en la parte inferior de una cubeta de polimetacrilato utilizando un adaptador especial de Photon Technology International (PTI). Cada cubeta contenía 4 ml de solución Krebs a 37°C con un pH de 7.4 y burbujeado con carbógeno y colocada en el interior de un fluorometro marca PTI. Las tiras musculares se colocaron en un transductor de tensión isométrica (FSG-01, Experimetria LTD, Budapest, Hungría) conectado a un convertidor analógico digital de PTI a través de un registrador EasyGraf (modelo TA240, Gould Electronics, Cleveland, OH, EUA).

Las tiras de músculo liso traqueal cargadas con fura-2/AM fueron excitadas alternadamente con un haz de luz con dos longitudes de onda de excitación que corresponde a 340 y 380 nm, la luz emitida fue colectada a 510 nm. La tasa de adquisición de fluorescencia fue de aproximadamente 0.8/s. Los registros obtenidos fueron almacenados en una computadora y analizados usando un programa de análisis y adquisición de datos (Felix v. 1.2.1, PTI).

Las preparaciones se mantuvieron en reposo durante 15 minutos a una tensión de 1 g antes de iniciar los diferentes protocolos experimentales. Con el propósito de corroborar la viabilidad del tejido se estimularon con KCl (60 mM) durante 10 minutos. Posteriormente, los tejidos se estimularon con ATP (100 μ M, 10 min), luego se lavaron e inmediatamente se incubaron con indometacina (1 μ M) durante 1 hora antes del segundo estímulo con ATP. Asimismo, se realizaron experimentos control sin indometacina.

Estudios de patch clamp

Se utilizó esta técnica para investigar el papel del KB-R7943 en los canales de Ca^{2+} de tipo L en células cultivadas de músculo liso de vías aéreas.

Los miocitos traqueales fueron obtenidos con la técnica que anteriormente describimos. El botón celular es suspendido en medio esencial mínimo (DMEM) el cual contiene suero fetal bovino al 10%, L- glutamina 2 mM, penicilina 10 U/ml, estreptomycin 10 mg/ml y 15 mM de glucosa y sembradas en cubre objetos cubiertos de colágena de cola de rata estéril. Las células se cultivaron a 37°C, con 5% de CO_2 y O_2 durante 24-48 hrs. Los cubre objetos se colocaron en una cámara de perfusión (~2 ml/min) que se encontraba en un microscopio invertido (Karl Zeiss), el cual es perfundido por la siguiente solución externa utilizada para medir las corrientes de Ca^{2+} , sustituimos el Ba^{2+} por el Ca^{2+} como transportador de carga entrante, (mM): NaCl 136, CsCl 6, BaCl_2 5, HEPES 10, Glucosa 11, y se ajustó a un pH de 7.3-7.4 con CsOH. Todos los experimentos se realizan a temperatura ambiente (~21°C).

Se utilizó la técnica de fijación de voltaje en células enteras y un amplificador Axopatch 200A (Axon instruments Co.) para registrar corrientes de Ca^{2+} activados por pulsos de voltajes despolarizantes (voltage clamp). Las pipetas se hicieron utilizando un restirador horizontal de pipetas (marca Sutter Instruments Co, modelo P-87), el rango de la resistencia varía entre 1-3 M Ω . La solución interna fue (mM): CsCl 130, MgCl 2, EGTA 10, HEPES 10, Sal disódica de ATP 3.6, Sal sódica de GTP 1.9 y se ajusto a un pH de 7.3-7.4 con CsOH 1 N. Con estas soluciones la resistencia de entrada de estas células fue de alrededor de 1 a 5 G Ω . Las corrientes de las células completas se filtraron a 1-5 KHz, digitalizados (Digidata 1322A, Axon) a 10 KHz, y almacenados en un computadora para su posterior análisis mediante un software especial (pCLAMP v10, Axon).

Para observar las corrientes de Ca^{2+} , los miocitos fueron estimulados con una serie de pulsos hiperpolarizantes y despolarizantes, con una duración de 500 ms a 1 Hz y que fueron desde -80 hasta 50 mV en incrementos de 10 mV a partir de un potencial de fijación a -60 mV. Después de la aplicación de éste protocolo, se añadió KB-R7943 (10 μM , n=6) o nifedipina (1 μM , n = 6), se registraron los cambios en las corrientes y se cuantificaron en el pico de la corriente máxima.

Western blot para receptores P2X

Las tiras de músculo liso traqueal de cobayos fueron obtenidas y congeladas en nitrógeno líquido, hasta su análisis. El tejido se homogenizó en un politrón (PT3100, Kinematica, Lucerna, Suiza) con una solución con 50 μ l de buffer de lisis de RIPA (Santa Cruz Biotechnology, No. sc-24948, Santa Cruz, CA, EUA), que contenía 4-(2-aminoetil) bencenosulfonilo fluoruro, pepstatina A, E-64, bestatin, leupeptina, y aprotinina como inhibidores de las proteasas. Las muestras homogenizadas se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min a 4°C. Se determinó la concentración de proteínas totales utilizando un ensayo comercial (proteína de ensayo RC DC, Catálogo 500-0119, Bio-Rad, Hercules CA, USA). Se cargaron 50 microgramos de la muestra en diferentes carriles de un gel de poliacrilamida al 10% de SDS, que se sometió a electroforesis en condiciones reductoras. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (Bio-Rad), y se bloquearon con leche en polvo descremada al 5 % en PBS (Tween, 20 al 0.1%) toda la noche a 4°C.

Las membranas se incubaron con anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra P2X₁ (cat. APR-001), P2X₂ (cat. APR-003), y P2X₃ (cat. APR-016, 1:200, Laboratorios Alomone, Jerusalén, Israel), durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario, IgG de cabra anti-conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante, (1: 5000), durante 1 hora a temperatura ambiente. Los Western blots se revelaron con reactivo quimioluminiscente intensificado (Luminol, Santa Cruz Biotechnology, cat. sc-2048 CA, EUA) y papel fotográfico (Amersham Hyperfil, ECL, Cat 28-9068-35, Buckinghamshire, UK). Los blots de los P2X se analizaron mediante densitometria leyendo densidades ópticas (arbitrarias) con un paquete computacional (Kodak Digital Science ID software versión 2.03 Eastman Kodak, New Haven, CT, EUA). Se incubo un anticuerpo monoclonal de ratón α -actina (Sigma, 1:2.500) como control de carga para las proteínas. Para determinar la especificidad de la inmunomarcación, se utilizó el antígeno para saturar el anticuerpo primario.

Fármacos

Sal disódica de 5'-trifosfato de Adenosina (ATP), sal tetralitio de 5' [γ -thio] trifosfato de adenosina (ATP γ S), sal disódica de suramina, reactivo azul 2 (RB2), sal tetrasódica de piridoxal fosfato-6-azo(benzeno-2,4- ácido di sulfónico (PPADS), 2', 3'-O-(2,4,6-trinitrofenil) sal trisódica de 5'-trifosfato de adenosina monolitio (TNP-ATP), 8-ciclopentil-1,3-dimetilxantina (DPCPX), N- etilmaleimida (NEM), indometacina, cloruro de litio, metoxiverapamil (D-600), nifedipina, 8-(Dietilamino)octil-3,4,5-trimetoxibenzoato hidrocloreuro (TMB-8) y cafeína fueron obtenidos de Sigma (St. Louis. Missouri, EUA). SKF 96365 fue adquirido de Biomol (Plymouth Meeting, PA, EUA). El 2-[2-[4-(4-nitrobenziloxi)fenil]etil] isotiourea mesilato (KBR 7943) y el SN-6 (2-[[4-[(4-nitrofenil)metoxi]fenil]metil]-4-tiazol dinocarboxílico ácido etil ester) se obtuvieron de Tocris Bioscience (Ellisville, MO, EUA). El fura-2/AM, KBR7943, DPCPX, fueron disueltos en DMSO.

Análisis estadístico.

Las diferencias en las respuestas de contracción y las $[Ca^{2+}]_i$ fueron evaluados mediante la utilización de pruebas t de Student pareada o no pareada, (ANOVA) de una vía o análisis de varianza de mediciones repetidas seguido de la prueba de Dunnett's o comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. Para evaluar la curva concentración-respuesta del ATP, ATP γ S con y sin indometacina se obtuvo la CE_{50} mediante análisis de regresión lineal del logaritmo de la concentración vs el porcentaje de la respuesta. . La significancia estadística se fijó a una $p < 0.05$ bimarginal. Los resultados tanto en el texto como en las figuras son expresados como promedio \pm error estándar de la media (ESM), la n corresponde al número de células y solo un experimento fue realizado por animal.

RESULTADOS

Estudios in vitro.

El ATP induce contracción a través de la producción de tromboxano A₂: Papel de los receptores P2Y.

En músculo liso traqueal de cobayo, el ATP (1, 10, 100 y 1000 μM) produce una contracción dependiente de la concentración con una CE_{50} de 11.4 μM (Fig. 3, n= 5-9). El $\text{ATP}\gamma\text{S}$ (n=4-8) también induce una contracción con la misma potencia (CE_{50} de 8.7 μM). La inhibición de la síntesis de prostaglandinas con indometacina 1 μM bloquea completamente la contracción por ATP a concentraciones menores a 100 μM , pero se observa una pequeña contracción en las cadenas traqueales a 1 mM de ATP. Estos resultados corroboran que la respuesta de contracción inducida por el ATP en el músculo liso traqueal de cobayo es indirecta ya que es bloqueada por la indometacina e involucra la producción de prostaglandinas broncoconstrictoras (tromboxano A₂), como anteriormente había sido reportado por Advenier y col., 1982.

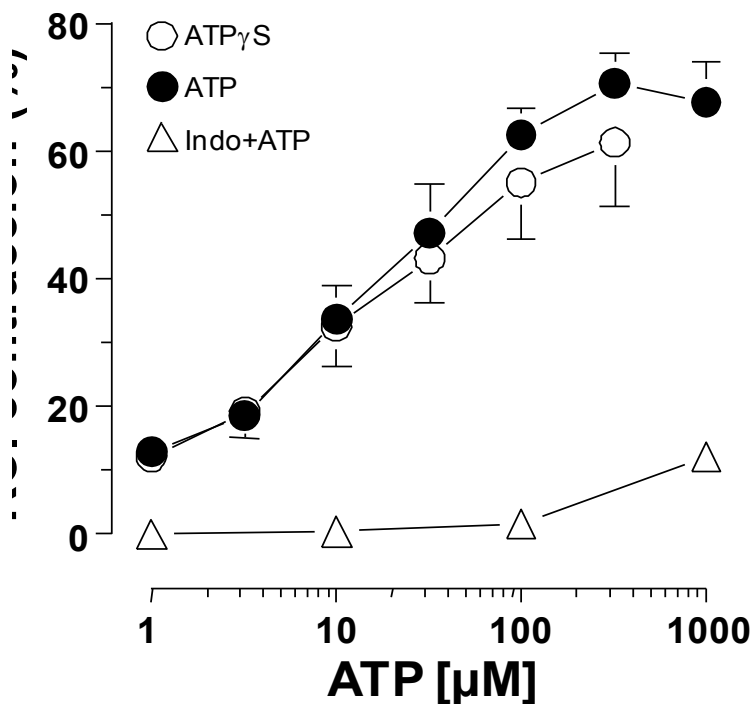


Figura 3. Efecto del ATP y del $\text{ATP}\gamma\text{S}$ con y sin indometacina en el músculo liso traqueal de cobayo. El ATP (n= 5-9) y $\text{ATP}\gamma\text{S}$ (n= 4-8; análogo no hidrolizable del ATP) produce una contracción dependiente de

la concentración mostrando la misma potencia y eficacia, indicando que la contracción es por ATP y no por sus metabolitos. La indometacina ($1 \mu\text{M}$, $n = 5-8$) inhibe completamente la respuesta por ATP desde 1 a $100 \mu\text{M}$ y se mantiene solo una contracción marginal a 1 mM , indicando que la contracción inducida por ATP es mediada principalmente por la producción de prostaglandinas. Los símbolos representan la media \pm SEM.

El papel de los receptores P2X y P2Y en la contracción inducida por el ATP, fue evaluado mediante la utilización de antagonistas de estos receptores.

Primero demostramos en este tejido, que la primera y segunda respuesta consecutiva de ATP ($100 \mu\text{M}$, con una duración de 1 hora entre cada respuesta, $n = 6$) no fueron diferentes (Fig. 4). Las respuestas contráctiles inducidas por ATP fueron disminuidas significativamente por suramina (100 y $300 \mu\text{M}$, $\sim 31 \%$, $n = 6$) y con RB2 (100 , $300 \mu\text{M}$, $\sim 57 \%$, $n = 8$), mientras que el PPADS ($30 \mu\text{M}$, $n = 6$) no modificó esta respuesta (Fig 4). Adicionalmente, la incubación con DCPCX (100 nM , $n = 5$) no modificó la contracción por ATP resistente a suramina (datos no mostrados).

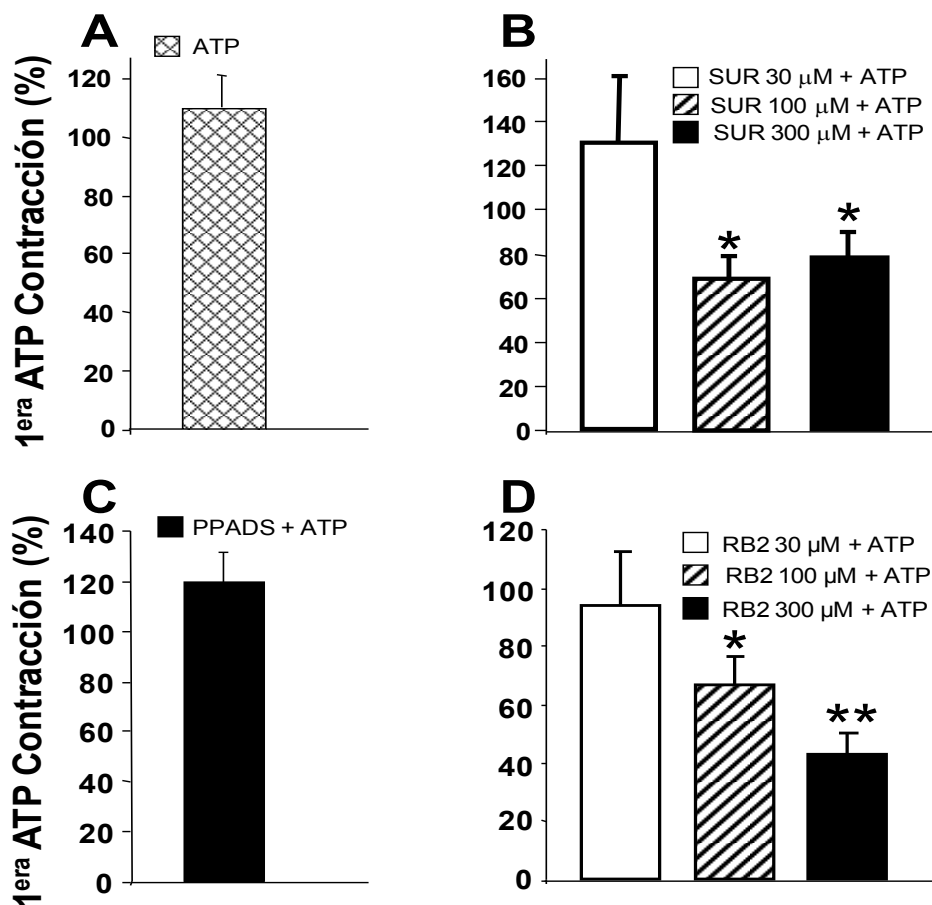


Figura 4. Efecto de los antagonistas de los receptores purinérgicos (P2) en la respuesta de contracción inducida por 100 μM de ATP en anillos traqueales de cobayos. **A)** La segunda respuesta de contracción a ATP no fue diferente a la primera, demostrando que el fenómeno de desensibilización no está presente en nuestras condiciones experimentales. En los paneles **B** y **D** se muestra que la suramina (SUR, n= 6) y el RB2 (n= 6) reducen significativamente la contracción inducida por ATP. El PPADS (30 μM) no modificó la respuesta al ATP. (panel C). Se utilizó la prueba t de Student para datos pareados, ya que cada grupo experimental fue comparado con su propio control *p<0.05, **p<0.01. Las barras representan la media ± ESM.

Mediciones simultáneas

El incremento de $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por el ATP no participan en la contracción: Papel de los receptores P2X y P2Y.

Con el propósito de explorar el papel del Ca^{2+} durante la contracción inducida por el ATP en tiras de músculo liso traqueal de cobayo, realizamos mediciones simultáneas de contracción y Ca^{2+} intracelular.

La aplicación de 100 μM de ATP ($n=3$) induce un cambio en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, constituido por un rápido incremento, que denominamos como Pico de Ca^{2+} (0.0314 ± 0.0049 , $F_{340/380}$). Esto fue seguido por una elevación sostenida de Ca^{2+} , la cual describimos como meseta (0.041 ± 0.004 , $F_{340/380}$, fig. 5). Estos incrementos en las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ van acompañados por una contracción del músculo liso. Una segunda estimulación con ATP produce un pico similar de Ca^{2+} (0.0520 ± 0.0340 , $F_{340/380}$) y una meseta (0.0493 ± 0.0349 , $F_{340/380}$). Cuando las tiras de músculo son incubadas con 1 μM de indometacina, la contracción inducida por ATP ($n=4$) es inhibida; pero no se produce cambios en los picos de Ca^{2+} (0.0368 ± 0.0061 ($F_{340/380}$) vs valores control (0.0360 ± 0.0060 , $F_{340/380}$). Sin embargo la meseta fue significativamente disminuida ($p < 0.05$) en presencia de indometacina (0.0137 ± 0.0032 , $F_{340/380}$) vs valores controles (0.0349 ± 0.0050 , $F_{340/380}$).

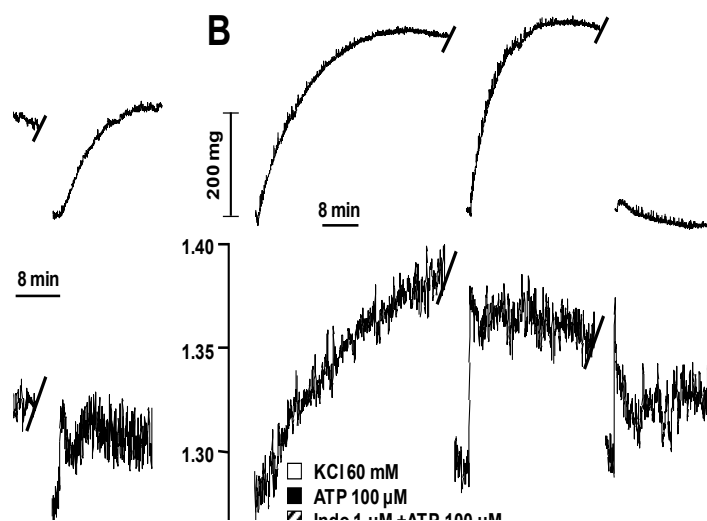


Figura 5. Registros originales de mediciones simultaneas de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la contracción en tiras de músculo liso traqueal de cobayo. A) El ATP induce incrementos bifásicos de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$, constituidos por un pico y una meseta, acompañados por una contracción. Una segunda estimulación con ATP produce una respuesta similar. B) Cuando las tiras de músculo liso son incubadas con indometacina (Indo) la contracción inducida por ATP es bloqueada. Los incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no se afectan, sin embargo la meseta disminuye significativamente con respecto al control.

La eliminación del epitelio de las tiras impide la contracción inducida por ATP y paradójicamente, produce un efecto de relajación ($134,9 \pm 20,2$ mg, $n=3$) sin afectar al pico y a la meseta de Ca^{2+} (Fig. 6).

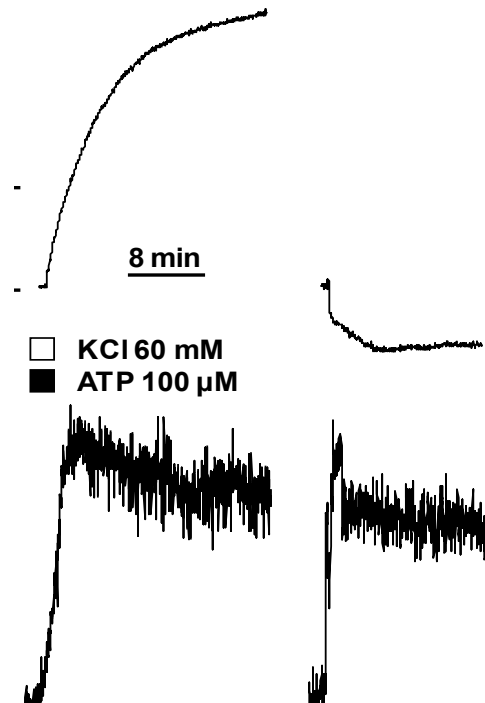


Figura 6. Registros originales de mediciones simultáneas de las $[Ca^{2+}]_i$ y la contracción en tiras de músculo liso traqueal de cobayo. La eliminación del epitelio de las tiras del MLVA inhibe la contracción inducida por ATP y sorpresivamente, produce un efecto de relajación, probablemente por estimulación directa en el músculo liso. El pico y la meseta de las $[Ca^{2+}]_i$ no se modifican.

Medición de las $[Ca^{2+}]_i$ en células recién disociadas.

El ATP activa al NCX_{REV} vía receptores $P2X$: Papel en el relleno de Ca^{2+} del RS

En célula única de músculo liso, la estimulación con ATP induce un pico de Ca^{2+} transitorio y una meseta que es dependiente de la concentración ($n=4$), estos incrementos en las $[Ca^{2+}]_i$ no son modificadas por indometacina ($n=6$). La meseta solo se observa a los estímulos de 100 y 1000 μ M de ATP (Fig. 7), Cabe destacar que la indometacina completamente anuló la respuesta de contracción en el tejido completo. Por lo tanto, el incremento de Ca^{2+} citosólico parece no estar asociado a la contracción inducida por el ATP en el tejido traqueal.

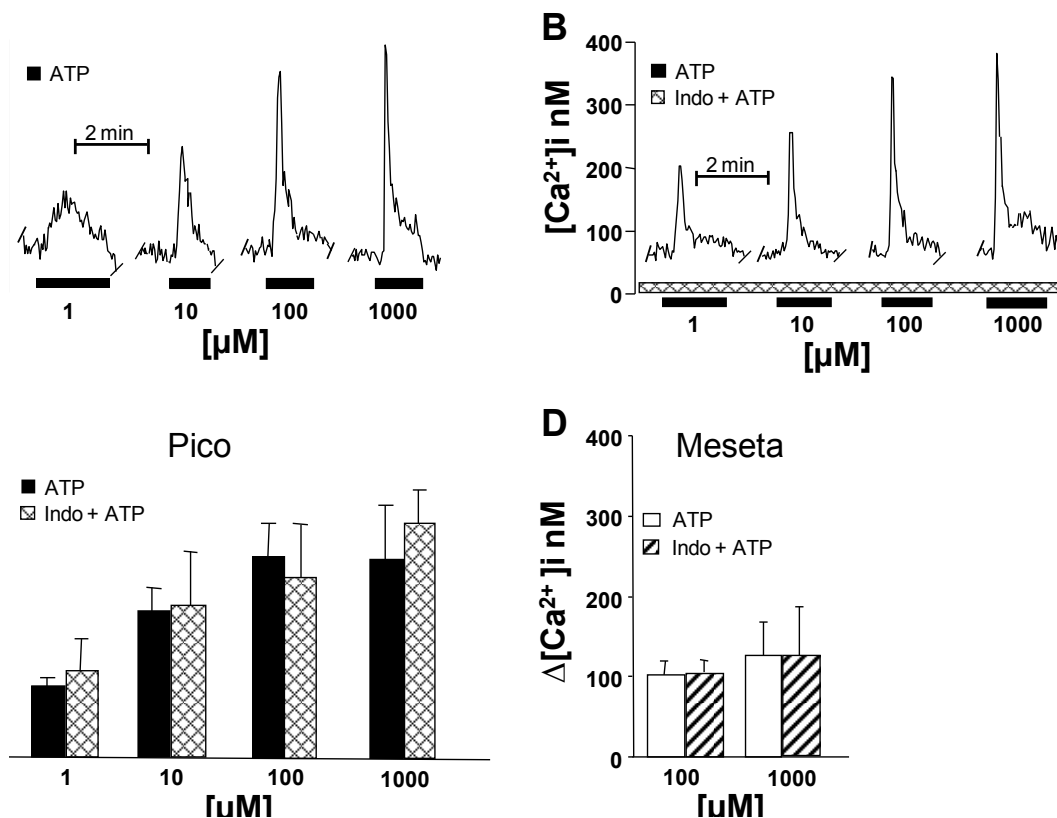


Figura 7. Efecto de la Indometacina (Indo, 1 mM) en la curva concentración respuesta de ATP en células traqueales de cobayo. **A)** se observa un registro original que muestra como el ATP induce incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dependientes de la concentración. En los paneles **B**, **C** y **D** se muestra que la indometacina no modifica el pico y la meseta en los incrementos de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por el ATP.

El incremento de Ca^{2+} inducido por el ATP 100 μM (325 ± 69 nM, $n = 17$) fue completamente inhibido por 100 μM de suramina (antagonista de los receptores P2X y P2Y, $n = 4$, $p < 0.01$), también fue disminuido significativamente por 100 μM de RB2 (antagonista de los receptores P2Y, $\sim 57\%$, $n = 7$, $p < 0.01$) y por 30 μM de PPADS (antagonista de los receptores P2X, $\sim 40\%$, $n = 6$, $p < 0.01$). Esta inhibición fue reversible ya que al volver a estimular con ATP, sin la presencia de estos antagonistas, el incremento de Ca^{2+} intracelular fue parecido al control (Fig. 8). Existen antecedentes que la suramina puede afectar la respuesta de los receptores acoplados a proteína G (Chung 2005), nosotros encontramos que 100 μM de suramina no afecta la respuesta a 10 μM de Carbacol ($n = 5$, dato nos mostrados) descartando tal efecto en nuestro modelo experimental. Además,

utilizamos KB-R7943 (10 μ M, n=6), SKF 96365 (30 μ M, n=5) y TNP-ATP (100 nM, n=6), los dos últimos disminuyeron significativamente los incrementos en las $[Ca^{2+}]_i$ de 450 ± 52 a 280 ± 30 nM ($\sim 37\%$, $p < 0.01$) y de 468 ± 106 a 357 ± 100 nM ($\sim 28\%$, $p < 0.01$), respectivamente.

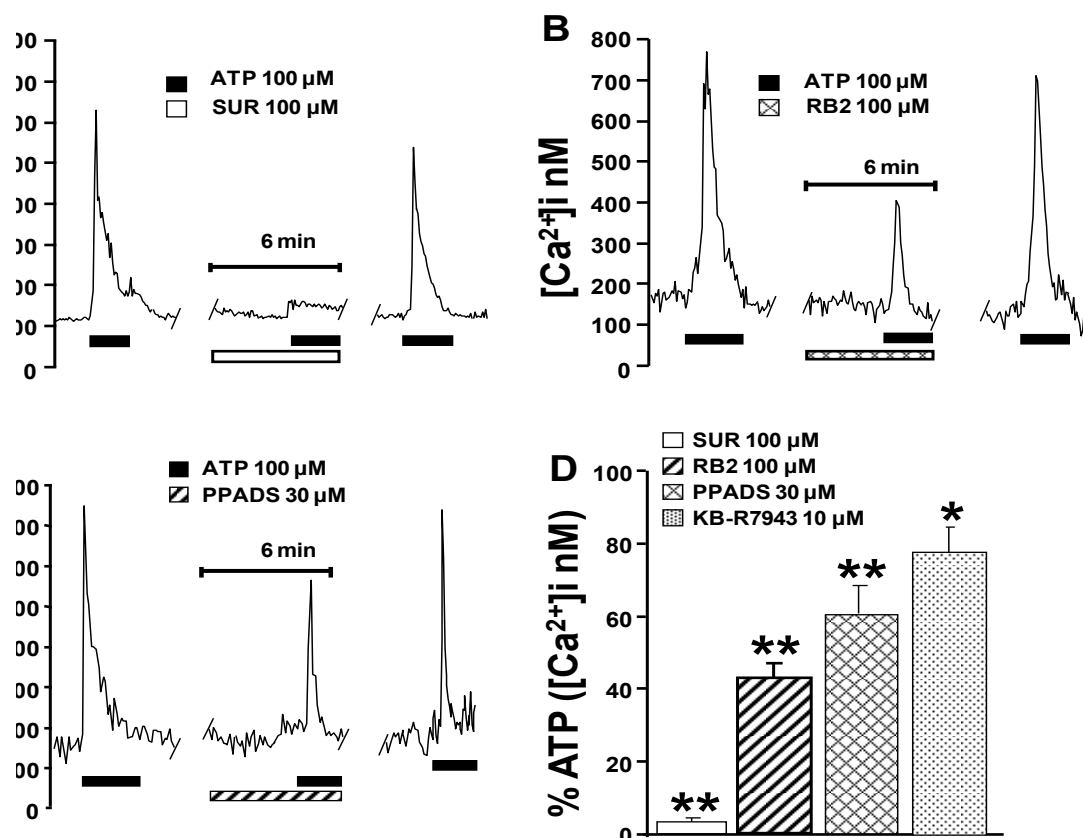


Figura 8. Efecto de la suramina (SUR, antagonista P2X y P2Y, panel A), RB2 (antagonista P2Y, panel B), y PPADS (antagonista P2X, panel C) en los incrementos del $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ATP. La incubación con SUR prácticamente inhibe los incrementos de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el ATP. El RB2 ($\sim 57\%$), PPADS ($\sim 40\%$) y el KB-R7943 ($\sim 22\%$) reducen parcialmente los incrementos de Ca^{2+} inducidos por ATP. * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Con el fin de corroborar que el RB2 estaba bloqueando los efectos del ATP a través de los receptores metabotrópicos P2Y, las células fueron incubadas con NEM (30 μ M), para desacoplar a las proteínas G y con TMB-8 (50 μ M) para inhibir la liberación de Ca^{2+} mediada por el receptor de IP_3 . Ambos fármacos disminuyeron ($\sim 44\%$, n=4 y $\sim 54\%$, n=4, respectivamente, $p < 0.01$) los incrementos de las $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por el ATP, de forma

muy similar a la observada cuando se incubo con RB2 (~54%), lo cual nos sugiere la participación de los receptores P2Y y la vía de la PLC β -IP $_3$ en estas respuestas (Fig. 9). Además, la incubación con TMB-8 y PPADS bloquea completamente los incrementos en las [Ca $^{2+}$] $_i$ producidos por el ATP (Fig. 9b, d), estos resultados confirman que el remanente de las respuestas debido a la inhibición del receptor de IP $_3$, corresponde a la activación de los receptores P2X. Adicionalmente, realizamos experimentos en medio sin calcio extracelular aplicando ATP 100 μ M a las células de músculo liso traqueal. Esta maniobra se realizó para corroborar que el incremento de [Ca $^{2+}$] $_i$ solo fuera del Retículo Sarcoplásmico (RS), ya que el ATP activaría a un receptor P2Y el cual activa la vía de la PLC β , produciendo IP $_3$ y este libera el Ca $^{2+}$ del RS cuando se une a su receptor. Se observó que la administración de ATP en medio sin Ca $^{2+}$ produjo un incremento de las [Ca $^{2+}$] $_i$ mucho menor (~57%, n=6, p<0.01, fig. 9c, d) al observado en un medio con Ca $^{2+}$.

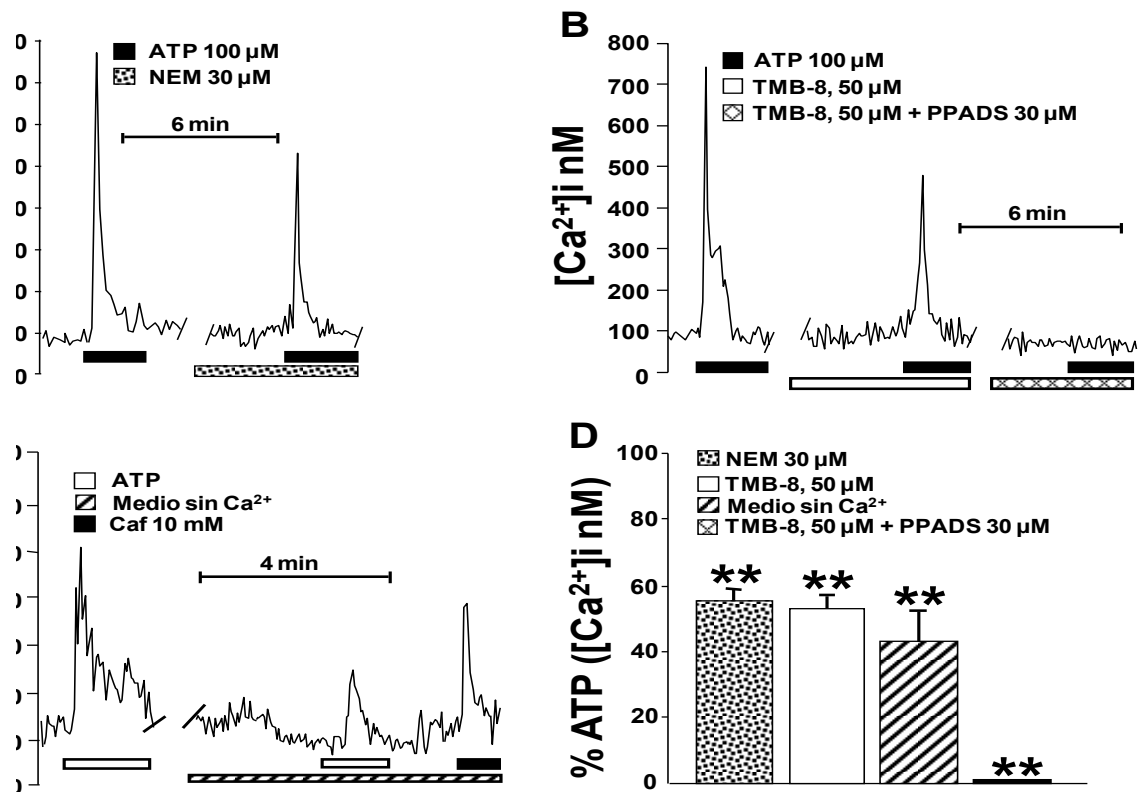


Figura 9. Los incrementos de [Ca $^{2+}$] $_i$ inducidos por el ATP son a través de la activación de los receptores P2 en miocitos traqueales de cobayo. En los grupos A y B se observa que la N-etilmaleimida (NEM, desacoplador de proteínas G) y TMB-8 (antagonista del receptor IP $_3$) disminuyen (~44%, ~46%,

respectivamente) los incrementos de las $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por el ATP, indicando la participación de los receptores P2Y en la respuesta a ATP. La incubación de TMB-8 y PPADS inhibió completamente los incrementos de las $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ATP, confirmando que la activación de los receptores P2X están involucrados en esta respuesta. En el panel C se observa una disminución de los incrementos de Ca^{2+} inducidos por ATP en un medio sin Ca^{2+} (~ 57%). Después de la respuesta a ATP corroboramos que el RS no estuviera vacío, estimulando con cafeína, la cual produjo un incremento transitorio en las $[Ca^{2+}]_i$. ** p <0.01

También se incubaron a los miocitos con D-600 (30 μ M) el cual no modificó los incrementos de Ca^{2+} inducidos por el ATP (valores control, 311 ± 57 vs valores D-600, 312 ± 55 nM, n = 4). Con estos resultados descartamos una supuesta participación de los canales de Ca^{2+} -tipo L en las respuestas de Ca^{2+} producidos por el ATP.

Por otro lado, ya establecido que los incrementos de las $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por el ATP en células es a través de receptores P2X y P2Y, tratamos de explorar cuales son los mecanismos activados por el ATP en los miocitos para incrementar los niveles de Ca^{2+} citosólico y cuál es la funcionalidad de este Ca^{2+} , que parece ser independiente de la contracción del MLVA. Uno de los posibles mecanismos del ATP es activar el modo reverso del intercambiador Na^+/Ca^{2+} a través de los receptores P2X y su posible participación en el relleno de Ca^{2+} del RS.

Para demostrar que el ATP estimula la activación del NCX_{REV} en nuestras células de músculo liso, primero demostramos la presencia funcional de esta proteína. En estas células, la sustitución de NaCl y $NaHCO_3$ por LiCl induce un incremento de las $[Ca^{2+}]_i$ (386 ± 84 nM) que corresponde a la activación del NCX_{REV} . Este efecto es bloqueado completamente por el KB-R7943 (n=3) demostrando que este incremento en las $[Ca^{2+}]_i$ es debido al NCX_{REV} . También tratamos de bloquear al NCX_{REV} con un nuevo inhibidor, el SN-6, este fármaco a concentraciones de 3 y 10 μ M no modifica las respuestas por el NCX_{REV} , pero observamos que a 30 μ M existe una reducción de ~17 %. Por lo anterior, podemos concluir que el SN-6 no es un inhibidor apropiado del NCX_{REV} en células de músculo liso de vías aéreas. Para poder analizar dos respuestas sucesivas del NCX_{REV} tuvimos que determinar cuál sería el tiempo necesario para poder obtener dos respuestas lo más similares entre ellas. Las células son estimuladas al momento 0 y 9 minutos (min) después (n=6) con LiCl y esta última respuesta fue expresada como porcentaje a la

observada a los 0 min (control). Como se observa en la Fig 10a, b, la respuesta a los 9 min se recupero ~87% de la respuesta control. Por lo tanto, en los siguientes experimentos evaluamos el efecto de ATP (100 μ M) en el NCX_{REV} , mostrando que el ATP incrementa significativamente ($p < 0.01$) el NCX_{REV} , como se muestra en la fig 10c, f, probablemente a través de la activación de los canales catiónicos inespecíficos (vía P2X) los cuales aumentan las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} y Na^+ , favoreciendo el cambio del NCX de su modo normal al reverso. Esta situación explicaría el efecto del ATP sobre el NCX.

Con el propósito de demostrar la participación de los receptores P2X en el efecto del ATP, utilizamos PPADS (30 μ M, antagonista de los receptores P2X). Sin embargo, encontramos que este compuesto inhibía al NCX_{REV} (hallazgo no reportado), por lo que no se pudo utilizar en estos experimentos. Por lo tanto, utilizamos un compuesto inespecífico que bloquea a todos los canales catiónicos inespecíficos, el SKF-96365 (30 μ M, $n=7$). La incubación de los miocitos con SKF-96365, completamente anuló el incremento del NCX_{REV} inducido por el ATP (Fig. 10 d, f, $p < 0.05$), sugiriendo la probable participación de receptores P2X en este fenómeno. Esto último lo corroboramos utilizando TNP-ATP (100 nM, antagonista selectivo para P2X_1 , P2X_3 y $\text{P2X}_{2/3}$). La pre-incubación con este antagonista también inhibió al NCX_{REV} (Fig. 10e, f, $n=7$, $p < 0.05$) sugiriendo la participación de al menos alguno de estos tres subtipos de P2X.

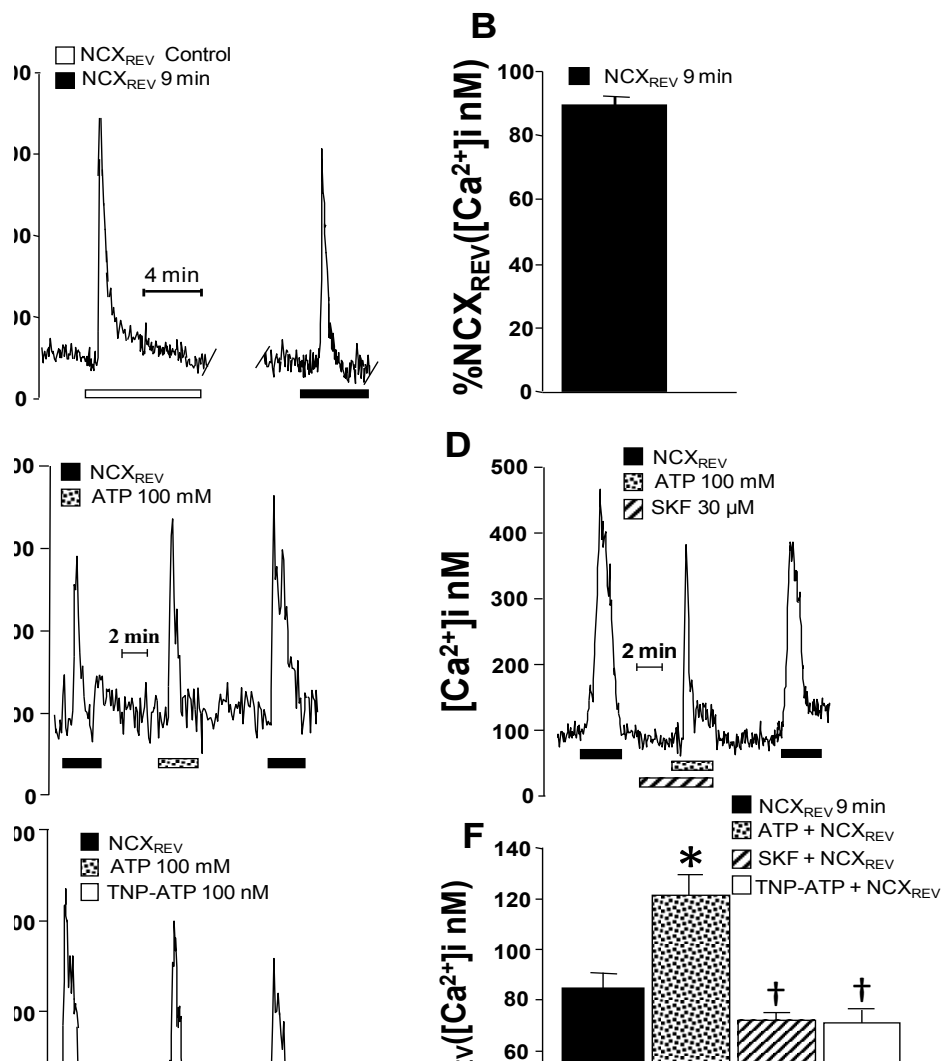


Figura 10. Efecto del ATP sobre el NCX_{REV} en células de MLVA de cobayo. **A)** Se puede apreciar que la sustitución del NaCl y NaHCO₃ por LiCl produce un incremento en las [Ca²⁺]_i que corresponde a la activación del NCX_{REV} (control). Los miocitos se estimularon nuevamente con LiCl a los 9 min y la respuesta al LiCl fue de ~87% con respecto al control. **B)** Análisis estadístico de las respuesta producidas por el NCX_{REV}. **C)** Se observa que el ATP aumenta la respuesta del NCX_{REV}. **D), E)** Muestran el efecto del SKF-96365 (antagonista de canales catiónicos inespecíficos) y del TNP-ATP (antagonista de receptores P2X₁, P2X₂, P2X₃) sobre el aumento de la respuesta del NCX_{REV} inducida por el ATP. **F)** Análisis estadístico *p<0.01, †p<0.01.

Los resultados anteriores indican que el incremento de las $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el ATP en miocitos es a través de diferentes mecanismos y que este Ca^{2+} no participa en la contracción del MLVA.

Existen antecedentes de que la fase reversa del intercambiador Na^+/Ca^{2+} podría promover el relleno del retículo sarcoplásmico (RS) para favorecer la contracción a estímulos sucesivos (Hirota y col., 2007), por lo tanto, investigamos la posibilidad de que el aumento en las $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la activación del NCX_{REV} podría participar en el relleno de Ca^{2+} del RS. Para explorar esta alternativa, medimos indirectamente la actividad de la ATPasa del RS en células de músculo liso traqueal de cobayo (Carbajal V y col., 2005). Para tal efecto, utilizamos el cociente S2/S1, (S1, primer estímulo con cafeína, S2, segundo estímulo con cafeína; ver detalles en la figura 11). Encontramos que bajo nuestras condiciones experimentales el cociente S2/S1 fue de alrededor de 0.74 ± 0.06 , ($n=5$, Fig 11a, d), es decir, después de vaciar el RS de su contenido de Ca^{2+} disponible, se obtuvo un 74% de llenado de Ca^{2+} de estas pozas. Cuando se activó la fase reversa del NCX, 4 min antes de S2, encontramos que el cociente S2/S1 se incrementó significativamente a $(1.17 \pm 0.06, n=6, p < 0.01; Fig 11b, d)$, es decir, un 43% más que su respectivo control. Estos resultados demuestran que el NCX_{REV} favorece el relleno de Ca^{2+} del RS.

Por otro lado, también investigamos si el incremento de las $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por la activación del receptor P2X estaba participando en el relleno de Ca^{2+} del RS. Para demostrarlo, nosotros bloqueamos el receptor P2Y con RB2 (100 μM) y bajo estas condiciones encontramos que el ATP (100 μM) incrementa el cociente de S2/S1 ($1.15 \pm 0.04, n=6; Fig. c, d$). El aumento de este cociente inducido por la activación del receptor P2X fue bloqueado por el KB-R7943 (10 $\mu M, 0.98 \pm 0.06, n=5$), y cuando inhibimos la activación del receptor P2X con suramina (100 $\mu M, n=4$) se previene el efecto del ATP en el relleno de Ca^{2+} del RS (Fig. 11d), esto nos demuestra que el receptor P2X participa en este fenómeno de relleno.

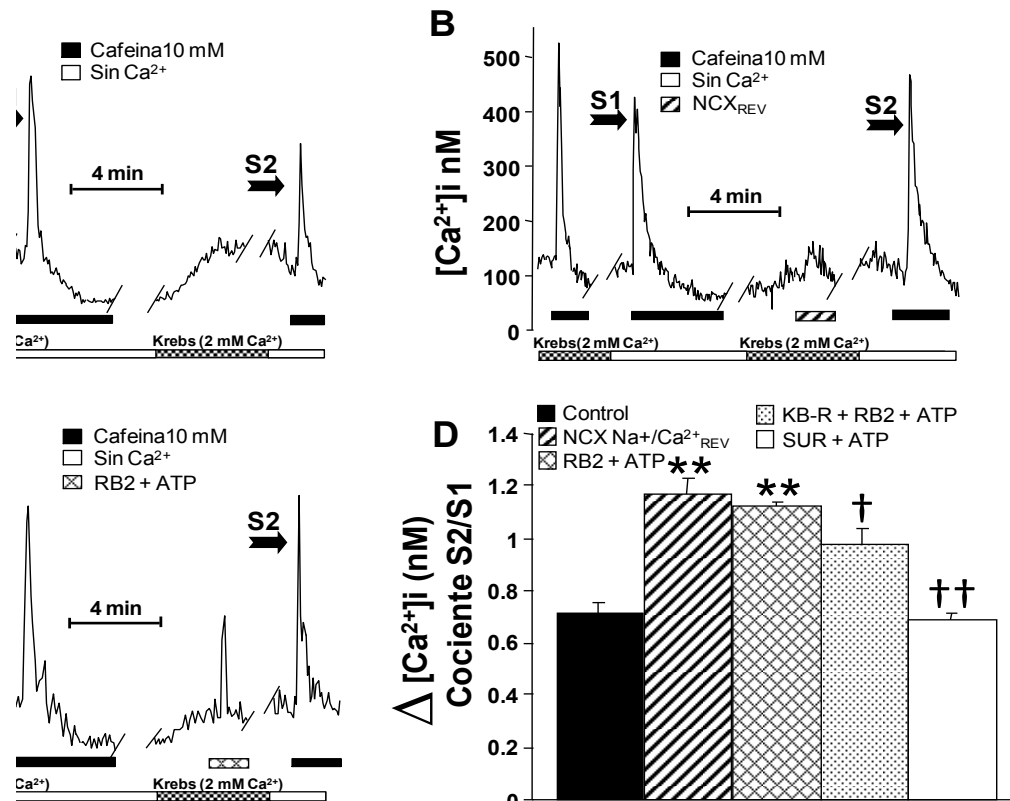


Figura 11. Efecto del P2X y del NCX_{REV} en el relleno de Ca^{2+} del RS en células de MLVA de cobayos. **A)** protocolo experimental para evaluar el relleno de Ca^{2+} del RS con cafeína (~ 69%) **B)** Efecto del NCX_{REV} en el relleno de Ca^{2+} del RS. **C)** Efecto de la activación de los receptores P2X por el ATP (100 μ M, en presencia de RB2 100 mM) en el relleno del RS. **D)** El análisis estadístico muestran que NCX_{REV} incrementa significativamente el relleno del RS (expresado como cociente S2/S1) en relación al grupo control (n= 5). Además, este cociente también se incremento significativamente por la activación de los receptores P2X y disminuyó significativamente cuando el NCX_{REV} fue bloqueado por KB-R7943 (10 μ M). La inhibición de los receptores P2X con suramina (100 μ M) bloqueo el efecto del ATP en el relleno de Ca^{2+} al RS. **p<0.01 comparado con el grupo control, †p<0.05, ††p<0.01 comparado con el grupo de RB2 + ATP.

A raíz de los resultados anteriores, decidimos evaluar, en órganos aislados si el NCX_{REV} podría estar participando en la contracción inducida por ATP. Lo primero que realizamos fue evaluar la respuesta de contracción por ATP (n= 10, para los primeros tres estímulos sucesivos y n= 4 para el último estímulo) el cual no mostro diferencias entre ninguno de los 4 estímulos. Sin embargo la inhibición de la entrada de Ca^{2+} por el intercambiador en su forma reversa por KB-R7943, (n= 9 para los tres primero estímulos y n= 4 para el último estímulo) reduce progresivamente la segunda, tercera y cuarta respuesta de contracción

inducida por ATP ($p < 0.01$, fig. 12). Estos resultados demuestran que durante la contracción inducida por el ATP se está activando al NCX_{REV} y que la entrada de Ca^{2+} vía este intercambiador provee una fuente de Ca^{2+} para rellenar al RS.

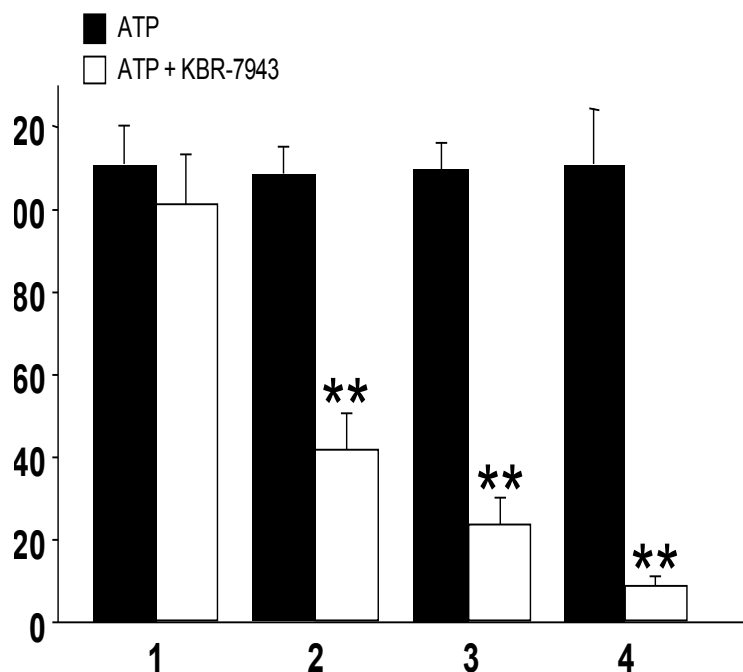


Figura 12. Efecto del KB-R7943 (10 μM) en los estímulos sucesivos por ATP (100 μM) en anillos traqueales de cobayo. Las 4 respuestas sucesivas a ATP no fueron diferentes entre ellas. El KB-R7943 inhibió significativamente la contracción inducida por el ATP en la segunda, tercera y cuarta estimulación. $p < 0,01$. Los ejes Y-X ajustar los tamaños de las letras y números a las figuras anteriores.

Estudios de path clamp.

El KB-R7943 no modifica las corrientes de Ca^{2+} en miocitos traqueales y disminuye ligeramente la contracción del MLVA inducidas por el KCl

Existen antecedentes en células de corazón de perro y en células TsA 201, donde han reportado que el KB-R7943 puede bloquear al Canal de Ca^{2+} tipo L (Birinyi y col., 2005, Ouardouz y col., 2005), probablemente en nuestro modelo experimental la inespecificidad del KB-R7943 podría explicar en realidad los efectos observados en la contracción inducida

por el ATP. Sin embargo, realizamos algunos experimento y descartamos esta posibilidad cuando observamos que el KB-R7943 no modificó las corrientes de calcio en los miocitos traqueales (Fig. 13b) y solo disminuye ligeramente la contracción del músculo liso por el KCl ($n = \sim 10\%$, $n = 5$, $p < 0.05$; Fig. 13A). Sin embargo, cuando incubamos a las células con nifedipina las corrientes de Ca^{2+} fueron casi anuladas en su totalidad (Fig. 13B), por otra parte cuando el tejido en órganos aislados es incubado con D-600, la contracción inducida por el KCl es completamente bloqueada. (Fig. 13A). Estos resultados comprueban en nuestro modelo experimental que el KB-R7943 no modifica las corrientes de calcio en células cultivadas de músculo liso traqueal y disminuye ligeramente la contracción muscular inducida por KCl en anillos traqueales de cobayo.

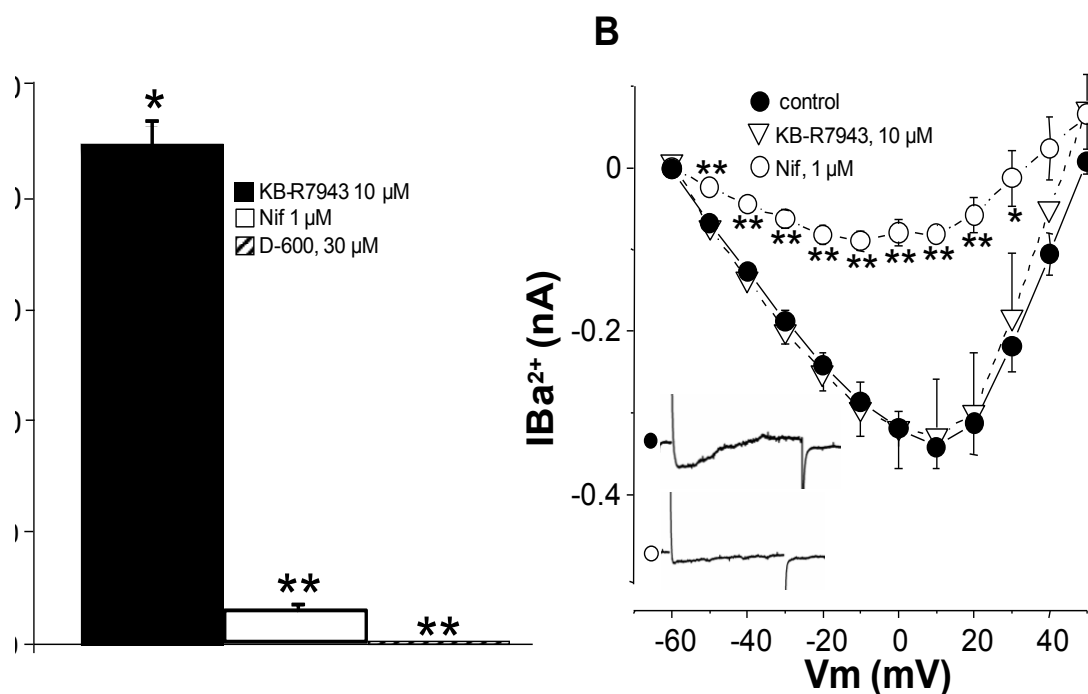


Figura 13. A) Efecto del KB-R7943 (bloqueador del NCX_{REV}), nifedipina y D-600 (bloqueadores del canal de Ca^{2+} tipo L) en la contracción inducida por KCl (60 mM) y en las corrientes de Ca^{2+} del MLVA del cobayo. **B)** El KB-R7943 no modificó la corriente de Ba^{2+} pero disminuyó ligeramente la contracción inducida por KCl ($p < 0.05$, $\sim 10\%$). Sin embargo, la nifedipina (Nif, $n = 6$), disminuyó significativamente las corrientes de Ba^{2+} y la contracción inducida por KCl. El D-600 bloqueó la respuesta de contracción por KCl.

Caracterización de los receptores P2X en el MLVA a través de Western blot.

Los receptores P2X₁, P2X₃, se localizan principalmente en el MLVA de cobayo.

Los análisis de densitometría realizados a los Western blot mostraron que de los tres receptores P2X explorados, P2X₁ y P2X₃ son los principales receptores que se localizan en el músculo liso de vías aéreas de cobayo y que el P2X₂ parece ser el de menor expresión en este tejido (Fig. 14).

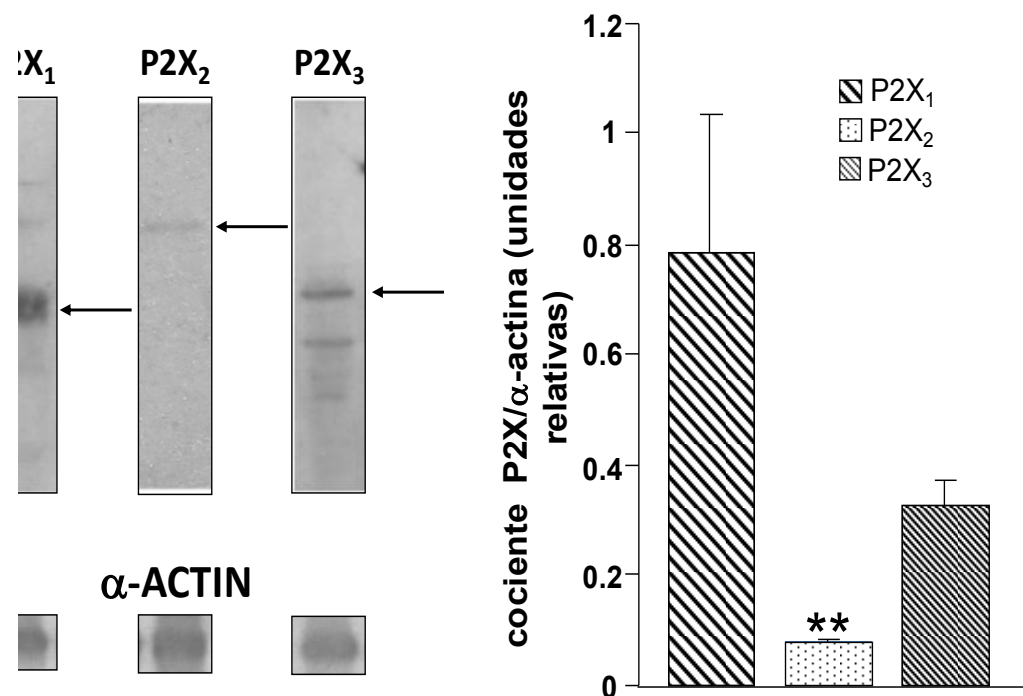


Figura 14. El panel izquierdo, representa las bandas de receptores P2X₁ (~50 kD), P2X₂ (~75 kD) y P2X₃ (~55 kD), indicado por las flechas. Los kD son expresados de acuerdo a las especificaciones de los anticuerpos comerciales. α-actina (40 kD) es utilizado como control de carga de las proteínas. La imagen de la derecha muestra los datos de las densitometrías obtenidas del análisis de los Western blots para los receptores P2X en el MLVA de cobayo** p <0,01.

DISCUSION

El hallazgo principal de este estudio es que, en el músculo liso de las vías aéreas del cobayo, el ATP activa al modo reverso del intercambiador Na/Ca^{2+} a través de la apertura de los receptores-canal P2X, en particular de los receptores P2X₁ y P2X₃; ambos mecanismos favorecen el relleno de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. Se sabe que el ATP es el único agonista capaz de activar a los receptores-canal P2X y este estudio es el primero en demostrar su papel en el relleno de Ca^{2+} del RS. Este proceso probablemente facilite la disponibilidad de Ca^{2+} para la acción de los agentes broncoconstrictores que actúan a través de la vía de señalización $\text{PLC}\beta\text{-IP}_3$.

La contracción del músculo liso de las vías aéreas inducida por ATP ha sido ampliamente descrita en múltiples especies animales, incluyendo a los humanos (Bergner & Sanderson, 2002, Fedan y col., 1994, Kamikawa y col., 1976, Michoud y col., 1999, Mounkaïla y col., 2005). En el cobayo, esta respuesta es dependiente del epitelio y requiere de la formación de prostaglandinas y tromboxanos (Adevenier y col., 1982, Fedan y col., 1993). Por medio de la técnica de mediciones simultáneas, corroboramos que el ATP induce un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y una contracción del músculo liso traqueal. Esta contracción es un efecto indirecto mediado por prostaglandinas provenientes del epitelio y a la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante la meseta. Sin embargo, esta contracción es independiente del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la estimulación directa de los receptores purinérgicos del músculo liso, como quedó demostrado con el uso de indometacina y la remoción del epitelio, en donde ambas maniobras bloquearon la contracción por ATP pero no el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Este resultado se reforzó con los experimentos en célula única, en los que el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por ATP no se alteró al usar indometacina. En resumen, el ATP induce aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$: indirectamente, probablemente actuando a través del epitelio y directamente sobre el músculo liso. El efecto indirecto del ATP induce contracción mediada por prostaglandinas (tromboxano A₂). A este respecto, se ha reportado que el tromboxano induce contracción e incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en músculo liso de vías aéreas de bovino (Takata y col., 1999). La activación directa de los receptores del músculo liso parece estar relacionada con el relleno de Ca^{2+} del RS y la relajación del tejido como fue demostrado por Montaña et al (2011).

Por otro lado, la remoción del epitelio de las vías aéreas del cobayo no sólo evitó la contracción, sino que, paradójicamente, indujo relajación. Basta decir que esta relajación inducida por ATP parece dependiente de prostaglandinas porque no se observó en la presencia de indometacina y es un efecto directo sobre el músculo liso porque persiste después de la remoción del epitelio. Recientemente Montaña y col. (2011) publicaron que la activación de los receptores P2Y, principalmente P2Y₂ y P2Y₄, por el ATP en MLVA de cobayo, puede producir prostaglandinas directamente en el músculo liso (independiente de epitelio) llevando a la activación de los canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ y los canales de K⁺ dependientes de voltaje. La activación de los canales de K⁺ ocurre a través de la activación de la vía del AMPc. Este reporte concuerda con lo descrito por Mounkaïla y col. (2005) en MLVA de rata donde sugiere que la relajación es inducida por la producción de prostaglandinas y la subsecuente activación de la PKA.

En los experimentos de órganos aislados encontramos que la indometacina abatió la contracción inducida por $\leq 100 \mu\text{M}$ de ATP; los receptores P2Y están parcialmente involucrados en esta contracción, pues tanto suramina como RB2 (antagonistas de los receptores P2Y) disminuyeron el efecto del ATP. En contraste, un inhibidor de la mayoría de los receptores P2X, el PPADS no mostró resultado alguno. Parece que la contracción en el músculo liso traqueal de cobayo está mediada por receptores A1 (Farmer y col., 1988). Sin embargo, 8-ciclopentil-1,3-dimetilxantina (un antagonista del receptores A1) no modificó la contracción inducida por ATP resistente a suramina (datos no mostrados); así se descartó la posible participación de los receptores A1 en esta respuesta. Una posible explicación para la contracción inducida por ATP resistente a suramina y RB2, es que el ATP está activando receptores P2Y resistentes a estos antagonistas, como ha sido demostrado en otros tejidos (Barajas López y col., 2000, Mendoza Fernandez y col., 2000). También en este rubro, es necesario investigar más a fondo.

El incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por ATP se ha asociado con la activación de receptores P2Y y P2X en las vías aéreas de diversas especies (Bergner & Sanderson, 2002, Govindaraju y col., 2005, Mounkaïla y col., 2005); pero, este es el primer reporte en el músculo liso de las vías aéreas del cobayo en el que se demuestra que ambos receptores purinérgicos son responsables del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por ATP. Los resultados de los experimentos con PPADS y SKF 96365 (redujeron en ~40% el

incremento de la $[Ca^{2+}]_i$) sugieren la posible participación de los receptores P2X. Para determinar el subtipo del receptor P2X que participa en este fenómeno, usamos TNP-ATP (un antagonista de receptores P2X₁, P2X₃, y P2X_{2/3} heterotriméricos). Esta sustancia es selectiva para los tres receptores a concentraciones ≤ 100 nM en células HEK 293 (Virginio C, 1998). En miocitos de tráquea de cobayo, encontramos que 100 nM de TNP reduce significativamente el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ATP. En este contexto, corroboramos la presencia de receptores P2X a través de Western blots y establecimos que P2X₁ y P2X₃ son los más comunes en el músculo liso; esto sugiere que al menos en parte, el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ está mediado por la apertura de cualquiera de estos receptores P2X. El receptor P2X₄ parece que no participa en el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ATP o tiene un papel marginal, puesto que la suramina, que no bloquea a este receptor (Burstock G, 2010), casi anuló el aumento de Ca^{2+} intracelular inducido por la purina.

Los receptores P2X son canales catiónicos no selectivos operados por ligando que al ser activados podrían incrementar sensiblemente la concentración subplasmalemal de Na^+ . Este incremento activaría al NCX_{REV} , permitiendo la entrada de Ca^{2+} y la salida de Na^+ (Blaustein & Lederer, 1999, Cai y col., 2007). Es por eso que la activación de los receptores P2X por el ATP podría modular al NCX. En efecto, establecimos que el ATP activa al NCX_{REV} . Los hallazgos experimentales que sustentan esto son: (1) al bloquear al NCX_{REV} con KB-R7943, disminuyó el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ATP (Fig. 8); (2) la incubación con ATP antes de la activación del modo reverso del NCX, aumentó significativamente esta respuesta y este efecto fue abatido completamente cuando las células se preincubaron con inhibidores de los receptores P2X (Fig. 10) y (3) el ATP, a través de los receptores P2X, activa el relleno de Ca^{2+} del RS que se bloquea parcialmente con KB-R7943 (Fig. 11).

En experimentos realizados en músculo liso de tráquea de bovino, Hirota y col., (Hirota & Janssen, 2007, Hirota y col., 2007) concluyeron que los agonistas como la acetilcolina, la histamina y la serotonina activan al NCX_{REV} para proveer Ca^{2+} para el relleno del almacén. Nuestros resultados con células de tráquea de cobayo mostraron que el NCX_{REV} incrementa la actividad de la ATPasa del RS para rellenar el almacén. Además, encontramos que la activación de los receptores P2X también incrementa la actividad de esta bomba. Puesto que el ATP favorece NCX_{REV} y estimula a los receptores P2X,

consideramos que esta purina incrementa el relleno de Ca^{2+} del RS. Este resultado se corroboró con los experimentos de órganos aislados en los que las contracciones sucesivas inducidas por ATP disminuyeron significativamente con KB-R7943.

Se han reportado acciones inespecíficas del KB-R7943, tales como la inhibición de los canales de Na^+ dependientes de voltaje, canales de Ca^{2+} tipo L y corrientes de K^+ (Birinyi y col., 2005, Cai y col., 2007, Watano y col., 1999). Es, sin embargo, poco probable que cualquiera de estos efectos potenciales esté involucrado en las acciones del KB-R7943 que aquí se discuten. En este contexto, el músculo liso de las vías aéreas no tiene canales de Na^+ dependientes de voltaje. En la tráquea de cobayo, solo las neuronas paratraqueales expresan esos canales. Estas células no podrían estar participando en la contracción inducida por ATP, porque la incubación con $3.1 \mu\text{M}$ de tetrodotoxina no modificó la respuesta a ATP ($n=3$, datos no mostrados).

Con respecto a las Corrientes de K^+ , si el KB-R7943 bloquea a estos canales en el músculo liso de las vías aéreas, cabría esperar que ese efecto favorecería la contracción y sin embargo observamos una inhibición de la contracción en la presencia de KB-R7943.

También se ha reportado que KB-R7943 bloquea a los canales de Ca^{2+} tipo L en cardiomiocitos ventriculares de canino y en células tsA-201 (Birinyi y col., 2005, Ouardouz y col., 2005), y este efecto podría afectar la contracción inducida por ATP. Sin embargo encontramos que el KB-R7943 no alteró las corrientes de Ca^{2+} en los miocitos traqueales y disminuyó muy poco la contracción muscular inducida por KCl ($\sim 10\%$). Por lo tanto, nuestros resultados con KB-R7943 sugieren que la participación del canal de Ca^{2+} tipo L es mínima y que los efectos observados se deben primordialmente al NCX_{REV} . Sin embargo, es probable, que $\sim 10\%$ del efecto del KB-R7943 sobre las respuestas sucesivas a ATP este mediado por canales de Ca^{2+} tipo L. No fue factible comprobar este postulado, ya que el SN-6, un inhibidor más selectivo del NCX_{REV} (Iwamoto y col., 2002), apenas modificó la respuesta observada con LiCl en los miocitos traqueales a concentraciones mayores a $30 \mu\text{M}$ ($\sim 17\%$), sugiriendo que este reactivo es un inhibidor débil del NCX_{REV} en el músculo liso de las vías aéreas. SEA 0400 también es un inhibidor del NCX_{REV} , pero solo está disponible en Japón.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que el ATP:

(1) Promueve indirectamente la contracción del músculo liso al inducir la producción de prostaglandinas broncoconstrictoras, lo cual involucra receptores P2Y epiteliales; (2) incrementa la $[Ca^{2+}]_i$ de manera independiente de las prostaglandinas al activar receptores P2X y P2Y en el músculo liso y este aumento en $[Ca^{2+}]_i$ no participa en la contracción inducida por ATP y (3) activa a los receptores P2X₁ y P2X₃ y al NCX_{REV} para rellenar al RS y facilitar la disponibilidad de Ca^{2+} para los agentes broncoconstrictores que actúan a través de la cascada de señalización PLC_β-IP₃.

El significado fisiológico de estos hallazgos es complejo, pero evidentemente el ATP parece tener sus efectos dependiendo del sitio en que se libera. In vivo, si el ATP es sólo liberado cerca del epitelio (por plaquetas y células cebadas) induciría la contracción indirecta sin producir relleno de Ca^{2+} del RS. En apoyo a esta idea, se ha reportado que en preparaciones tráqueales perfundidas, la administración intraluminal de ATP (<10 μ M) indujo contracciones notorias que fueron dependientes del epitelio y de prostaglandinas, mientras que el ATP no produjo respuesta alguna cuando fue administrado extraluminalmente (Fedan y col., 1993). En el caso de que el ATP se liberase directamente al músculo liso desde las varicosidades nerviosas (Burstock, 2010), cabría esperarse que el efecto principal fuera el relleno de Ca^{2+} del RS y los dos mecanismos podrían suceder simultáneamente; sin embargo la demostración de estos eventos requieren de mayor investigación.

BIBLIOGRAFIA

1. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 517-529
2. Dettbarn C, Györke S, Palade P. Many agonists induce "quantal" Ca²⁺ release or adaptive behavior in muscle ryanodine receptors. *Mol Pharmacol* 1994; 46: 502-507
3. Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev* 1996; 76: 967-1003
4. Marín J, Encabo A, Briones A, García-Cohen EC, Alonso MJ. Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: calcium pumps. *Life Sci* 1999; 64: 279-303.
5. Kamm KE, Stull JT. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1985;25:593-620
6. Rohrer DK, Kobilka BK. G protein-coupled receptors: functional and mechanistic insights through altered gene expression. *Physiol Rev* 1998; 78:35-52
7. Hockerman GH, Girvin ME, Malbon CC, Ruoho AE. Antagonist conformations with the β 2-adrenergic receptor ligand binding pocket. *Mol Pharmacol* 1996; 49:1021-32
8. Strader CD, Fong TM, Graziano MP, Tota MR. The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J.* 1995; 9:745-54
9. Smrcka AV, Hepler JR, Brown KO, Sternweis PC. Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science.* 1991;15:804-7
10. Taylor SJ, Smith JA, Exton JH. Purification from bovine liver membranes of a guanine nucleotide-dependent activator of phosphoinositide-specific phospholipase C. Immunologic identification as a novel G-protein alpha subunit. *J Biol Chem* 1990 ;265:17150-6
11. Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV, Bley KR, Fox AP. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci* 1988 ;11:431-8.
12. Tsien RW, Ellinor PT, Horne WA. Molecular diversity of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci* 1991;12:349-54

13. Catterell WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 2005 ;57:411-25
14. Xu W, Lipscombe D. Neuronal Ca(V)1.3alpha(1) L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci* 2001; 15;21(16):5944-51
15. Somlyo AP, Somlyo AV. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 2003 ;83:1325-58
16. Carbajal V, Vargas MH, Flores-Soto E, Martínez-Cordero E, Bazán-Perkins B, Montaña LM. LTD₄ induces hyperresponsiveness to histamine in bovine airway smooth muscle: role of SR-ATPase Ca²⁺ pump and tyrosine kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288:84-92
17. Montaña LM, Bazán-Perkins B. Resting calcium influx in airway smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol*. 2005; 83:717-723
18. Sieck GC, Kannan MS, Prakash YS. Heterogeneity in dynamic regulation of intracellular calcium in airway smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75:878-888
19. Reuter H, Seitz N. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol* 1968; 195: 451-460
20. Baker PF, Blaustein MP, Hodgkin AL, Steinhardt RA. The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. *J Physiol* 1969; 200: 431-458
21. Glitsch HG, Reuter H, Scholz H. The effect of the internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea-pig auricles. *J Physiol* 1970; 209: 25-43
22. DiPolo R, Beaugé L. Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions. *Physiol Rev* 2006; 86: 155-203
23. Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 1999; 79: 763-854
24. Matsuda T, Takuma K, Baba A. Na⁺/Ca²⁺ exchanger: physiology and pharmacology. *Jpn J Pharmacol* 1997; 74: 1-20
25. Watanabe Y, Koide Y, Kimura J. Topics on the Na⁺/Ca²⁺ exchanger: pharmacological characterization of Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibitors. *J Pharmacol Sci* 2006; 102: 7-16

26. Niggli E, Lederer WJ. Molecular operations of the sodium-calcium exchanger revealed by conformation currents. *Nature* 1991; 349: 621-624
27. Bers DM. Species differences and the role of sodium-calcium exchange in cardiac muscle relaxation. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 639: 375-385
28. Fabiato A. Stimulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol* 1985; 85: 291-320
29. Lederer WJ, Cannell MB, Cohen NM, Berlin JR. Excitation-contraction coupling in heart muscle. *Mol Cell Biochem* 1989; 89: 115-119
30. Hirsh AJ, Benishin CG, Jones RL, Pang PK, Man SF. Calcium mobilization and isometric tension in bovine tracheal smooth muscle: effects of salbutamol and histamine. *Cell Calcium* 1996; 19: 73-81
31. Janssen LJ, Walters DK, Wattie J. Regulation of $[Ca^{2+}]_i$ in canine airway smooth muscle by Ca^{2+} -ATPase and Na^+/Ca^{2+} exchange mechanisms. *Am J Physiol*. 1997; 273: L322-30
32. Mustafa SM, Pilcher CW, Williams KI. Cooling-induced bronchoconstriction: the role of ion-pumps and ion-carrier systems. *Pharmacol Res* 1999; 39: 125-36
33. Hirota S, Pertens E, Janssen LJ. The reverse mode of the Na^+/Ca^{2+} exchanger provides a source of Ca^{2+} for store refilling following agonist-induced Ca^{2+} mobilization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292: L438-447
34. Hirota S, Janssen LJ. Store-refilling involves both L-type calcium channels and reverse-mode sodium-calcium exchange in airway smooth muscle. *Eur Respir J* 2007; 30: 269-278
35. Algara-Suárez P, Romero-Méndez C, Chrones T, Sánchez-Armass S, Meza U, Sims SM, Espinosa-Tanguma R. Functional coupling between the Na^+/Ca^{2+} exchanger and nonselective cation channels during histamine stimulation in guinea pig tracheal smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L1918
36. Dai JM, Kuo KH, Leo JM, Paré PD, Van Breemen C, Lee CH. Acetylcholine-induced asynchronous calcium waves in intact human bronchial muscle bundle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36: 600

37. Luis Cobar Benard,, Luis Manuel Montaña Ramírez, José Erik Cruz Valderrama, Edgar Flores Soto. Importancia del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en la regulación del Ca^{2+} intracelular en el músculo liso de las vías aéreas. *Neumol Cir Torax* 2010; 1:39-45
38. Uetani T, Matsubara T, Nomura H, Murohara T, Nakayama S. Ca^{2+} -dependent modulation of intracellular Mg^{2+} concentration with amiloride and KB-R7943 in pig carotid artery. *J Biol Chem* 2003; 278: 47491-47497
39. Kleyman TR, Cragoe EJ Jr. Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J Membr Biol* 1988; 105: 1-21
40. Iwamoto T, Watano T, Shigekawa M. A novel isothioureia derivative selectively inhibits the reverse mode of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in cells expressing NCX1. *J Biol Chem* 1996; 271: 22391-22397
41. Watano T, Kimura J, Morita T, Nakanishi H. A novel antagonist, No. 7943, of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange current in guinea-pig cardiac ventricular cells. *Br J Pharmacol* 1996; 119: 555-563
42. Iwamoto T, Kita S. Development and application of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange inhibitors. *Mol Cell Biochem* 2004; 259: 157-161
43. Matsuda T, Arakawa N, Takuma K, Kishida Y, Kawasaki Y, Sakaue M, Takahashi K, Takahashi T, Suzuki T, Ota T, Hamano-Takahashi A, Onishi M, Tanaka Y, Kameo K, Baba A. SEA0400, a novel and selective inhibitor of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, attenuates reperfusion injury in the in vitro and in vivo cerebral ischemic models. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 249-256
44. Tanaka H, Nishimaru K, Aikawa T, Hirayama W, Tanaka Y, Shigenobu K. Effect of SEA0400, a novel inhibitor of sodium-calcium exchanger, on myocardial ionic currents. *Br J Pharmacol* 2002; 135: 1096-1100
45. Beaugé L, DiPolo R. SEA-0400, a potent inhibitor of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, as a tool to study exchanger ionic and metabolic regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288:C1374-80
46. Kita S, Iwamoto T. Inhibitory mechanism of SN-6, a novel benzyloxyphenyl $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange inhibitor. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1099: 529-533

47. Flores Soto E, Reyes Garcia J, Sommer B, Chavez J, Barajas Lopez, C, Montaña LM. PPADS, a P2X receptor antagonist, as a novel inhibitor of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in guinea pig airway smooth muscle. *Enviado al European Journal of Pharmacology*, 2011
48. Stryer L. *Metabolism: basic concepts and design*. In Stryer L, ed. *Biochemistry*. New York: Freeman 1998: 443-62
49. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 413-92
50. Burnstock G, Williams M. P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295: 862-9
51. Burnstock G. Purinergic signalling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 364-73
52. Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol* 1970; 120: 337-57
53. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 1972; 24: 509-81
54. Douglas WW, Poisner AM. On the relation between ATP splitting and secretion in the adrenal chromaffin cell: extrusion of the ATP (unhydrolysed) during release of catecholamines. *J Physiol* 1966; 183: 249-56
55. Geffen LB, Livett BG. Synaptic vesicles in sympathetic neurons. *Physiol Rev* 1971; 51: 98-157
56. Silinsky EM, Hubbard JI. Release of ATP from rat motor nerve terminals. *Nature* 1973; 243: 404-5
57. Dowdall MJ, Boyne AF, Whittaker VP. Adenosine triphosphate: a constituent of cholinergic synaptic vesicles. *Biochem J* 1974; 140: 1-12
58. Zimmermann H. Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci* 1994;17: 420-6
59. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 1471-83
60. Novak I. ATP as a signaling molecule: the exocrine focus. *NewsPhysiol Sci* 2003;18: 12-17

61. Sperlágh B, Vizi ES. Neuronal synthesis, storage and release of ATP. *Semin Neurosci* 1996; 8: 175–186
62. Bodin P, Burnstock G. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res* 2001; 26: 959–969
63. Dubyak GR. ATP release mechanisms. In: Edited Monograph: Nucleotides and Regulation of Bone Cell Function, edited by Burnstock G and Arnett TR. Boca Raton, FL: Taylor & Francis 2006, p. 99–158
64. 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.
65. 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
66. Katsuragi T, Su C. Purine release from vascular adrenergic nerves by high potassium and a calcium ionophore A-23187. *J Pharmacol Exp Ther* 1980; 215: 685–690
67. Pankratov Y, Lalo U, Verkhratsky A, North RA. Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflügers Arch* 2006; 452: 589–597
68. Su C, Bevan JA, Burnstock G. [³H]adenosine triphosphate: release during stimulation of enteric nerves. *Science* 1971; 173: 337–339
69. Boudreault F, Grygorczyk R. Cell swelling-induced ATP release is tightly dependent on intracellular calcium elevations. *J Physiol* 2004; 561: 499–513
70. Dowe GH, Kilbinger H, Whittaker VP. Isolation of cholinergic synaptic vesicles from the myenteric plexus of guinea-pig small intestine. *J Neurochem.* 1980; 35: 993–1003.
71. Sabirov R, Okada Y. ATP release via anion channels. *Purinergic Signalling* 2005;1: 311–328
72. 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
73. Spray DC, Ye ZC, Ransom BR. Functional connexin “hemichannels” a critical appraisal. *Glia* 2006; 54: 758–773

74. Beaudoin AR, Sévigny J, Picher M. ATP-diphosphohydrolases, apyrases, nucleotide phosphohydrolases: biochemical properties and functions. *Biomembranes* 1996; 5: 369–401
75. Zimmermann H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20: 231-6
76. 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
77. Kirley TL. Complementary DNA cloning and sequencing of the chicken muscle ecto-ATPase. *J Biol Chem* 1997; 272: 1076-81
78. Zimmermann H. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol* 1996; 49: 589-618
79. Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors. *Pharmacol Ther* 1994;64 :445-75
80. 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
81. 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
82. Klinger M, Freissmuth M, Nanoff C. Adenosine receptors: G protein mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cell Signal* 2002;14: 99-108
83. Schulman Edward S., Glaum Mark C., Post Tom, Wang Yihe, Raible Donald G., Mohanty Joy, Butterfield Joseph H., and Pelleg Amir. ATP Modulates Anti-IgE-Induced Release of Histamine from Human Lung Mast Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1999; 20: 530-537
84. North RA, Surprenant A. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000; 40:563-80
85. North RA, Barnard EA. Nucleotide receptors. *Curr Opin Neurobiol* 1997 ;7 :346-57

86. Bergner A, Sanderson MJ. ATP stimulates Ca^{2+} oscillations and contraction in airway smooth muscle cells of mouse lung slices. *Am J Physiol Mol Physiol* 2002; 283: L1271-9
87. Govindaraju V, Martin JG, Maghni K, Ferraro P, Michoud MC. The effects of extracellular purines and pyrimidines on human airway smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315:941-8
88. Von Kugelgen I, Wetter A. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 362: 310-23
89. Von Kugelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* 2006; 110:415–432
90. 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 P2Y1-deficient mice. *Nat Med* 1999; 5: 1199– 1202
91. Leon C, Vial C, Cazenave JP, Gachet C. Cloning and sequencing of a human cDNA encoding endothelial P2Y1 purinoceptor. *Gene* 1996; 171: 295–297
92. Lustig KD, Shiao AK, Brake AJ, Julius D. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 5113– 5117
93. 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
94. Cressman VL, Lazarowski E, Homolya L, Boucher RC, Koller BH, Grubb BR. Effect of loss of P2Y₂ receptor gene expression on nucleotide regulation of murine epithelial Cl^- transport. *J Biol Chem* 1999; 274: 26461–26468
95. Montaña 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^+ channels. *Pflugers Arch* 2011;462:573-85

96. 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.
97. Wildman SS, Unwin RJ, King BF. Extended pharmacological profiles of rat P2Y₂ and rat P2Y₄ receptors and their sensitivity to extracellular H⁺ and Zn²⁺ ions. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 1177–1186
98. Mamedova LK, Joshi BV, Gao ZG, Von Kügelgen I, Jacobson KA. Diisothiocyanate derivatives as potent, insurmountable antagonists of P2Y₆ nucleotide receptors. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 1763–1770
99. 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
100. Communi D, Robaye B, Boeynaems JM. Pharmacological characterization of the human P2Y₁₁ receptor. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 1199–1206
101. Kubista H, Lechner SG, Wolf AM, Boehm S. Attenuation of the P2Y receptor-mediated control of neuronal Ca²⁺ channels in PC12 cells by antithrombotic drugs. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 343–350
102. 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
103. Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol. Sci* 2006; 27:166-176
104. North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 2002; 82:10113 1067
105. Jones CA, Chessell IP, Simon J, Barnard EA, Miller KJ, Michel AD, Humphrey PPA. Functional characterization of the P2X₄ receptor orthologues. *Br J Pharmacol* 2000; 129:388–394

106. Roberts JA, Evans RJ. ATP binding at human P2X₁ receptors. Contribution of aromatic and basic amino acids revealed using mutagenesis and partial agonists. *J Biol Chem* 2004; 279:9043–9055
107. Khakh BS, Proctor WR, Dunwiddie TV, Labarca C, Lester HA. Allosteric control of gating and kinetics at P2X₄ receptor channels *J Neurosci* 1999; 19:7289–7299
108. Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 2004; 240:301–304
109. Collo G, North RA, Kawashima E, Merlo-Pich E, Neidhart S, Surprenant A, Buell G. Cloning of P2X₅ and P2X₆ receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J Neurosci* 1996; 16:2495–250764
110. Mulryan K, Gitterman DP, Lewis CJ, Vial C, Leckie BJ, Cobb AL, Brown JE, Conley EC, Buell G, Pritchard CA, Evans RJ. Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X₁ receptors. *Nature* 2000; 403:86–89
111. Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell G. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP. *Nature* 1994; 371:516–519
112. Valera S, Talabot F, Evans RJ, Gos A, Antonarakis SE, Morris MA, Buell GN. Characterization and chromosomal localization of a human P2X receptor from the urinary bladder. *Recept Channels* 1995 ; 3:283–289
113. Bianchi BR, Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Burgard EC, Alexander KM, Park HS, Yu H, Metzger R, Kowaluk E, Jarvis MF, van Biesen T . Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 1999; 376:127–138
114. Evans RJ, Lewis C, Buell G, Valera S, North RA, Surprenant A . Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2X purinoceptors). *Mol Pharmacol* 1995; 48:178–183
115. Torres GE, Haines WR, Egan TM, Voigt MM . Co-expression of P2X₁ and P2X₅ receptor subunits reveals a novel ATP- gated ion channel. *Mol Pharmacol* 1998 ; 54:989–993

116. Hansen MA, Balcar VJ, Barden JA, Bennett MR. Localization of P2X subtypes in heart, artery and bladder. *Drug Dev Res* 1998; 43:5
117. Hansen MA, Bennett MR, Barden JA . Distribution of purinergic P2X receptors in the rat heart. *J Auton Nerv Syst* 1999 ; 78:1-9
118. Jiang T, Yeung D, Lien CF, Gorecki DC. Localized expression of specific P2X receptors in dystrophin-deficient DMD and mdx muscle. *Neuromuscul Disord* 2005;15:225-236
119. Lee HY, Bradini M, Burnstock G. Distribution of P2X receptors in the urinary bladder and the ureter of the rat. *J Urol* 2000;163:2002-2007
120. King BF, Wildman SS, Ziganshina LE, Pintor J, Burnstock G. Effects of extracellular pH on agonism and antagonism at a recombinant P2X₂ receptor. *Br J Pharmacol* 1997;121:1445-1453
121. Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Kage KL, Burgard EC, Van Biesen T, Kowaluk EA, Jarvis MF. Molecular and functional characterization of human P2X₂ receptors. *Mol Pharmacol* 1999;56:1171-1181
122. Bian X, Ren J, DeVries M, Schnegelsberg B, Cockayne DA, Ford APDW, Galligan JJ. Peristalsis is impaired in the small intestine of mice lacking the P2X₃ subunit. *J Physiol* 2003;551:309-322
123. Galligan JJ. Enteric P2X receptors as potential targets for drug treatment of the irritable bowel syndrome. *Br J Pharmacol* 2004;141:1294-1302
124. Poole DP, Castelucci P, Robbins HL, Chiocchetti R, Furness JB. The distribution of P2X₃ purine receptor subunits in the guinea pig enteric nervous system. *Auton Neurosci* 2002;101:39-47
125. Van Nassauw L, Brouns I, Adriaensen D, Burnstock G, Timmermans JP. Neurochemical identification of enteric neurons expressing P2X₃ receptors in the guinea-pig ileum. *Histochem Cell Biol* 2002;118:193-203
126. Burgard EC, Niforatos W, Van Biesen T, Lynch KJ, Kage KL, Touma E, Kowaluk EA, Jarvis MF. Competitive antagonism of recombinant P2X_{2/3} receptors by 2', 3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate (TNP-ATP). *Mol Pharmacol* (2000) ;58:1502-1510

127. Vial C, Evans RJ . P2X1 receptor-deficient mice establish the native P2X receptor and a P2Y₆-like receptor in arteries. *Mol Pharmacol* 2002; 62:1438-1445
128. Bo X, Kim M, Nori SL, Schoepfer R, Burnstock G, North RA. Tissue distribution of P2X₄ receptors studied with an ectodomain antibody. *Cell Tissue Res* 2003 ;313:159-165
129. Glass R, Townsend-Nicholson A, Burnstock G. P2 receptors in the thymus: expression of P2X and P2Y receptors in adult rats, an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Cell Tissue Res* 2000; 300:295-306
130. Jones CA, Chessell IP, Simon J, Barnard EA, Miller KJ, Michel AD, Humphrey PPA. Functional characterization of the P2X₄ receptor orthologues. *Br J Pharmacol* 2000 ;129:388-394
131. Soto F, Garcia-Guzman M, Gomez-Hernandez JM, Hollmann M, Karschin C, Stuhmer W. P2X₄: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:3684-3688
132. Diaz-Hernandez M, Cox JA, Migita K, Haines W, Egan TM, Voigt MM. Cloning and characterization of two novel zebrafish P2X receptor subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295:849-853
133. Jensik PJ, Holbird D, Collard MW, Cox TC. Cloning and characterization of a functional P2X receptor from larval bullfrog skin. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001 ;281:C954-C962
134. Jones CA, Vial C, Sellers LA, Humphrey PPA, Evans RJ, Chessell IP. Functional regulation of P2X₆ receptors by N-linked glycosylation: identification of a novel $\alpha\beta$ -methylene ATP-sensitive phenotype. *Mol Pharmacol* 2004;65:979-985
135. Le KT, Babinski K, Seguela P. Central P2X₄ and P2X₆ channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J Neurosci* 1998;18:7152-7159
136. Baricordi OR, Ferrari D, Melchiorri L, Chiozzi P, Hanau S, Chiari E, Rubini M, Di Virgilio F. An ATP-activated channel is involved in mitogenic stimulation of human T lymphocytes. *Blood* 1996;87:682-690

137. Blanchard DK, Wei S, Duan C, Pericle F, Diaz JI, Djeu JY. Role of extracellular adenosine triphosphate in the cytotoxic T-lymphocyte-mediated lysis of antigen presenting cells. *Blood* 1995;85:3173-3182
138. Gartland A, Hipskind RA, Gallagher JA, Bowler WB. Expression of a P2X₇ receptor by a subpopulation of human osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2001; 16:846-856
139. Chessell IP, Simon J, Hibell AD, Michel AD, Barnard EA, Humphrey PPA. Cloning and functional characterization of the mouse P2X₇ receptor. *FEBS Lett* 1998; 439:26-30
140. Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor P2X₇. *Science* 1996 ;272:735-738
141. Eduardo Valdez-Morales, Raquel Guerrero Alba, Andr meda Li n n-Rico, Rosa Espinosa Luna, Sergio Zarazua Guzman, Marcela Miranda-Morales, Luis M. Montaño, Carlos Barajas López. P2X₇ receptors contribute to the currents induced by ATP in guinea pig intestinal myenteric neurons. *Eur J Pharmacol* 2011;15;668:366-72
142. Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, Kool M, Willart MA, Muskens F, Hoogsteden HC, Luttmann W, Ferrari D, Di Virgilio F, Virchow JC Jr, Lambrecht BN. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat Med* 2007; 13: 913-919
143. Kamikawa Y, Shimo Y. Mediation of prostaglandin E₂ in the biphasic response to ATP of the isolated tracheal muscle of guinea-pigs. *J Pharm Pharmacol* 1976; 28: 294-297
144. Fedan JS, Stem JL, Day B. Contraction of the guinea pig isolated, perfused trachea to purine and pyrimidine agonists. *J Pharmacol* 1995; 114: 1557-1562
145. Mounkaïla Boutchi, Marthan Roger, and Roux Etienne. Biphasic effect of extracellular ATP on human and rat airways is due to multiple P2 purinoceptor activation. *Respir Res* 2005; 6:143
146. Michoud MC, Tao FC, Pradhan AA, Martin JG. Mechanisms of the potentiation by adenosine of adenosine triphosphate-induced calcium release in tracheal smooth-muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21:30-6

147. Advenier C, Bidet D, Floch-Saint Aubin A, Renier A. Contribution of prostaglandins and tromboxanes to the adenosine and ATP-induced contraction of guinea-pig isolated trachea. *Br. Pharmacol* 1982; 77:39-44
148. Oguma T, Ito S, Kondo M, Makino Y, Shimokata K, Honjow H, Kamiyaw H, Kum H. Roles of P2X receptors and Ca²⁺ sensitization in extracellular adenosine triphosphate-induced hyperresponsiveness in airway smooth muscle. *Clinical and Experimental Allergy* 2007; 37, 893–900
149. Nagaoka M, Nara M, Tamada T, Kume H, Oguma T, Kikuchi T, Zaini J, Moriya T, Ichinose M, Tamura G, Hattori T. Regulation of adenosine 5'-triphosphate (ATP)-gated P2X₄ receptors on tracheal smooth muscle cells. *Respir Physiol Neurobiol* 2009; 166:61-7
150. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260: 3440–3450
151. Kajita J, Yamaguchi H. Calcium mobilization by muscarinic cholinergic stimulation in bovine single airway smooth muscle. *Am J Physiol* 1993; 264:L496-503
152. Virginio C, Robertson G, Surprenant A, North RA. Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X₁, P2X₃, and heteromeric P2X_{2/3} receptors. *Mol Pharmacol* 1998; 53:969-73
153. Bazan-Perkins B, Flores-Soto E, Barajas-Lopez C, Montaña LM. Role of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in Ca²⁺ entry of bovine airway smooth muscle cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003; 368:277-83
154. Birinyi P, Acsai K, Bányász T, Tóth A, Horváth B, Virág L, Szentandrassy N, Magyar J, Varró A, Fülöp F, Nánási PP. Effects of SEA0400 and KB-R7943 on Na⁺/Ca²⁺ exchange current and L-type Ca²⁺ current in canine ventricular cardiomyocytes *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2005; 372:63-70
155. Ouardouz M, Zamponi GW, Barr W, Kiedrowski L, Stys PK. Protection of ischemic rat spinal cord white matter: dual action of KB-R7943 on Na⁺/Ca²⁺ exchange and L-type Ca²⁺ channels. *Neuropharmacology* 2005; 48:566-575
156. Fedan JS, Belt JJ, Yuan LX, Frazer DG. Contractile effects of nucleotides in guinea pig isolated, perfused trachea: involvement of respiratory epithelium, prostanoids and Na⁺ and Cl⁻ channels. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 264:210-216

157. Takata Y, Nishimura Y, Maeda H, Yokoyama M. Phospholipase A₂ augments contraction and intracellular calcium mobilization through thromboxane A₂ in bovine tracheal smooth muscle. *Eur Respir J* 1999;14:396-404
158. Farmer SG, Canning BJ, Wilkins DE. Adenosine receptor mediated contraction and relaxation of guinea-pig isolated tracheal smooth muscle: effects of adenosine antagonists. *Br J Pharmacol* 1988; 95:371-378
159. Barajas-López C, Espinosa-Luna R, Christofi FL. Changes in intracellular Ca²⁺ by activation of P2 receptors in submucosal neurons in short-term cultures. *Eur J Pharmacol* 2000; 409:243-257
160. Mendoza-Fernandez V, Andrew RD, Barajas-López C. ATP inhibits the synaptic release by acting at P2Y receptors in pyramidal neurons of hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293:172-179
161. Burnstock G. Purinergic cotransmission. *Exp Physio* 2010; 194:20-24
162. Cai F, Li PY, Yang Y, Liu ZF, Li ML, Zhou W, Pei J, Cheng J, Lan H, Grammer JB, Zeng XR. Characteristic of spontaneous transient outward potassium currents in vascular smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Acta Physiologica Sinica* 2007; 59:27- 34
163. Iwamoto T, Inoue Y, Ito K, Sakaue T, Kita S, Katsuragi T. The exchanger inhibitory peptide region-dependent inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchange by SN-6 [2-[4-(4-nitrobenzyloxy)benzyl]thiazolidine-4-carboxylic acid ethyl ester], a novel benzyloxyphenyl derivative. *Mol Pharmacol* 2004; 66:45-55

Importancia del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en la regulación del Ca^{2+} intracelular en el músculo liso de las vías aéreas

Luis Cóbar Benard,* Luis Manuel Montaña Ramírez,†
José Erik Cruz Valderrama,‡ Edgar Flores Soto,‡✉

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas,* Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM†
Trabajo recibido: 03-III-2010; aceptado: 11-III-2010

RESUMEN. El ion Ca^{2+} cumple múltiples funciones celulares. En el músculo liso de las vías aéreas participa de forma importante en la contracción. Los estímulos hormonales y neurogénicos generan incrementos en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$); la fuente para el incremento de Ca^{2+} es intracitoplasmática y extracitoplasmática. Para lograr este aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es necesaria la participación de proteínas membranales y del retículo sarcoplásmico. Dentro de estas proteínas se encuentra el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) que se localiza en la membrana plasmática y actúa como un cotransportador de intercambio iónico. Su función principal es sacar un Ca^{2+} del citoplasma al espacio extracelular e introducir tres Na^+ del espacio extracelular al citoplasma, sin gasto de ATP, y contribuir así a mantener los niveles basales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Sin embargo, cuando diferentes agonistas broncoconstrictores activan canales catiónicos inespecíficos y éstos incrementan las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} y Na^+ , este último ion activa la llamada fase reversa del NCX (NCX_{REV}), invirtiéndose entonces su función, es decir, ahora introduce Ca^{2+} y saca Na^+ al espacio extracelular. Este artículo refiere algunos indicios que apuntan a que la inhibición del NCX_{REV} tendría relevancia como terapia adyuvante en pacientes asmáticos y muestra, por primera vez, evidencias experimentales de la funcionalidad del NCX_{REV} en el músculo liso de las vías aéreas del humano.

Palabras clave: Músculo liso de la vía aérea, intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, KB-R7943, SEA 0400, SN-6.

ABSTRACT. Ca^{2+} is involved in multiple cellular functions. In airway smooth muscle this ion participates importantly in contraction. Hormonal and neurogenic stimuli generate increment of the intracellular Ca^{2+} concentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$; the source of this Ca^{2+} increase is both intra- and extracytoplasmatic. To achieve this increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ the participation of multiple membrane and sarcoplasmic proteins is necessary. Among these proteins, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) is located at the plasma membrane and acts as a cotransporter of ionic exchange. Its main function is to expulse 1 Ca^{2+} from the cytosol to the extracellular space and to introduce 3 Na^+ from extracellular space to cytosol, without spending ATP, thus contributing to the maintenance of the intracellular basal Ca^{2+} levels. However, when diverse bronchoconstricting agonists activate membrane unspecific cation channels, and these augment intracellular concentrations of both Ca^{2+} and Na^+ the latter ion activates the NCX reverse phase (NCX_{REV}), i.e., Ca^{2+} is now introduced to cytosol and Na^+ is expelled to extracellular space. This article reviews some hints pointing out that inhibition of NCX_{REV} might have relevance as adjuvant therapy in asthmatic patients and reports for the first time experimental evidences of the function of the NCX_{REV} in the human airway smooth muscle.

Key words: Airway smooth muscle, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, KB-R7943, SEA 0400, SN-6.

INTRODUCCIÓN

El calcio (Ca^{2+}), es el mensajero intracelular más importante y el catión más prevalente del organismo, es altamente versátil y puede regular diferentes funciones celulares. Los incrementos de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) regulan múltiples procesos celulares en un amplio rango de tiempo. Por ejemplo, el aumento de Ca^{2+} en microsegundos produce exocitosis en las uniones sinápticas, los incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por milisegundos originan contracción; y por otro lado, el incremento de calcio por minutos u horas origina eventos

tales como la transcripción, fertilización, proliferación celular y apoptosis.¹

La actividad contráctil del músculo liso está bajo control neurogénico y hormonal. Sin embargo, el control de la actividad contráctil varía considerablemente en los diferentes tipos de músculos, dependiendo de su función y localización. A pesar de la diversidad en el control de la actividad contráctil, el efecto final es la regulación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la cual determina la tensión desarrollada en todos los tipos de músculo liso.² En el músculo liso de las vías aéreas (MLVA) los miocitos tienen una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de ~128 nM en estado de reposo,^{3,4} aunque, cuando las células son estimuladas por agonistas bronco-

constrictores como la acetilcolina, la serotonina, la histamina, etc., las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se incrementan ~500-700 nM.^{5,6} El incremento de Ca^{2+} genera la formación del complejo Ca^{2+} -calmodulina, el cual activa a la cinasa de la cadena ligera de la miosina para que fosforile a la serina 19 de la cadena ligera de la miosina de 20 kDa. Esta fosforilación permite que la ATPasa de la miosina sea activada por la actina para llevar a cabo la contracción en el MLVA.⁷ Al mismo tiempo, se activa otra vía de señalización, la Rho-Cinasa (ROCK), cuya función es inactivar a la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP). Una disminución $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a niveles basales inactiva ROCK, permitiendo que la MLCP desfosforile a la cadena ligera de la miosina de 20 kDa y el músculo se relaje.⁸ Por lo tanto, los mecanismos responsables de mantener las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en niveles basales juegan un papel primordial en la homeostasis del MLVA.

MECANISMOS QUE MANTIENEN EL Ca^{2+} INTRACELULAR EN NIVELES BASALES

Existen al menos tres transportadores responsables de mantener las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en alrededor de 100 nM: 1) la ATPasa de Ca^{2+} de membrana plasmática (PMCA) que funciona transportando Ca^{2+} del citoplasma hacia el medio extracelular; 2) la ATPasa de Ca^{2+} de retículo sarcoplásmico (SERCA) que transporta Ca^{2+} del citoplasma al interior del retículo sarcoplásmico. Ambas proteínas utilizan ATP como fuente de energía para transportar Ca^{2+} en contra del gradiente electroquímico;⁹ y 3) el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en su fase normal (NCX), cuya función principal es sacar Ca^{2+} del citoplasma al espacio extracelular e introducir Na^+ del espacio extracelular al citoplasma.⁹ Existen también, dentro del citoplasma celular, varias proteínas que son consideradas amortiguadores de Ca^{2+} y, a su vez, reservorios del mismo que ayudan a mantener las concentraciones basales de este ion. Dentro de éstas se encuentra la familia de las calmodulinas, anexinas y la calpaína.¹⁰

Actualmente se considera al NCX como uno de los mecanismos más importantes para la regulación del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el MLVA, por lo que en esta revisión nos enfocaremos en él.

MECANISMOS QUE AUMENTAN LA $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Existen dos fuentes de Ca^{2+} para aumentar las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} y son las siguientes:

1) El retículo sarcoplásmico (RS), es el reservorio más importante de Ca^{2+} en el MLVA. En su interior, el Ca^{2+} alcanza concentraciones de 5-10 mM,¹¹ contrastando con los 128 nM del medio citoplasmático. La liberación de este ion se inicia por la activación del receptor de IP_3 y del receptor de rianodina. El IP_3 actúa como un segundo

mensajero mediante la unión a su receptor tetramérico situado en la membrana del retículo sarcoplásmico y produce la liberación de Ca^{2+} almacenado en este organelo, generando contracción muscular.¹²⁻¹⁵ El incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ activa al receptor de rianodina para facilitar la apertura de canales iónicos membranales. 2) La otra fuente es el Ca^{2+} extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) que ingresa al interior de la célula a través de diferentes canales membranales tales como: los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDC), los canales regulados por el receptor o canales catiónicos inespecíficos (ROC),¹⁶ y los canales de entrada capacitativa u operados por el retículo sarcoplásmico (SOC).^{17,18} Además de estos mecanismos también se encuentra el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en su fase reversa (NCX_{REV}), cuya función es sacar Na^+ de la célula e introducir Ca^{2+} .¹⁸⁻²⁰

INTERCAMBIADOR $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

El NCX es una proteína que se localiza en la membrana plasmática de la mayoría de células del organismo. Su función principal es sacar un Ca^{2+} del citoplasma al espacio extracelular e introducir tres Na^+ del espacio extracelular al citoplasma, sin gasto de ATP, utilizando la carga neta positiva del Na^+ .

Desde los trabajos de Ringer en 1883 y Daly *et ál* en 1921 es bien conocido que la contracción del músculo cardíaco está directamente relacionada a la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_e$ e inversamente asociado con la concentración de Na^+ extracelular ($[\text{Na}^+]_e$).^{21,22} Wilbrandt *et ál* en 1948 observaron que la contracción del músculo cardíaco estaba asociada a un cociente entre el $[\text{Ca}^{2+}]_e/[\text{Na}^+]_e$ y propusieron un transportador, donde la disminución del Na^+ permite la entrada de Ca^{2+} al citoplasma en células cardíacas.²³ Las primeras evidencias acerca de la existencia del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ se obtuvieron en la década de los 60 en miocitos cardíacos de cobayos por Reuter *et ál*.²⁴ En este contexto, otros investigadores dirigidos por Baker, trabajando en axones de calamares, publicaron el hallazgo sobre el sistema cotransportador o intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.²⁵ Posteriormente, Glitsch *et ál* encontraron en el músculo cardíaco de cobayos que el flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula era proporcional a la Na^+ intracelular ($[\text{Na}^+]_i$), es decir, encontraron una respuesta inotrópica positiva en la aurícula con un incremento intracelular de este ion.^{26,27} Desde entonces, este intercambiador ha sido detectado prácticamente en todos los tejidos.²⁷

CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DEL NCX

Desde la década de los 90, el estudio molecular del NCX ha dejado al descubierto información abundante y crucial relacionada con su estructura y función. Hasta

el momento, se han logrado identificar tres isoformas del intercambiador: el NCX1, primera isoforma en ser purificada y clonada en el músculo cardiaco de perros, así como en otros tejidos y tipos celulares; el NCX2 se localiza en estómago; y el NCX3, el cual es producto de genes diferentes, se localiza en el cerebro, músculo esquelético y MLVA.²⁷⁻²⁹

Inicialmente fue sugerido que el NCX tenía 11 segmentos transmembranales. Recién se ha descrito que el intercambiador del músculo cardiaco está formado por 938 aminoácidos constituidos en nueve segmentos transmembranales. Posee una región extracelular NH₂ terminal con 32 aminoácidos, la cual está glicosilada en el noveno aminoácido. El NCX posee dos dominios hidrofóbicos que contienen los fragmentos transmembranales, el dominio NH₂ terminal posee cinco segmentos transmembranales (1-5) y el COOH-terminal está formado por cuatro segmentos (6-9), los cuales están separados por una asa intracelular larga de ~550 aminoácidos (figura 1). Esta asa intracelular contiene importantes sitios regulatorios que no parecen ser requeridos para el transporte iónico, ya que se han realizado mutaciones a la asa intracelular manteniendo el intercambio iónico. Sin embargo, en las porciones NH₂ y COOH terminal del NCX existen dos secuencias repetidas de ~40 aminoácidos denominadas α1 y α2, las cuales se encuentran conservadas en las tres isoformas de NCX, participando de forma muy importante en el transporte iónico. En el NCX la secuencia α1 contiene parte de los segmentos 2 y 3 y una asa que los une; la secuencia α2 consiste de una porción del segmento transmembranal 7 y la parte del GIG (motivo de glicina-isoleucina-glicina, localizado entre los fragmentos 7 y 8), en el dominio COOH-terminal. En la porción NH₂ terminal, cercano al segmento transmembranal 5 se localiza un dominio de 20 aminoácidos hidrofóbicos y básicos llamado región

XIP (inhibidor del intercambiador del péptido). También existe una zona de *splicing* alternativo (otra forma de la proteína u otra variante de aminoácido de la proteína nativa), la cual se localiza en la asa intracelular, cercano al dominio COOH-terminal.^{25,27,30,31}

REVERSIBILIDAD E INHIBIDORES DEL NCX

Una de las características más importantes del NCX, desde el punto de vista funcional, es su capacidad de actuar en ambas direcciones; el factor principal que determina la dirección hacia la cual actúa es el gradiente electroquímico del Na⁺ y la despolarización de la membrana plasmática. El incremento en las concentraciones intracelulares de Na⁺, en la región subplasmalema (por debajo de la membrana plasmática, cercana al intercambiador), tiene la capacidad de revertir la dirección del NCX, es decir, de hacerlo funcionar en su modo reverso (NCX_{REV}), lo cual produciría que el flujo de Ca²⁺ se dirija hacia el interior de la célula y el flujo de Na⁺ hacia el exterior de la misma. Dicho de otra forma, la dirección final a la cual se moverá el Ca²⁺ está determinada principalmente por el gradiente de Na⁺, aunque también depende, en menor medida, del gradiente de K⁺ y Ca²⁺ a través de la membrana plasmática (figura 2).^{27,32-34}

En vista de la importancia de la NCX_{REV} en la homeostasis del [Ca²⁺], se sintetizaron varios inhibidores de esta fase. Al principio se utilizó la amilorida, que clínicamente es usada como un fármaco antihipertensivo, aunque en México no se utiliza. Por otra parte, este compuesto inhibe varios transportadores dependientes de Na⁺ como el NCX Na⁺/H⁺ y NCX Na⁺/K⁺.^{35,36} En los años 90 se desarrolló un inhibidor supuestamente selectivo del NCX_{REV}, el KB-R7943 (2-[2-[-4(4-nitrobenzilo) fenil]-etil] isotiurea mesilato). La molécula de KB-R7943 tiene selectividad dependiendo de la isoforma e inhibe al NCX3

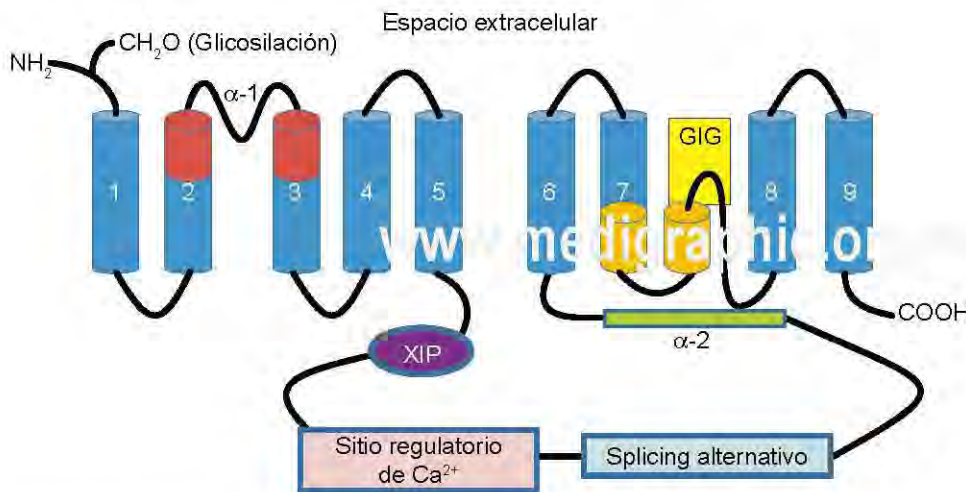


Figura 1. Estructura molecular del intercambiador Na⁺/Ca²⁺.

aproximadamente tres veces más que el NCX1 o el NCX2.³⁷⁻³⁹ Sin embargo, este compuesto es inespecífico, ya que además de inhibir al NCX_{REV} también se une al transportador de norepinefrina, bloquea al receptor nicotínico de acetilcolina, a los canales de Ca^{2+} (SOC y VDC), K^+ y Na^+ .⁴⁰ Recientemente se sintetizó un nuevo inhibidor del NCX_{REV} probado inicialmente en neuronas y miocitos cardiacos, llamado SEA0400 (2-(4-(2,5-difluorofenil)metoxi)fenoxi)-5-etoxianilina), el cual tiene mayor potencia que el KB-R7943, ya que su IC_{50} es de 30-40 nM y, a diferencia del KB-R7943 (IC_{50} de 5-10 μM), parece no tener efectos sobre canales o receptores membranales cuando se usa a concentraciones nanomolares.^{41,42} Por último, hace cuatro años se desarrolló el SN-6, un inhibidor selectivo del NCX, cuya IC_{50} es de 2.9 μM , el cual no es inespecífico, ya que no bloquea a otros tipos de transportadores que involucran al Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ó H^+ y en la actualidad está siendo ampliamente utilizado.⁴³

IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DEL NCX EN SU FORMA REVERSA

Por mucho tiempo se han generado múltiples trabajos sobre el NCX; en células excitables como las de músculo liso cardíaco se ha reportado que durante un potencial de acción se incrementan temporalmente las $[\text{Na}^+]_i$, revirtiendo la dirección operacional del intercambiador, que resulta en un ingreso de Ca^{2+} .²³ Una vez que la concentración de Na^+ disminuye en el interior de la célula, el intercambiador revierte su acción y el flujo de Ca^{2+} es dirigido hacia el exterior de la célula.⁴⁴ En este tejido, el

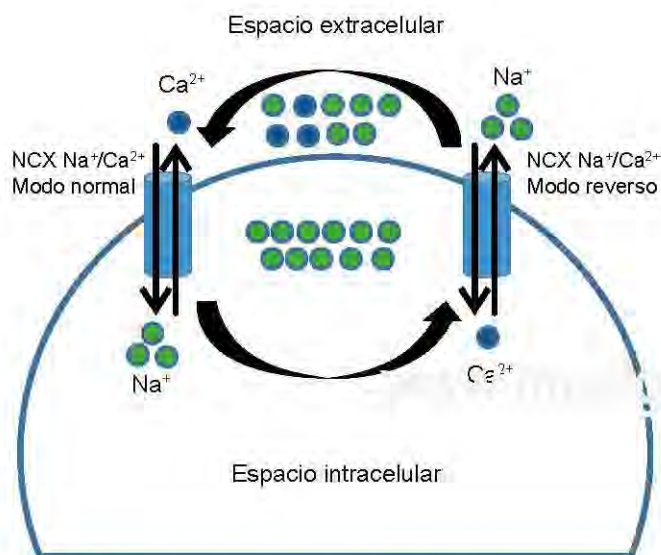


Figura 2. Función del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) en su modo normal y reverso.

incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ocurre por la activación de los VDC y el NCX_{REV} . Este incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es responsable de activar la liberación de Ca^{2+} del RS por los canales de RYR, mediante un evento denominado "liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} ".^{39,40} Estos mecanismos parecen ser los responsables en gran medida del acople excitación-contracción en células cardiacas.⁴⁵⁻⁴⁷

MÚSCULO LISO DE LA VÍA AÉREA

Las primeras evidencias experimentales del NCX en el MLVA mostraron resultados contradictorios entre las especies estudiadas. A mediados de los 90, Janssen *et ál*, reportaron que la participación del NCX no era importante en la homeostasis del Ca^{2+} en MLVA de canino;⁴⁸ al mismo tiempo, Hirsh *et ál*, obtuvieron resultados que involucraban al NCX en el flujo de Ca^{2+} al espacio extracelular y la subsecuente disminución de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$, durante la estimulación por un agonista β_2 -adrenérgico en MLVA de bovino.⁴⁹ Tres años después, Mustafa *et ál* reportaron que las bajas temperaturas disminuían la función del NCX resultando en incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que originaban broncoconstricción en MLVA de ovejas.⁵⁰

A partir del año 2000 varios autores han reportado directamente la participación del NCX_{REV} como uno de los principales mecanismos responsables en la regulación del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y de la contracción. Hirota *et ál* encontraron en el MLVA de bovino que la estimulación con diferentes agonistas (acetilcolina, histamina y 5-HT) movilizaba Ca^{2+} del RS, proponiendo que el vaciamiento del RS activaba a los canales de SOC, así como a los canales ROC. Ambos mecanismos permiten la entrada de Ca^{2+} y Na^+ al citoplasma, este último induce la fase reversa del NCX en MLVA de bovino, permitiendo la entrada de Ca^{2+} al citoplasma para favorecer el relleno del RS.^{51,52} Recién, Algara-Suárez *et ál* también reportaron en el músculo liso de cobayo que la histamina, vía su receptor H_1 , estimula la producción de IP_3 , produciendo liberación de Ca^{2+} del RS activando a SOC y ROC favoreciendo el modo reverso del NCX, incrementando los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Asimismo, encontraron que este incremento de Ca^{2+} activaba a las corrientes de cloro dependientes de Ca^{2+} (I_{ClCa}) produciendo una despolarización y una apertura en los canales de calcio dependientes de voltaje, postulando que los incrementos de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a través del NCX_{REV} son importantes para sostener la contracción inducida por la histamina en este tejido.⁵³ Asimismo, en el músculo liso bronquial de humano se reportó que la acetilcolina induce ondas de Ca^{2+} asincrónicas, donde el NCX_{REV} , los VDC tipo L, la SERCA, los RYR y los canales catiónicos inespecíficos (SOC, ROC), están implicados en la generación de estas ondas y de mantener la contracción tónica.⁵⁴

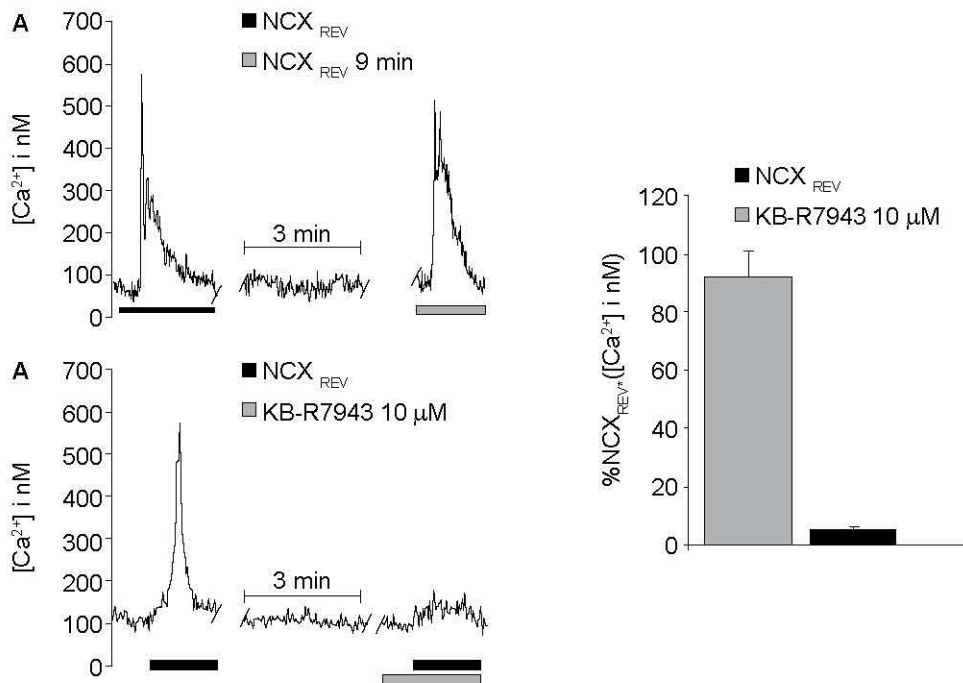


Figura 3. Presencia del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en su forma reversa (NCX_{REV}) en el músculo liso traqueobronquial de humano. **A)** Se puede apreciar que la sustitución de Na^+ por LiCl produce un incremento en las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que corresponde a la activación del NCX_{REV} en células de músculo liso traqueal de humano. Nueve minutos después se puede observar una recuperación de alrededor del 90% de la respuesta inicial (NCX_{REV} , 9 min). **B)** Inhibición del NCX_{REV} por KB-R7943 ($10 \mu\text{M}$). **C)** Análisis estadístico de la recuperación e inhibición del NCX_{REV} por el KB-R7943 , $n = 5$.

Nosotros encontramos la presencia del NCX en su forma reversa en células de MLVA de humano. Como se puede apreciar en la figura 3, utilizando un sistema de microfluorimetría para medir las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} en células aisladas de músculo liso traqueal de humano, la sustitución de Na^+ por cloruro de litio (LiCl) produjo un incremento transitorio de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Este incremento de Ca^{2+} inducido por el LiCl fue totalmente bloqueado por KB-R7943 . En el trabajo previo de Dai *et ál*⁵⁴ en el músculo liso bronquial de humano, estos investigadores no demostraron la presencia de la NCX_{REV} y sólo utilizaron al KB-R7943 para postular la participación de la fase reversa del intercambiador en las ondas de Ca^{2+} asincrónicas inducidas por la acetilcolina. Sin embargo, como ya lo mencionamos, este compuesto es muy inespecífico y desafortunadamente no descartaron que a la concentración utilizada de KB-R7943 no tuviera efectos sobre los canales de Ca^{2+} tipo L, los ROC o los SOC. Por lo tanto, la participación de la NCX_{REV} en este fenómeno es cuestionable.

Nuestros resultados demuestran por primera vez en miocitos humanos la presencia funcional de la NCX_{REV} . Este hecho constituye el primer paso para continuar investigando y poder confirmar si el NCX juega un papel fisiológico importante, como el que desempeña en otros MLVA de otras especies, así como explorar la participación de este intercambiador en la fisiopatología del asma.

TRATAMIENTO DEL ASMA CON AGONISTAS ADRENÉRGICOS

La Iniciativa Global para el Manejo y Prevención del Asma incluye a los agonistas adrenérgicos β_2 como parte del arsenal farmacológico que pueden ser utilizados, tanto como medicamentos de alivio de los síntomas en el asma como de control de los mismos. La estimulación de los receptores adrenérgicos β_2 por fármacos como el salbutamol o el formoterol activa la adenilciclase e incrementa la producción de AMPc, el cual vía la cinasa de proteína A, activa a los canales de K^+ hiperpolarizando a la membrana, estimula la PMCA, que a su vez disminuye las $[\text{Ca}^{2+}]_i$, inhabilita la apertura de los VDC tipo L, el NCX funciona en su forma normal, fosforila al fosfolamban permitiendo la recaptura de Ca^{2+} al interior del RS. Todos estos mecanismos asociados a los agonistas adrenérgicos β_2 nos dan como resultado la relajación del MLVA. Si tomamos en cuenta que NCX_{REV} podría estar favoreciendo el incremento en las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y que este incremento pudiera estar asociado a las crisis de asma y a la hiperreactividad de la vía aérea, resulta importante proponer una vía alternativa de tratamiento que sirva de complemento enfocado a disminuir la crisis o la hiperreactividad a través del bloqueo de la fase reversa del NCX .

Agradecimientos

Este manuscrito fue presentado como tesis para obtener la especialidad de médico neumólogo, INER, por el Dr.

Luis Cobar Benard bajo la tutoría de los doctores Luis Manuel Montaño y Edgar Flores Soto. Asimismo, este trabajo fue apoyado a través de los donativos: CONACYT # 81409 y DGAPA-UNAM # IN201810-3 otorgados al Dr. Luis M. Montaño.

REFERENCIAS

- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:517-529.
- Dettbarn C, Györke S, Palade P. Many agonists induce "quantal" Ca²⁺ release or adaptive behavior in muscle ryanodine receptors. *Mol Pharmacol* 1994;46: 502-507.
- Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev* 1996;76:967-1003.
- Marín J, Encabo A, Briones A, García-Cohen EC, Alonso MJ. Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: calcium pumps. *Life Sci* 1999;64:279-303.
- Carbajal V, Vargas MH, Flores-Soto E, Martínez-Cordero E, Bazán-Perkins B, Montaño LM. LTD₄ induces hyperresponsiveness to histamine in bovine airway smooth muscle: role of SR-ATPase Ca²⁺ pump and tyrosine kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:84-92.
- Montaño LM, Bazán-Perkins B. Resting calcium influx in airway smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 2005;83:717-723.
- Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 1994;372:231-236.
- Somlyo AP, Somlyo AV. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 2003;83:1325-1358.
- Sieck GC, Kannan MS, Prakash YS. Heterogeneity in dynamic regulation of intracellular calcium in airway smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol* 1997;75:878-888.
- Clapham DE. Calcium signalling. *Cell* 1995;80:259-268.
- Edes I, Kranias EG. Ca²⁺-ATPases/pumps. In: *Cell Physiology Source Book: Section II Transport physiology, pumps and exchangers*. 2nd ed. New York: Academic press; 1998. p.225-236.
- Berridge MJ. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993;361: 315-325.
- Challiss RA, Adams D, Mistry R, Boyle JP. Second messenger and ionic modulation of agonist-stimulated phosphoinositide turnover in airway smooth muscle. *Biochem Soc Trans* 1993;21:1138-1145.
- Iino M. Calcium-induced calcium release mechanism in guinea pig taenia caeci. *J Gen Physiol* 1983;84:333-337.
- Iino M. Calcium release mechanisms in smooth muscle. *Jpn J Pharmacol* 1990;54:345-354.
- Kotlikoff MJ. Calcium currents in isolated canine airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1988;254(6 Pt 1):C793-C801.
- Bazán-Perkins B, Flores-Soto E, Barajas-Lopez C, Montaño LM. Role of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in Ca²⁺ entry of bovine airway smooth muscle cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003;368:277-283.
- Janssen LJ, Walters DK, Wattie J. Regulation of [Ca²⁺]_i in canine airway smooth muscle by Ca²⁺ - ATPase and Na⁺/Ca²⁺ exchange mechanisms. *Am J Physiol* 1997;273(2 Pt 1):L322-L330.
- Floyd R, Wray S. Calcium transporters and signalling in smooth muscles. *Cell Calcium* 2007;42:467-476.
- Philipson KD, Nicoll DA. Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annu Rev Physiol* 2000;62:111-133.
- Ringer S. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the Heart. *J Physiol* 1883;4:29-42.
- Daly Ide B, Clark AJ. The action of ions upon the frog's heart. *J Physiol* 1921; 54:367-383.
- Wilbrandt W, Koller H. Die calcium wirkung am froschherzen als funktion des ionengleichgewichts zwischen Zelmembran und umgebung. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 1948;6:208-221.
- Reuter H, Seitz N. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol* 1968;195:451-460.
- Baker PF, Blaustein MP, Hodgkin AL, Steinhardt RA. The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. *J Physiol* 1969;200:431-458.
- Glitsch HG, Reuter H, Scholz H. The effect of the internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea-pig auricles. *J Physiol* 1970; 209:25-43.
- DiPolo R, Beaugé L. Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions. *Physiol Rev* 2006;86:155-203.
- Pitt A, Knox AJ. Molecular characterization of the human airway smooth muscle Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15:726-730.
- Mejía-Elizondo R, Espinosa-Tanguma R, Saavedra-Alanis VM. Molecular identification of the NCX isoform expressed in tracheal smooth muscle of guinea pig. *Ann N Y Acad Sci* 2002;976:73-76.
- Ottolia M, John S, Xie Y, Ren X, Philipson KD. Shedding light on the Na⁺/Ca²⁺ exchanger: *Ann N Y Acad Sci* 2007;1099:78-85.
- Díaz HO. El ion calcio: su regulación y función en la célula β pancreática. *Rev Cubana Endocrinol* 2003;14:1-24.
- Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 1999;79:763-854.
- Matsuda T, Takuma K, Baba A. Na⁺/Ca²⁺ exchanger: physiology and pharmacology. *Jpn J Pharmacol* 1997;74:1-20.
- Watanabe Y, Koide Y, Kimura J. Topics on the Na⁺/Ca²⁺ exchanger: pharmacological characterization of Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibitors. *J Pharmacol Sci* 2006;102:7-16.
- Uetani T, Matsubara T, Nomura H, Murohara T, Nakayama S. Ca²⁺-dependent modulation of intracellular Mg²⁺ concentration with amiloride and KB-R7943 in pig carotid artery. *J Biol Chem* 2003;278:47491-47497.
- Kleyman TR, Cragoe EJ Jr. Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J Membr Biol* 1988;105:1-21.
- Iwamoto T, Watano T, Shigekawa M. A novel isothiourea derivative selectively inhibits the reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchange in cells expressing NCX1. *J Biol Chem* 1996;271:22391-22397.

38. Watano T, Kimura J, Morita T, Nakanishi H. A novel antagonist, No. 7943, of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange current in guinea-pig cardiac ventricular cells. *Br J Pharmacol* 1996;119:555-563.
39. Iwamoto T, Kita S. Development and application of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange inhibitors. *Mol Cell Biochem* 2004;259:157-161.
40. Matsuda T, Arakawa N, Takuma K, et ál. SEA0400, a novel and selective inhibitor of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, attenuates reperfusion injury in the in vitro and in vivo cerebral ischemic models. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298:249-256.
41. Tanaka H, Nishimaru K, Aikawa T, Hirayama W, Tanaka Y, Shigenobu K. Effect of SEA0400, a novel inhibitor of sodium-calcium exchanger, on myocardial ionic currents. *Br J Pharmacol* 2002;135:1096-1100.
42. Beaugé L, DiPolo R. SEA-0400, a potent inhibitor of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, as a tool to study exchanger ionic and metabolic regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288:C1374-C1380.
43. Kita S, Iwamoto T. Inhibitory mechanism of SN-6, a novel benzyloxyphenyl $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange inhibitor. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1099:529-533.
44. Niggli E, Lederer WJ. Molecular operations of the sodium-calcium exchanger revealed by conformation currents. *Nature* 1991;349:621-624.
45. Bers DM. Species differences and the role of sodium-calcium exchange in cardiac muscle relaxation. *Ann N Y Acad Sci* 1991;639:375-385.
46. Fabiato A. Stimulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol* 1985;85:291-320.
47. Lederer WJ, Cannell MB, Cohen NM, Berlin JR. Excitation-contraction coupling in heart muscle. *Mol Cell Biochem* 1989;89:115-119.
48. Janssen LJ, Walters DK, Wattie J. Regulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in canine airway smooth muscle by Ca^{2+} -ATPase and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange mechanisms. *Am J Physiol* 1997;273:L322-L330.
49. Hirsh AJ, Benishin CG, Jones RL, Pang PK, Man SF. Calcium mobilization and isometric tension in bovine tracheal smooth muscle: effects of salbutamol and histamine. *Cell Calcium* 1996;19:73-81.
50. Mustafa SM, Pilcher CW, Williams KI. Cooling-induced bronchoconstriction: the role of ion-pumps and ion-carrier systems. *Pharmacol Res* 1999;39:125-36.
51. Hirota S, Pertens E, Janssen LJ. The reverse mode of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger provides a source of Ca^{2+} for store refilling following agonist-induced Ca^{2+} mobilization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292:L438-L447.
52. Hirota S, Janssen LJ. Store-refilling involves both L-type calcium channels and reverse-mode sodium-calcium exchange in airway smooth muscle. *Eur Respir J* 2007;30:269-278.
53. Algara-Suárez P, Romero-Méndez C, Chrones T, et ál. Functional coupling between the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger and nonselective cation channels during histamine stimulation in guinea pig tracheal smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:L191-L198.
54. Dai JM, Kuo KH, Leo JM, Paré PD, van Breemen C, Lee CH. Acetylcholine-induced asynchronous calcium waves in intact human bronchial muscle bundle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;36:600-608.

✉ **Correspondencia:**

Dr. Edgar Flores Soto.
Departamento de Farmacología,
Facultad de Medicina. UNAM,
Ciudad Universitaria. México, D.F., 04360
Correo electrónico: edgar_flores.s@hotmail.com
Los autores declaran no tener conflicto de intereses

In airways ATP refills sarcoplasmic reticulum via P2X smooth muscle receptors and induces contraction through P2Y epithelial receptors

Edgar Flores-Soto · Verónica Carbajal · Jorge Reyes-García · Luz María García-Hernández · Alejandra Figueroa · Marco Checa · Carlos Barajas-López · Luis M. Montaña

Received: 7 June 2010 / Revised: 13 September 2010 / Accepted: 23 September 2010 / Published online: 15 October 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract In airway smooth muscle (ASM), ATP induces a contraction associated with the increase of $[Ca^{2+}]_i$. Cytosolic Ca^{2+} is extruded to the extracellular space by the Na^+/Ca^{2+} exchanger (NCX) in its normal mode. Some agonists activate the reverse mode of the NCX (NCX_{REV}), inducing Ca^{2+} entry. We investigated whether ATP, via P2X receptors, activates the NCX_{REV} and whether the increment in $[Ca^{2+}]_i$ is used for contraction or for the sarcoplasmic reticulum (SR) refilling in guinea pig ASM. ATP contracted the ASM and this effect was blocked by

indomethacin. Suramin and RB2 diminished the contraction induced by ATP; PPADS did not modify this response. In myocytes, ATP produces an increase in $[Ca^{2+}]_i$ not modified by indomethacin. In tracheal strips, using simultaneous measurements, ATP induced a biphasic change in $[Ca^{2+}]_i$, (a Ca^{2+} peak followed by a plateau) accompanied by a contraction. Indomethacin or epithelium removal abolished this contraction, but not the Ca^{2+} peak, whereas the plateau was decreased by indomethacin. In myocytes, the ATP-induced $[Ca^{2+}]_i$ increment was inhibited by suramin (~96%), PPADS (~40%), and RB2 (~57%). ATP augmented the NCX_{REV} and this effect was abolished by SKF 96365 and TNP-ATP (P2X₁ and P2X₃ receptors antagonist). P2X₁ and P2X₃ receptors were corroborated by immunoblotting of ASM. NCX_{REV} activation and ATP in the presence of RB2 favor the SR Ca^{2+} refilling. In tracheal rings, successive ATP stimulations were reduced with KB-R7943. Therefore, ATP: (1) indirectly promotes muscle contraction via epithelial P2Y receptors and prostaglandins release; (2) increases the $[Ca^{2+}]_i$ through a prostaglandin-independent manner by activating P2X and P2Y receptors in smooth muscle; and (3) activates P2X₁ and P2X₃ receptors and the NCX_{REV} which refills the SR.

E. Flores-Soto · J. Reyes-García · L. M. García-Hernández · A. Figueroa · L. M. Montaña
Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina,
Universidad Nacional Autónoma de México,
México, DF, México

V. Carbajal
Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial,
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias,
México, DF, México

M. Checa
Departamento de Fibrosis Pulmonar,
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias,
México, DF, México

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

L. M. Montaña (✉)
Departamento de Farmacología, Edificio de Investigación,
sexto piso, laboratorio 3, Facultad de Medicina,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Ciudad Universitaria,
CP 04360 México, DF, México
e-mail: lmmr@servidor.unam.mx

Keywords ATP · Airway smooth muscle · Na^+/Ca^{2+} exchanger · Purinergic receptors

Introduction

It is well known that adenosine 5'-triphosphate (ATP) is not only involved in cellular metabolism but also acts as an extracellular mediator with significant biological

effects mediated by purinergic 2 (P2) receptors in different tissues, including the respiratory system. P2 receptors are classified in P2X and P2Y subtypes. P2X receptors are ligand-gated nonselective cation channels [29], and P2Y receptors belong to G protein-coupled receptors linked to cytosolic Ca^{2+} elevation through phosphoinositol hydrolysis [4, 17].

Recently, the role of ATP and purinergic signaling were implicated in the pathogenesis of asthma-inducing eosinophilic airway inflammation, Th2 cytokine production, and hyperresponsiveness [21, 30]; therefore, it is important to better understand the physiologic effect of ATP on the airway smooth muscle.

Since many years ago, it has been well documented in different species, including human smooth muscle cells, that ATP induces airway smooth muscle contraction and intracellular Ca^{2+} increase [4, 16, 24, 26, 27]. Most authors have associated the contractile effect of ATP to an increment of the intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$); however, the ATP-induced contraction in guinea pig trachea has been reported to be related to prostaglandin and thromboxane production mediated by purinoceptors on the airway epithelium [1, 15]. Thus, the contraction induced by ATP in guinea pig trachea seems to be an indirect effect, i. e., does not involve a direct stimulation of purinergic receptors in the smooth muscle cells to produce contraction. Nevertheless, ATP-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increment has been associated with the stimulation of P2Y or P2X receptors in the airway smooth muscle [4, 17, 27].

Recently, Hirota et al. [19, 20] postulated that agonists such as acetylcholine, histamine, and 5-HT activate the reverse mode of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) to provide a source of Ca^{2+} for store refilling, and this allows Ca^{2+} mobilization and contraction by a variety of physiological agonists.

NCX is an integral membrane protein that in its forward mode transports three Na^+ ions to the intracellular space in exchange for one Ca^{2+} ion and in its reverse mode mediates Ca^{2+} influx and Na^+ efflux [13]. One of the requirements to activate the reverse mode of the NCX is the Na^+ influx through nonselective cation channels, leading to a large subplasmalemmal rise in Na^+ concentration near the NCX [6, 12]. It is well known that P2X receptors are ATP-gated nonselective cation channels permeable to Ca^{2+} and Na^+ [29] and when they are activated could favor Na^+ accumulation in the intracellular space.

P2X receptors are the only ligand-gated channels in the airway smooth muscle and their physiological role have been scantily investigated. There is only one article, published in 2009 [28], related to P2X₄ receptors in swine tracheal smooth muscle which found that Ca^{2+} influx regulated by these receptors plays an important role in contraction. Until now, no one has studied the role of P2X receptors on the reverse mode of the NCX.

The present work aimed to investigate: (1) the role of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increment induced by ATP in the smooth muscle contraction of the guinea pig trachea; (2) the effect of this nucleotide on the NCX reverse mode via P2X receptors; and (3) whether both mechanisms are involved in the refilling of the sarcoplasmic reticulum (SR).

Materials and methods

Animals

Male Hartley guinea pigs (400–600 g) bred in conventional conditions in our institutional animal facilities (filtered conditioned air, $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 50–70% humidity, 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 mg kg^{-1} , i.p.) and exsanguinated. Major airways were dissected and cleaned of connective tissue; eight rings were obtained from the trachea and hung in a 5-ml organ bath filled with Krebs solution (in mM): 118 NaCl, 25 NaHCO_3 , 4.6 KCl, 1.2 KH_2PO_4 , 1.2 MgSO_4 , 11 glucose, and 2 CaCl_2 . Preparations were maintained at 37°C and bubbled with 5% 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). 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 a concentration–response curve was constructed to ATP or ATP γS (non-hydrolyzable analog) by adding single concentrations of this drug (1, 3.2, 10, 32, 100, 320, and 1,000 μM) to different tracheal rings. In other experiments, after ATP stimulation, tissues were pre-incubated with indomethacin (1 μM) for 1 h before the addition of the second concentration–response curve to ATP. Other tissues were pre-incubated with one of the following drugs for 15 min before the addition of a selected concentration of ATP (100 μM): suramin (an antagonist of various P2X and P2Y receptors, 30–300 μM),

pyridoxal phosphate-6-azo(benzene-2,4-disulfonic acid) (PPADS, P₂X receptor antagonist, 30 μ M), reactive blue 2 (RB2, P₂Y receptor antagonist, 30–300 μ M), 8-cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine, (A₁ receptor antagonist, 100 μ M), and 2-[2-[4-(4-nitrobenzyloxy)phenyl]ethyl]isothiourea mesylate (KB-R7943, 10 μ M, NCX reverse mode blocker). In some experiments, tissues were pre-incubated with KB-R7943 (10 μ M), nifedipine (1 μ M), or methoxyverapamil (D-600, 30 μ M) and stimulated with KCl (60 mM). All responses were expressed as percentage of the third KCl response.

Simultaneous measurement of $[Ca^{2+}]_i$ and contraction

Guinea pig airway smooth muscle strips (3 mm wide, 2 mm long) were loaded with acetoxymethyl ester of fura-2 by incubating them under protection from light for 3.5 h at 37°C in a shaking bath at 54 strokes per minute with 2 ml aerated (5% CO₂ in O₂) Krebs containing 20 μ M fura-2/AM, 1 mM probenecid, and 0.01% pluronic F-127. Afterwards, strips were washed for 10–15 min with Krebs solution to remove the dye from the extracellular space. Each preparation was mounted vertically in the bottom of a 4-ml fluorimeter cuvette of polymethacrylate using a special adaptor from Photon Technology International (PTI, Princeton, NJ, USA). This cuvette was filled with aerated Krebs and put inside a PTI fluorometer. The lower end of the strip was fixed to the adaptor while the upper end was attached to an isometric force displacement transducer (FSG-01, Experimetria LTD, Budapest, Hungary) connected to an analog–digital interface (PTI) via an EasyGraf recorder (model TA240, Gould Electronics, Cleveland, OH, USA). Recordings were stored in a microcomputer and analyzed using data acquisition and analysis software (Felix, version 1.21, PTI).

Fura-2 loaded in the smooth muscle strips was excited by alternating pulses of 340- and 380-nm light, and emission was collected at 510 nm using a PTI fluorometer. The fluorescence acquisition rate was \sim 0.8/s. Recordings were stored in a microcomputer and analyzed using a data acquisition and analysis software (Felix v1.21, PTI).

Preparations were equilibrated for 15 min under a resting tension of 1 g prior to testing. Tissues were then stimulated with 60 mM KCl for 10 min in order to corroborate their viability. Afterwards, tissues were stimulated with 100 μ M ATP, then washed, incubated for 1 h with 1 μ M indomethacin, and a second stimulation with ATP was performed. Some tissues were stimulated with a second stimulation of ATP as a control group. In another set of experiments, the epithelium was removed from the strips and stimulated with KCl and ATP.

Drugs were administered using a special adaptor from PTI. This adaptor had two metallic tubes. The first one was used to add solutions (with or without drugs) to tracheal

strips through syringes mounted in a serial system of three-way stopcocks. Under these conditions, drugs added to the tissues always had a uniform concentration. The second tube was used to remove the solution.

Intracellular Ca²⁺ measurements in tracheal myocytes

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 U ml⁻¹ papaine and incubated for 10 min at 37°C. The tissue was washed with Leibovitz's solution to remove the enzyme excess and then placed in Hanks solution containing 1 mg ml⁻¹ collagenase type I and 4 mg ml⁻¹ dispase II (neutral protease) for \sim 10 min at 37°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 600 rpm at 20°C for 5 min, and the supernatant was discarded. This last step was repeated once.

Cells were loaded with 0.5 μ M fura-2 in low Ca²⁺ (0.1 mM) at room temperature (\sim 21°C). After 1 h, cells were allowed to settle down into a heated perfusion chamber with a glass cover in the bottom. This chamber was mounted on an inverted microscope (Diaphot 200, Nikon, Tokyo, Japan) and cells adhered to the glass were continuously perfused at a rate of 2–2.5 ml min⁻¹ with Krebs solution at 37°C, bubbled with 5% CO₂ in oxygen, pH 7.4.

Cells loaded with fura-2 were exposed to alternating pulses of 340- and 380-nm excitation light, and emission light was collected at 510 nm using a microphotometer (PTI). The fluorescence acquisition rate was 0.5 s. $[Ca^{2+}]_i$ was calculated according to the formula by Grynkiewicz et al. [18]. The K_d of fura-2 was assumed to be 386 nM [23]. The mean 340/380 fluorescence ratios R_{max} and R_{min} were obtained as previously reported [10]. Recordings were stored in a microcomputer and evaluated using a data acquisition and analysis software (Felix, version 1.21, PTI).

After corroborating the cell viability through 10 mM caffeine stimulation, guinea pig tracheal myocytes were stimulated with 1, 10, 100, and 1,000 μ M ATP. Some cells were perfused with indomethacin (1 μ M, 1 h) and the concentration–response curve to ATP was repeated. Other cells were stimulated with a selected concentration of ATP (100 μ M) and pre-incubated with one of the following drugs for 5 min before the addition of a second ATP concentration: suramin (100 μ M), PPADS (30 μ M), RB2 (100 μ M), SKF 96365 (30 μ M, nonselective cation channels blocker), KB-R7943 (10 μ M), 2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate mono-lithium trisodium salt (TNP-ATP, 100 nM,

a P2X₁, P2X₃, heteromeric P2X_{2/3}, receptors antagonist [35], 3,4,5-trimethoxybenzoic acid 8-(diethylamino)octyl ester (TMB-8, 50 μM, an antagonist of IP₃-mediated Ca²⁺ release) [37], methoxyverapamil hydrochloride (D-600, 30 μM), and *N*-ethylmaleimide (NEM, 30 μM, incubated for 15 min), which can uncouple G proteins from several receptors, [32, 33]. In another set of experiments, the myocytes were stimulated with ATP in Ca²⁺-free medium (*n*=6). We corroborated that the [Ca²⁺]_i increment induced by 10 μM carbachol (309±28 nM, *n*=3) was completely abolished by TMB-8.

Additionally, to corroborate in tracheal myocytes the presence of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in its reverse mode (NCX_{REV}), cells were stimulated with LiCl by the substitution of NaCl and NaHCO₃ (146 mM); pH was adjusted to 7.3 with KOH. Under these conditions, some myocytes were perfused with KB-R7943 (10 μM, *n*=3), PPADS (30 μM, *n*=3), SKF 96365 (30 μM, *n*=7), TNP-ATP (100 nM), or ATP (100 μM, *n*=6) prior to LiCl stimulation.

In order to indirectly evaluate the activity of the SR-ATPase Ca²⁺ pump, we measured the ability of myocytes to refill their SR Ca²⁺ stores. Before the experiments, the viability of the single cells was assessed through stimulation with 10 mM caffeine in Krebs solution. Then, myocytes were perfused with Ca²⁺-free solution and 1 min later 10 mM caffeine (S1) was added for 10 min. In a previous work, we corroborated that caffeine stimulation in a Ca²⁺-free medium for 10 min completely depletes the SR Ca²⁺ store [3]. Afterwards, cells were washed with Ca²⁺-free medium to remove caffeine and perfused with Krebs (2.5 mM Ca²⁺) for 10 min to allow SR Ca²⁺ refilling. We found that this time is enough to refill the SR~70% [10]. Finally, the stimulation with caffeine was repeated once again (S2) under the same Ca²⁺-free conditions as before. In these experiments, the S2/S1 ratio corresponded to the degree of SR Ca²⁺ refilling [10]. In some experiments, cells were stimulated 4 min before S2 with LiCl (2 min) or ATP (100 μM) in the absence and in the presence of KB-R7943 and RB2 (100 μM) or suramin (100 μM). To corroborate that in these experiments the SR-ATPase Ca²⁺ pump was involved in the SR Ca²⁺ refilling, we used thapsigargin (a specific inhibitor of the SR-ATPase Ca²⁺ pump, 1 μM) to block this pump. We found that thapsigargin completely abolished the SR Ca²⁺ refilling (data not shown, *n*=3), demonstrating that the SR-ATPase Ca²⁺ pump is essential for this phenomenon.

Patch-clamp studies

We used this technique to investigate the possible role of KB-R7943 on L-type Ca²⁺ channels in the airway smooth muscle cells.

Tracheal myocytes were isolated as described above. For myocyte culture, the cell pellet was resuspended in minimum essential medium containing 10% bovine serum, 2 mM L-glutamine, 10 Uml⁻¹ penicillin, 10 μgml⁻¹ streptomycin, and 15 mM glucose and plated on rounded coverslips coated with sterile rat tail collagen. Cell culture was performed at 37°C in a 5% CO₂ in oxygen for 24–48 h.

Airway smooth muscle cells were allowed to settle down in the bottom of a 0.7-ml cover glass submerged in a perfusion chamber. The chamber was perfused by gravity (~1.5–2.0 mlmin⁻¹) with the following external solution: For Ca²⁺ currents, we used Ba²⁺ replacing Ca²⁺ as the inward charge carrier (mM): NaCl (136), CsCl (6), BaCl₂ (5), glucose (11), HEPES (10), and niflumic acid (0.1), pH 7.4, adjusted with CsOH. All experiments were performed at room temperature (~21°C).

The standard whole cell configuration and an Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments) were used to record the Ca²⁺ currents activated by depolarizing voltage steps (i.e., voltage clamp). Patch pipettes were made with 1B200F-6 glass (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) using a horizontal micropipette puller (P-87, Sutter Instruments Co., Novato, CA, USA). Pipette resistance ranged from 2 to 4 MΩ. The internal solution was (mM): CsCl (130), MgCl₂ (2), HEPES (10), EGTA (10), ATP disodium salt (3.6), and GTP sodium salt (1.9), pH 7.3, adjusted with CsOH. Whole cell currents were filtered at 1–5 KHz, digitized (Digidata 1322A, Axon) at 10 KHz, and stored on a computer for later analysis through a special software (pClamp v10, Axon).

A series of conditioning hyperpolarizing and depolarizing pulses of potentials ranging from -80 to +50 mV were applied to the myocyte in 10-mV increments from a holding potential of -60 mV for 500 ms, 1 Hz, to observe Ca²⁺ currents. After the control protocol, KB-R7943 (10 μM, *n*=6) and nifedipine (1 μM, *n*=6) were added and changes in the currents were quantified with the same protocol at maximal current peak.

Western blotting for P2X receptors

Guinea pig tracheal smooth muscle strips were collected and frozen in liquid nitrogen and remained stored until analysis. Each tissue was homogenized (Polytron PT3100, Kinematica, Luzern, Switzerland) in 50 μl of RIPA lysis buffer (Santa Cruz Biotechnology, cat no. sc-24948, Santa Cruz, CA, USA) containing 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride, pepstatin A, E-64, bestatin, leupeptin, and aprotinin as protease inhibitors. Homogenized samples were centrifuged at 4°C, 3,000 rpm, for 15 min. Total protein content was determined using a commercial kit (RC DC Protein Assay, Catalog 500–0119, Bio-Rad, Hercules,

CA, USA). Fifty micrograms of the sample was loaded in different lanes of a 10% SDS polyacrylamide gel and subjected to electrophoresis under reducing conditions. Afterwards, proteins were transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (Bio-Rad) and blocked overnight with 5% nonfat dry milk in PBS tween (Tween 20, 0.1%) at 4°C. Membranes were incubated 2 h at room temperature with rabbit polyclonal antibody raised against P2X₁ (cat no. APR-001), P2X₂ (cat no. APR-003), and P2X₃ (cat no. APR-016; 1:200, Alomone Labs, Jerusalem, Israel). Afterwards, membranes were incubated with a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (1:5,000), incubated for 1 h, at room temperature. Immunoblots were developed using an enhanced chemiluminescent reactant (Luminol; Santa Cruz Biotechnology, cat no. sc-2048 CA, USA). P2X immunoblots were analyzed by densitometry using Kodak digital science ID software, version 2.03 (Eastman Kodak, New Haven, CT, USA). Mouse monoclonal α -actin antibody (Sigma, 1:2,500) was blotted as a control for protein load. To determine specificity of immunolabeling, the antigen was used to saturate the primary antibody.

Drugs

Adenosine 5'-triphosphate disodium salt, adenosine 5'-[γ -thio]triphosphate tetralithium salt, *N*-ethylmaleimide, suramin disodium salt, reactive blue 2, pyridoxal phosphate-6-azo (benzene-2,4-disulfonic acid) tetrasodium salt, 2',3'-*O*-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate monolithium trisodium salt, indomethacin, lithium chloride, nifedipine, methoxyverapamil (D-600), thapsigargin, 3,4,5-trimethoxybenzoic acid 8-(diethylamino)octyl ester (TMB-8), and caffeine were all purchased from Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA). SKF 96365 was obtained from Biomol (Plymouth Meeting, PA, USA). KB-R7943 and SN-6 (2-[[4-[(4-nitrophenyl)methoxy]phenyl]methyl]-4-thiazoli dincarboxylic acid ethyl ester) were purchased from Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA).

Statistical analysis

Differences in the response of tracheal rings and single cells [Ca^{2+}]_i were evaluated through paired or unpaired Student's *t* test, one-way ANOVA, or repeated measures analysis of variance followed by Dunnett's multiple or Tukey–Kramer comparison tests. To evaluate the concentration–response curve of ATP, ATP γ S, and indomethacin plus ATP, we calculated the EC₅₀ by interpolation in a straight line regression the log concentration vs. the percentage of the response. 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 animal used. For single cell experiments, *n* corresponds to the number of cells and only one experiment was performed per animal.

Results

ATP induces contraction in tissues through prostaglandin production: role of P2Y receptors

ATP induced a concentration-dependent contraction of smooth muscle tracheal rings with an EC₅₀ of 11.4 μM (Fig. 1, $n=5-9$). ATP γ S ($n=4-8$) also induced a contraction with the same potency (EC₅₀ 8.7 μM). Inhibition of prostaglandin synthesis by 1 μM indomethacin completely prevented the effects of ATP at concentrations below 100 μM , but a small contraction was evident in all strips at 1 mM. In the following experiments, we characterized only the ATP-induced contraction sensitive to indomethacin by using 100 μM ATP.

We observed, in tracheal rings, that the first and second consecutive responses to ATP (100 μM , 1 h between each response, $n=6$) were not different (Fig. 2a).

The possible role of P2Y and P2X receptors in the contraction induced by ATP was evaluated through several antagonists. As can be seen in Fig. 2, the contractile response to 100 μM ATP was significantly reduced by suramin (100–300 μM , $\sim 31\%$, $n=6$) and RB2 (100–300 μM , $\sim 57\%$, $n=8$); PPADS (30 μM , $n=6$) did not modify the response to ATP.

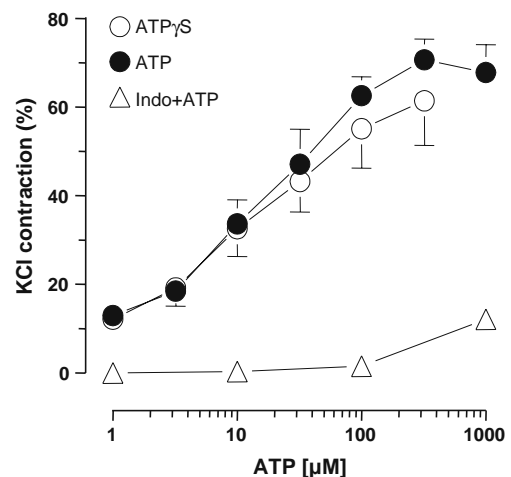


Fig. 1 Contraction responses of guinea pig tracheal rings to different concentrations of ATP and ATP γ S and the effect of indomethacin (*Indo*). ATP ($n=5-9$) and ATP γ S ($n=4-8$; a less hydrolysable ATP analog) produced a concentration-dependent contraction showing virtually the same potency and efficacy, indicating that ATP is acting as such and not through its metabolites. *Indo* (1 μM , $n=5-8$) completely abolished the response to ATP from 1 to 100 μM and only a marginal contraction remains at 1 mM, indicating that ATP-induced contraction is mostly mediated by prostaglandin production. Symbols represent mean \pm SEM

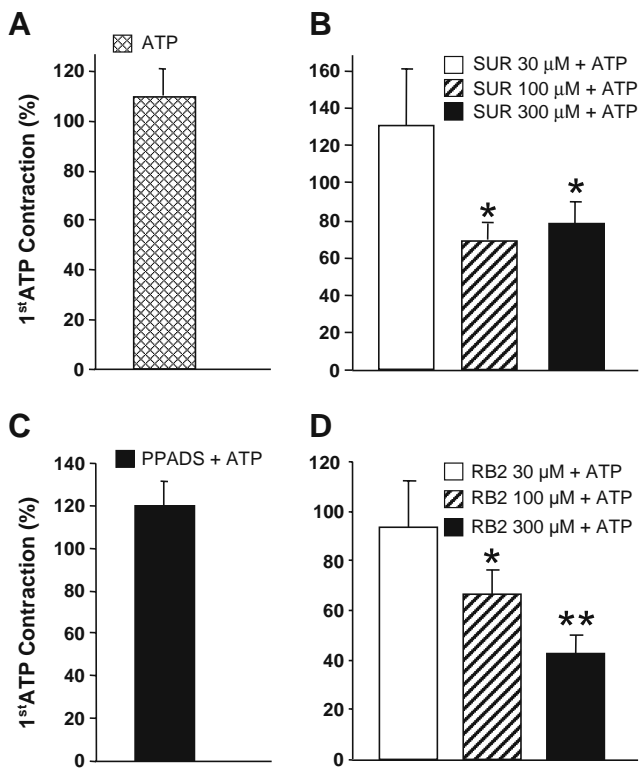


Fig. 2 Effect of suramin (*SUR*), PPADS, and RB2 on the contraction induced by ATP (100 μ M) in guinea pig tracheal rings. **a** The second response to ATP (1 h between each response, $n=6$) was not different from the first one, demonstrating that a desensitization phenomenon is not present under our experimental conditions. **b**, **d** *SUR* ($n=6$) and *RB2* ($n=6$) significantly reduced the contraction induced by ATP; however, *PPADS* (30 μ M) did not modify this response (**c**) ($n=8$). We used paired Student's *t* test as statistical evaluation since each experimental group had its own control response. * $p<0.05$, ** $p<0.01$. Bars represent mean \pm SEM

Additionally, 100 μ M 8-cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine did not modify the contraction induced by ATP resistant to suramin (data not shown).

Intracellular Ca^{2+} increment induced by ATP does not participate in contraction: role of P2X and P2Y receptors

In simultaneous measurements of contraction and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in tracheal strips, 100 μ M ATP ($n=3$) induced a change in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, constituted by a fast increase, which is later on named as Ca^{2+} peak (0.0314 ± 0.0049 , F_{340}/F_{380}). This was followed by a sustained elevation, which is here described as plateau (0.041 ± 0.004 , F_{340}/F_{380} , Fig. 3). These $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses occurred concomitantly with a muscle contraction. A second stimulation with ATP produced a similar Ca^{2+} peak (0.0520 ± 0.0340 , F_{340}/F_{380}) and plateau (0.0493 ± 0.0349 , F_{340}/F_{380}). When strips were incubated with 1 μ M indomethacin, the contraction induced by ATP ($n=4$) was abolished; the Ca^{2+} peak was not changed, being 0.0360 ± 0.0060 (F_{340}/F_{380}) before and 0.0368 ± 0.0061 (F_{340}/F_{380}) after indomethacin. However, the plateau was significantly decreased from its control value of 0.0349 ± 0.0050 to 0.0137 ± 0.0032 , F_{340}/F_{380} ($p<0.05$) in the presence of indomethacin. Epithelium removal from the strips prevented ATP-induced contraction, and paradoxically, it induced relaxation (134.9 ± 20.2 mg, $n=3$) without affecting the Ca^{2+} peak and plateau (Fig. 4).

In single airway smooth muscle cells, ATP induced a transient Ca^{2+} peak and a plateau which were concentration-dependent ($n=4$), and this response was not modified by indomethacin ($n=6$). The plateau was only observed at 100 and 1,000 μ M ATP (Fig. 5). The ATP-induced (100 μ M)

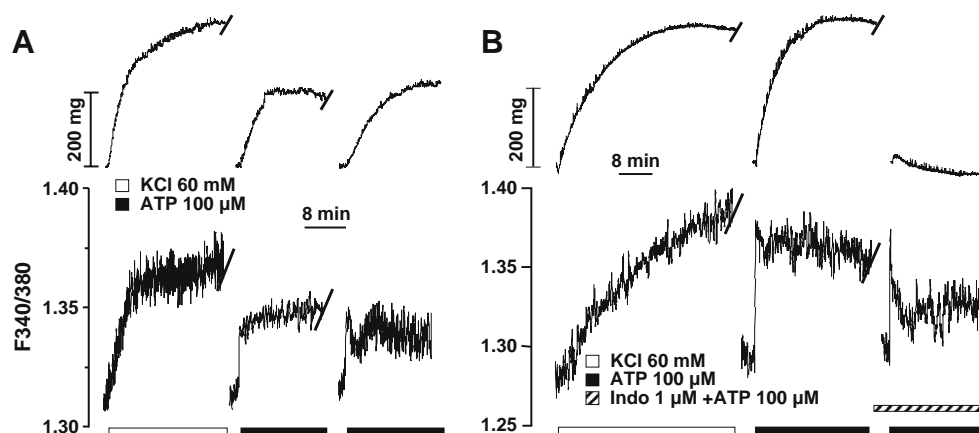


Fig. 3 Typical recordings of simultaneous measurements of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and contraction in tracheal guinea pig strips. Substantial $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation persisted after blocking most of the ATP-induced contraction with indomethacin (*Indo*). **a** ATP induced a biphasic change in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, constituted by a Ca^{2+} peak followed by a plateau. These $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses were accompanied by a contraction. A second stimulation

with ATP produced a similar response. **b** When strips were incubated with 1 μ M indomethacin, the contraction induced by ATP was almost abolished and the Ca^{2+} peak was not modified; however, the plateau was significantly decreased from its control values (for details, see “Results”)

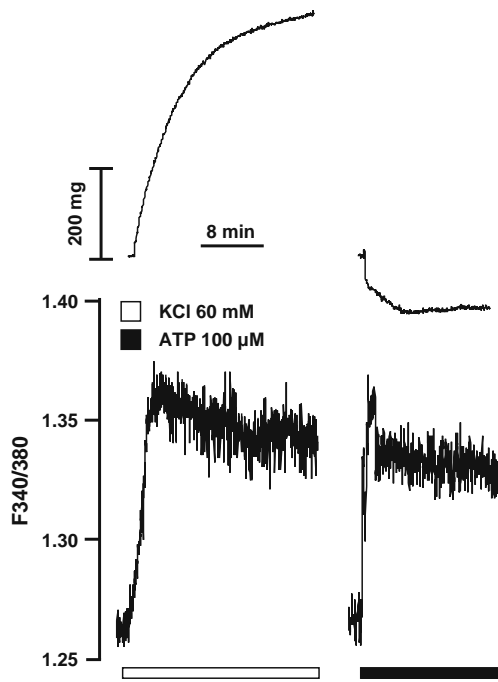


Fig. 4 Typical recordings of simultaneous measurement ($[Ca^{2+}]_i$ and contraction) in tracheal guinea pig strips. Epithelium removal from the strips prevented the ATP-induced contraction and induced relaxation ($n=3$) without affecting the Ca^{2+} peak and plateau (for details, see “Results”)

Ca^{2+} peak (325 ± 69 nM, $n=17$) was almost completely prevented by 100 μ M suramin ($n=4$, $p<0.01$) and significantly reduced by 100 μ M RB2 ($\sim 57\%$, $n=7$, $p<0.01$) or by 30 μ M PPADS ($\sim 40\%$, $n=6$, $p<0.01$), which is shown in

Fig. 5 Effect of indomethacin (Indo, 1 μ M) in the concentration–response curve to ATP in myocytes from guinea pig trachea. **a** Representative recording showing that ATP ($n=4$) induced a concentration-dependent increment in the $[Ca^{2+}]_i$. **b–d** Indo ($n=6$) did not modify the Ca^{2+} peak and the plateau induced by ATP. Bars represent mean \pm SEM

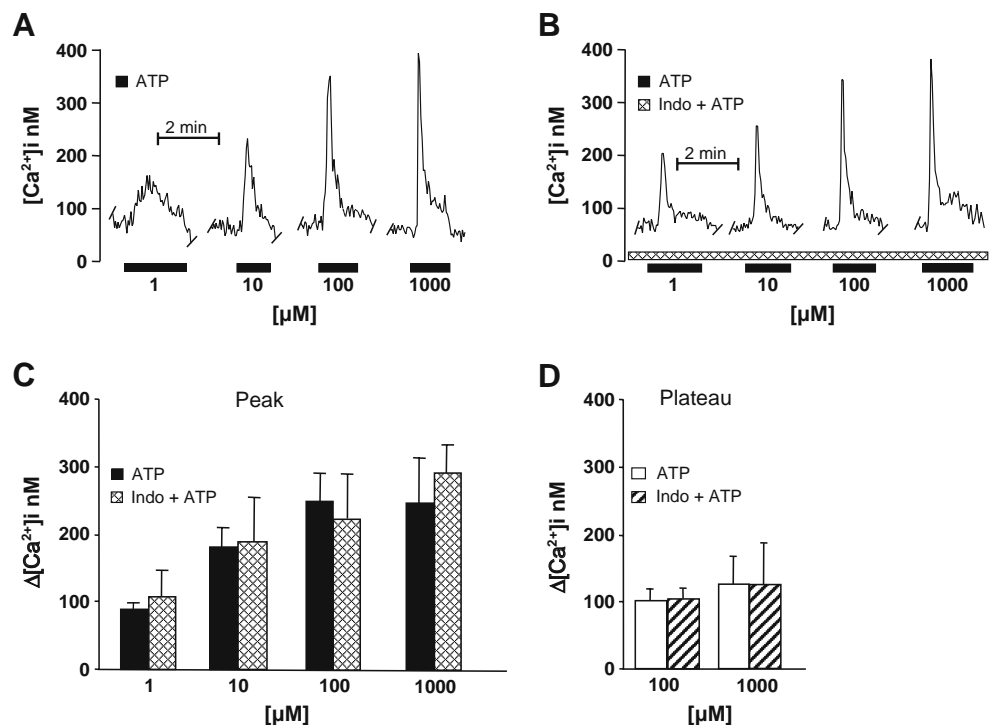
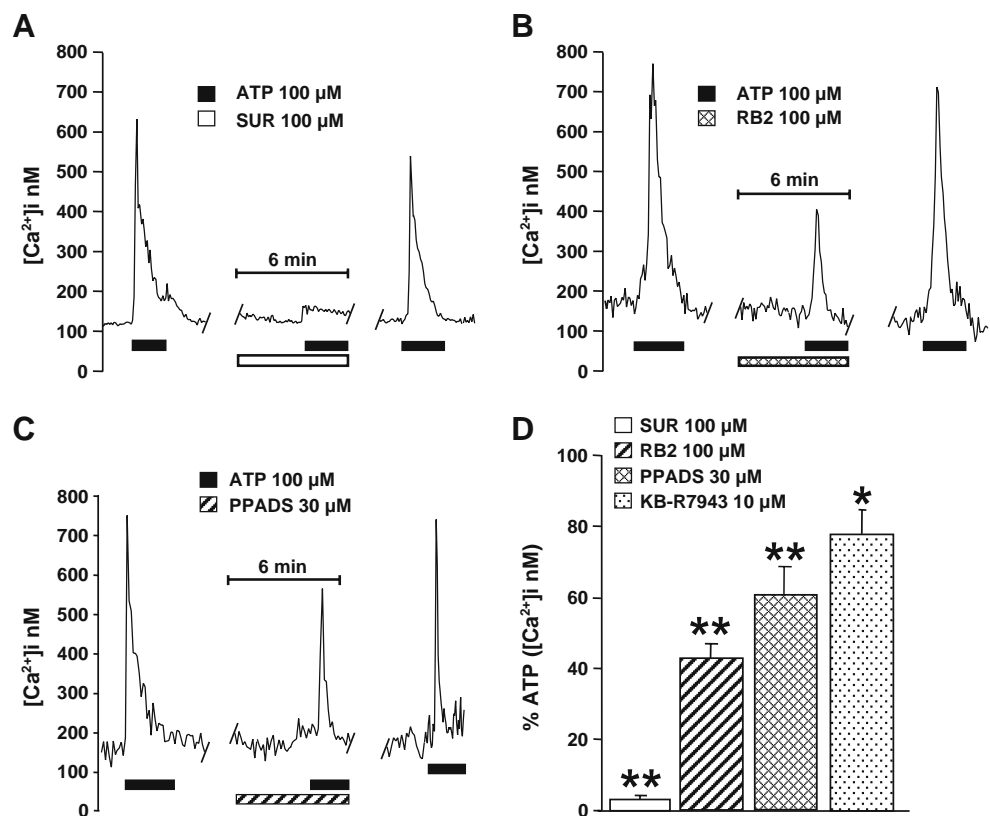


Fig. 6. It has been proposed that suramin might prevent the coupling of receptors to G proteins [9]. However, we found that 100 μ M suramin did not modify the response to carbachol (10 μ M, $n=5$, data not shown). In addition, KB-R7943 (10 μ M, $n=6$), SKF 96365 (30 μ M, $n=5$), or TNP-ATP (100 nM, $n=6$) significantly reduced ATP-induced $[Ca^{2+}]_i$ increment from 347 ± 54 to 269 ± 48 nM, ($\sim 22\%$, $p<0.05$), from 450 ± 52 to 280 ± 30 nM ($\sim 37\%$, $p<0.01$), and from 468 ± 106 to 357 ± 100 nM ($\sim 28\%$, $p<0.01$), respectively. In order to corroborate that RB2 was blocking ATP effects through metabotropic P2Y receptors, cells were incubated with NEM (30 μ M) to uncouple G proteins and with TMB-8 (50 μ M) to inhibit IP_3 -mediated Ca^{2+} release. Both drugs diminished ($\sim 44\%$, $n=4$, and $\sim 54\%$, $n=4$, respectively, $p<0.01$) ATP-induced $[Ca^{2+}]_i$ increment in a similar magnitude as RB2 ($\sim 54\%$), which indicates a role of P2Y receptors and the PLC- IP_3 pathway in this response (Fig. 7). Moreover, incubation with TMB-8 and PPADS (30 μ M) completely blocked the ATP-induced $[Ca^{2+}]_i$ increment (Fig. 7b, d), confirming that the remaining response due to the blockade of the IP_3 -mediated Ca^{2+} release corresponds to the activation of P2X receptors. Additionally, $[Ca^{2+}]_i$ responses to ATP (100 μ M) in Ca^{2+} -free medium were significantly reduced when compared with their respective responses in normal Krebs ($\sim 57\%$, $n=6$, $p<0.01$; Fig. 7c, d).

Myocyte incubation with D-600 (30 μ M) did not modify the ATP-induced $[Ca^{2+}]_i$ increment (control values, 311 ± 57 vs. D-600 values, 312 ± 55 nM, $n=4$), ruling out a putative role of L-type Ca^{2+} channels in this ATP effect.

Fig. 6 Effect of suramin (*SUR*, 100 μ M) (**a**), RB2 (100 μ M) (**b**), and PPADS (30 μ M) (**c**) on the $[Ca^{2+}]_i$ induced by 100 μ M ATP in single myocytes from guinea pigs trachea. Incubation with *SUR* virtually abolished the response induced by ATP. RB2 (~57%, $n=7$), PPADS (~40%, $n=6$), and KB-R7943 (~22%, $n=6$) partially reduced the ATP effect. **d** Statistical analysis of these antagonists. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (paired Student's *t* test, each group had its own control response). Bars represent mean \pm SEM



ATP activates the reverse mode of the NCX through P2X receptors: role in the SR Ca^{2+} refilling

To demonstrate that ATP stimulates the NCX_{REV} , first we confirmed its functional presence in the single airway smooth muscle cells. In these myocytes, the substitution of NaCl and $NaHCO_3$ with LiCl induced an increment of $[Ca^{2+}]_i$ (386 ± 84 nM) which corresponds to the activity of NCX reverse mode. This effect was completely abolished by KB-R7943 ($n=3$), demonstrating that this effect is due to the NCX reverse mode. We also tried to block the NCX reverse mode with a novel inhibitor, the SN-6 [22], but this drug at concentrations of 3 and 10 μ M did not modify the responses observed with LiCl and only detected an ~17% reduction with 30 μ M. Thus, we corroborated that SN-6 is not an appropriate NCX reverse mode inhibitor in airway smooth muscle.

To observe the recovery of the NCX reverse mode, cells were stimulated at 0 and 9 min ($n=6$) with LiCl and the last response was expressed as a percentage of the one observed at 0 min (control). As is shown in Fig. 8a, b, response at 9 min was recovered up to ~87% of control values. Therefore, we evaluate the effect of ATP (100 μ M) on the NCX reverse mode at this time. ATP significantly increases ($p<0.01$) the reverse mode of the NCX, as can be seen in Fig. 8c, f. In order to corroborate the role of

P2X receptors in this ATP effect, we tested the effects of PPADS (30 μ M), SKF 96365 (30 μ M), and TNP-ATP (100 nM). PPADS blocked the NCX reverse mode by itself (data not shown), whereas the last two substances completely prevented the ATP-induced effect on the NCX reverse mode (Fig. 8d–f).

The above results indicate that in myocytes, ATP increases $[Ca^{2+}]_i$ through different mechanisms, which seems not to be involved in smooth muscle contraction. Therefore, we investigated the possibility that this raising in $[Ca^{2+}]_i$ could be participating in SR Ca^{2+} refilling. This was studied by indirectly evaluating the SR-ATPase Ca^{2+} pump activity. In these experiments, the SR Ca^{2+} refilling in control myocytes showed an S2/S1 ratio of 0.74 ± 0.06 , ($n=5$, Fig. 9a, d), which was significantly increased by the NCX reverse mode (1.17 ± 0.06 , $n=6$, $p<0.01$; Fig. 9b, d). We also investigated if the $[Ca^{2+}]_i$ increment induced by the P2X receptor activation is involved in the SR Ca^{2+} refilling; therefore, we blocked P2Y receptors with RB2 (100 μ M) and under these conditions found that ATP (100 μ M) increased the S2/S1 ratio (1.15 ± 0.04 , $n=6$; Fig. 9c, d). This ratio was significantly diminished when NCX_{REV} was blocked with KB-R7943 (10 μ M, 0.98 ± 0.06 , $n=5$). The blockade of P2X receptors with suramin ($n=4$) prevented the ATP effects on the SR Ca^{2+} refilling (Fig. 9d), demonstrating the role of P2X receptors in this phenomenon.

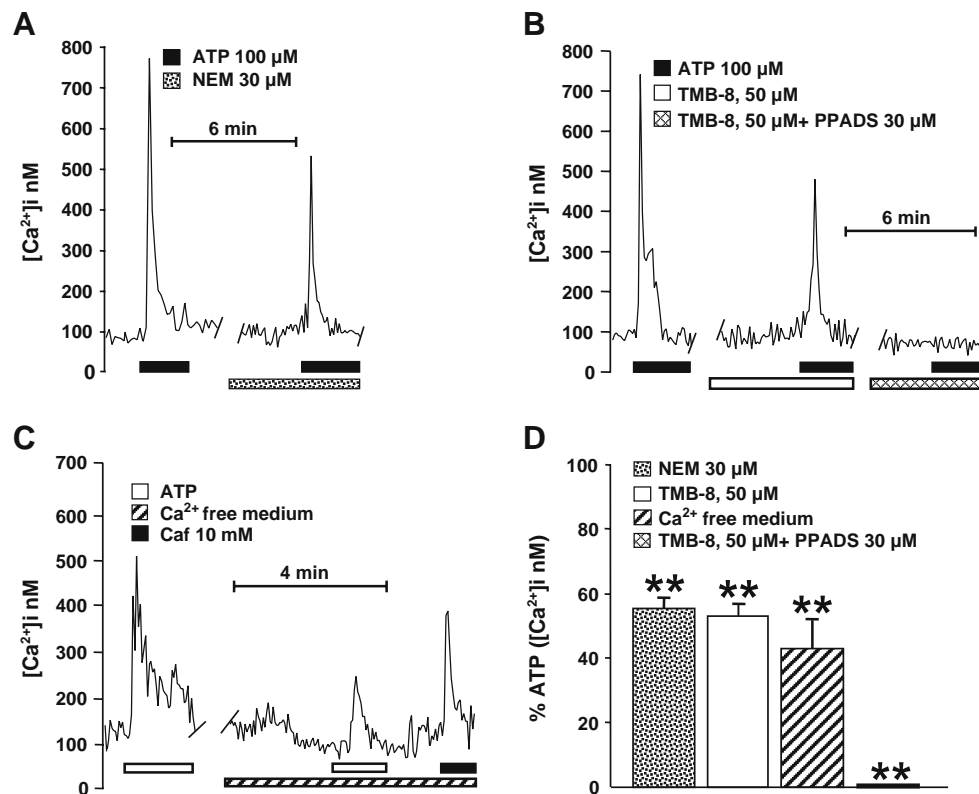


Fig. 7 Ca^{2+} signaling induced by ATP is mediated by P2Y and P2X receptors in the airway smooth muscle cells. **a**, **b** *N*-ethylmaleimide (*NEM*, $n=4$, which can uncouple G proteins from several receptors) and TMB-8 ($n=4$, an antagonist of IP_3 -mediated Ca^{2+} release) diminished the ATP-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increment (~44% and ~46%, respectively), indicating a role of P2Y receptors in the ATP effect. The remaining response to ATP after TMB-8 incubation was completely abolished with PPADS ($n=4$, an inhibitor of P2X receptors), confirming that the activation of P2X receptors is

involved in this Ca^{2+} response. **c** Typical recording where ATP induced a transient Ca^{2+} peak which was diminished in Ca^{2+} -free medium (~57%, $n=6$). We corroborated that after ATP responses in Ca^{2+} -free medium, the sarcoplasmic reticulum (*SR*) was not depleted since caffeine (*Caf*) induced a transient Ca^{2+} peak. **d** Statistical analysis (** $p < 0.01$) when compared with its own control group (paired Student's *t* test (**a**, **c**) and repeated measures analysis of variance followed by Dunnett multiple comparisons test (**b**)). *Bars* represent mean \pm SEM

In light of the aforementioned experiments, we decided to evaluate, in organ baths, if the reverse mode of the NCX could be involved during the ATP-induced contraction. We observed that tracheal responses to successive ATP ($n=10$ for the first three successive stimulations and $n=4$ for the last one) stimulations were not different between them; however, KB-R7943 ($n=9$ for the first three successive stimulations and $n=4$ for the last one) progressively reduced ($p < 0.01$) the contraction induced by ATP in the second, third, and fourth stimulations (Fig. 10).

KB-R7943 does not modify the calcium currents in tracheal myocytes and only slightly diminishes the airway smooth muscle contraction induced by KCl

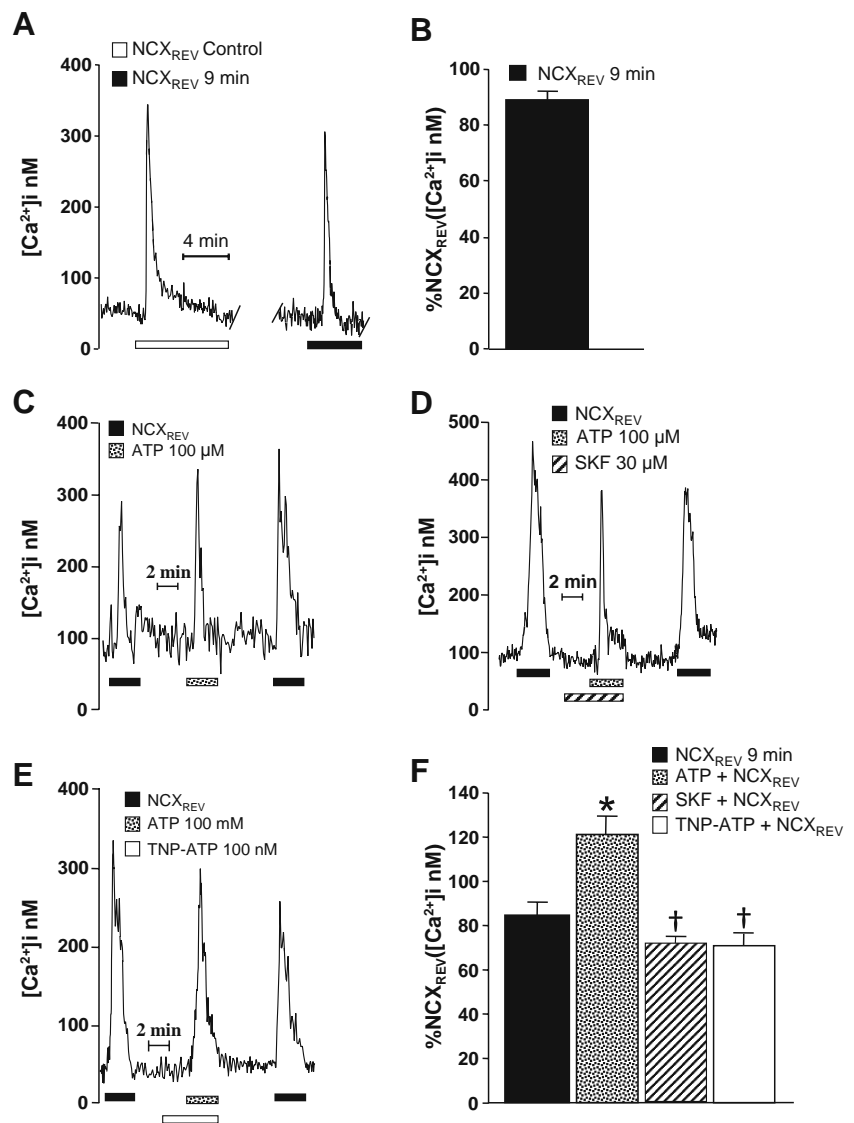
It has been reported that KB-R7943 can also block L-type Ca^{2+} channels in canine ventricular cardiomyocytes and in tsA-201 cells [5, 31], and this effect might actually account

for the effects observed in the ATP-induced contraction. However, we performed some experiments and ruled out this possibility since KB-R7943 (10 μM) did not modify the calcium currents in tracheal myocytes (Fig. 11b) and only slightly diminished the airway smooth muscle contraction induced by KCl (~10%, $n=5$, $p < 0.05$; Fig. 11a). Nevertheless, nifedipine almost completely abolished the calcium currents and the KCl-induced contraction and D-600 abolished the KCl-induced response in organ baths (Fig. 11).

P2X₁ and P2X₃ are the main purinergic receptors found in airway smooth muscle

Analysis of densitometry data from Western blots showed that from the three P2X receptors explored, P2X₁ and P2X₃ are the main receptors found in guinea pig airway smooth muscle and the P2X₂ receptor seems to be less expressed in this tissue (Fig. 12).

Fig. 8 Effect of ATP on the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in its reverse mode (NCX_{REV}) in single myocytes from guinea pig trachea. **a** Typical recordings where the substitution of NaCl and NaHCO_3 with LiCl induced the NCX_{REV} . Myocytes were stimulated with LiCl at 0 and 9 min ($n=6$). At 9 min, the response to LiCl was $\sim 87\%$ of the control response. **b** Statistical analysis of the responses produced by the NCX_{REV} . **c** Original recording showing that ATP increased the response produced by NCX_{REV} . **d, e** Effect of SKF 96365 (SKF) and $2',3'-O$ -(2,4,6-Trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate (TNP-ATP) on the increased response of the NCX_{REV} produced by ATP. **f** Statistical analysis of the effect of ATP ($n=6$), SKF ($n=7$), and TNP-ATP ($n=7$). $*p<0.01$ with respect to NCX_{REV} 9-min group, $^\dagger p<0.01$ with respect to $\text{ATP}+\text{NCX}_{\text{REV}}$ group (one-way analysis of variance followed by Tukey–Kramer multiple comparisons test (**f**)). Bars represent mean \pm SEM



Discussion

The major finding of the present study is that in the guinea pig airway smooth muscle, ATP activates the reverse mode of NCX through the opening of P2X channels, most likely via P2X_1 and P2X_3 , and both mechanisms induced the SR Ca^{2+} refilling. ATP is the only known agonist to activate ligand-gated channels (P2X receptors), and as far as we know, this is the first study of the role of these receptors on the SR Ca^{2+} refilling. This last phenomenon might facilitate Ca^{2+} availability for bronchoconstrictor agonists, which act through the PLC-IP_3 pathway.

The airway smooth muscle contraction induced by ATP has been widely described in various animal species, including humans [4, 16, 24, 26, 27]. In guinea pig, this response has been reported to be dependent on the epithelium and requires the production of prostaglandins and thromboxanes [1, 15]. By using simultaneous measure-

ments, we have corroborated that ATP induces an elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and muscle contraction. This contraction is an indirect effect mediated by prostaglandin release by the epithelium and elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during the plateau. However, the contraction is independent from the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase induced by the direct stimulation of the purinergic receptors in the smooth muscle tissue, as was shown by the fact that indomethacin and epithelium removal blocked the ATP contraction but increments in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ are still observed under these conditions. Further support to this idea is the fact that the increment in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by ATP, in single cells, was not modified by indomethacin. Thus, ATP increases $[\text{Ca}^{2+}]_i$ indirectly by acting through the epithelium and directly on smooth muscle cells. The indirect effect of ATP is the one related with contraction through the production of prostaglandins. In agreement with this interpretation, it has been reported that thromboxane induces contraction and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increment in bovine airway

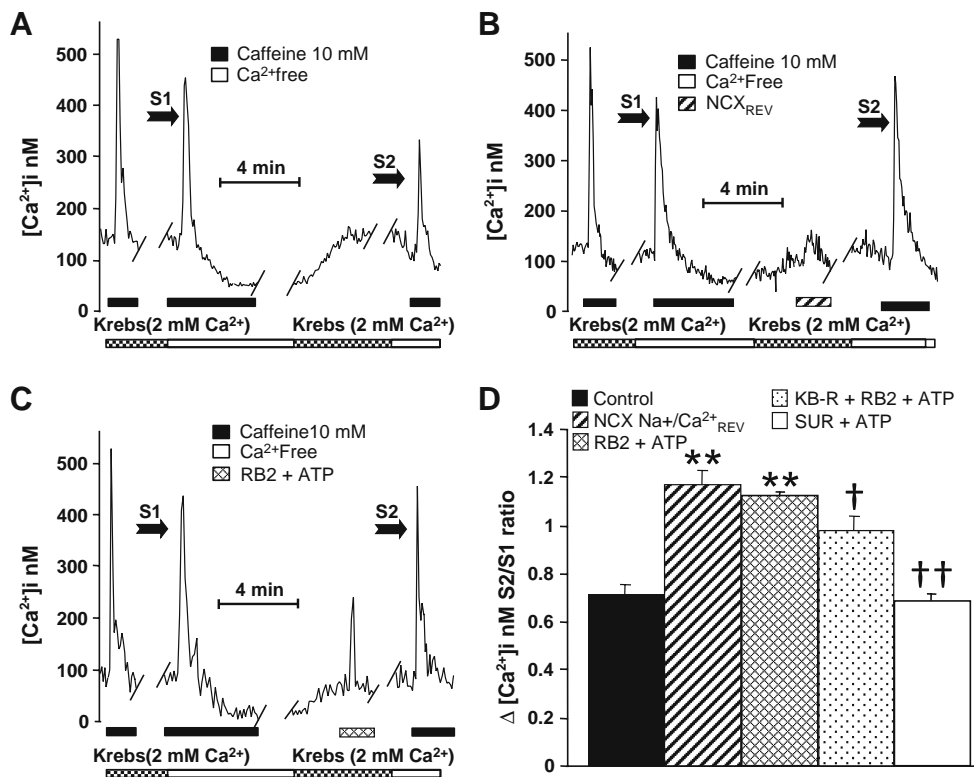


Fig. 9 Effect of P2X receptors and the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in its reverse mode (*NCX_{REV}*) on the SR Ca²⁺ refilling in single myocytes from guinea pig trachea. **a** Experimental protocol to evaluate the SR Ca²⁺ refilling using caffeine (10 mM). For details, see “Intracellular Ca²⁺ measurements in tracheal myocytes”. **b** Typical recordings of *NCX_{REV}* effect on the SR Ca²⁺ refilling. **c** Demonstrates the role of P2X receptors in the SR Ca²⁺ refilling. **d** Statistical analysis demonstrating that *NCX_{REV}* (*n*=6) significantly increased the SR Ca²⁺ refilling (expressed as the S2/S1 ratio) as compared with control

group (*n*=5). Also, this ratio was significantly increased with ATP (100 μM, *n*=5) in the presence of RB2 (100 μM). This ratio was significantly diminished when *NCX_{REV}* was blocked with KB-R7943 (10 μM). The blockade of P2X receptors with suramin (*n*=4) prevented the ATP effects on the SR Ca²⁺ refilling. S1 first caffeine stimulation, S2 second caffeine stimulation. ***p*<0.01 as compared with the control group; †*p*<0.05, ††*p*<0.01 as compared with RB2+ATP group (analysis of variance followed by Dunnett multiple comparisons test). Bars represent mean±SEM

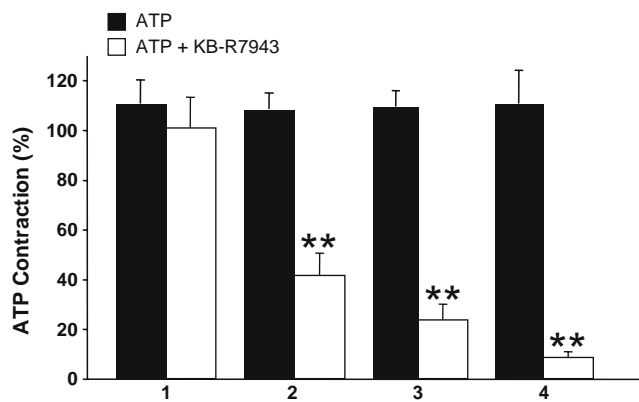


Fig. 10 Effect of KB-R7943 (10 μM) on the tracheal rings responses to successive ATP (100 μM) stimulations. Tracheal responses to successive ATP (*n*=10 for the first three successive stimulations and *n*=4 for the last one) stimulations were not different between them. KB-R7943 (*n*=9 for the first three successive stimulations and *n*=4 for the last one) significantly reduced the contraction induced by ATP in the second, third, and fourth stimulations. ***p*<0.01 (non-paired Student’s *t* test). Bars represent mean±SEM

smooth muscle [34]. The direct activation of purinergic receptors in the airway smooth muscle seems to be involved in the SR Ca²⁺ refilling (see below).

Epithelium removal from the guinea pig strips not only prevented the ATP-induced contraction but, paradoxically, also induced relaxation. Further research is required to elucidate the receptors and mechanisms involved in such an effect, which is clearly out of the scope of the present study. However, this ATP-induced relaxation appears to require 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. Also, a prostaglandin-dependent relaxant effect via prostaglandin-dependent PKA activation has already been shown in rat airways [27].

In the organ bath experiments, we found that indomethacin abolished the contraction induced by ≤100 μM of ATP and P2Y receptors were partially involved in this contraction since suramin and RB2 (known antagonists of P2Y receptors) diminished the ATP effect, but not

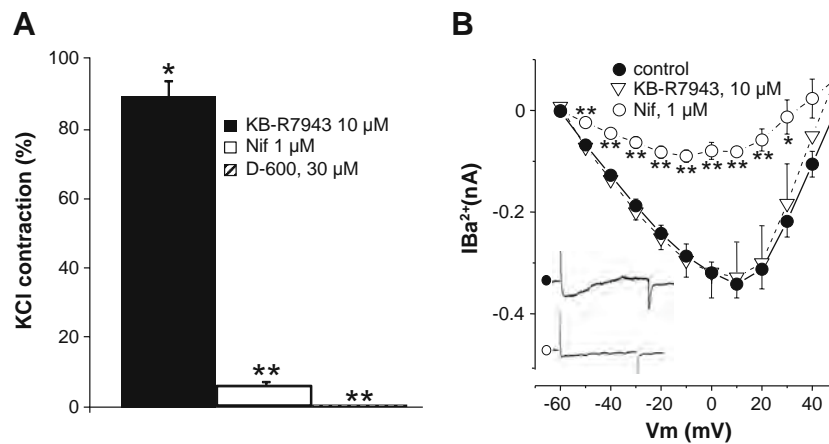


Fig. 11 Effect of KB-R7943 and L-type Ca^{2+} channel blockers on the KCl (60 mM)-induced contraction (**a**) and in the Ca^{2+} currents in the guinea pig airway smooth muscle (**b**). KB-R7943 did not modify the Ba^{2+} current ($n=6$), but slightly diminished the contraction induced by KCl ($p<0.05$, ~10%, $n=5$). However, nifedipine (*Nif*, $n=6$) almost completely abolished the calcium currents and the KCl-induced

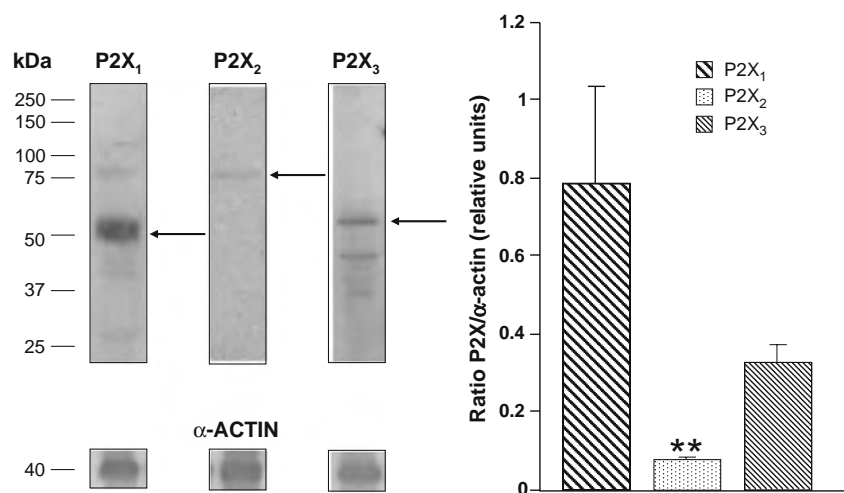
contraction and also D-600 ($n=5$) eliminated the KCl-induced response (repeated measures analysis of variance followed by Dunnett multiple comparisons test for patch-clamp experiments and paired Student's *t* test for organ bath experiments since each experimental data had their own control group)

PPADS (an inhibitor of most P2X receptors). It has been reported in guinea pig tracheal smooth muscle that A_1 receptors mediate the contraction of this tissue [14]. However, 8-cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine (A_1 receptor antagonist) did not modify the contraction induced by ATP resistant to suramin, discarding the possible role of A_1 receptors in this response. A possible explanation for the suramin- and RB2-resistant contraction is that ATP is activating P2Y-resistant receptors to these antagonists, as has been shown in other tissues [2, 25]. Thus, further research in this topic is required to elucidate the purinergic receptors involved in the suramin- and RB2-resistant response.

ATP-induced $[Ca^{2+}]_i$ increment has been associated with activation of P2Y and P2X receptors in the airway smooth muscle from different species [4, 17, 27]. However, this is

the first report in guinea pig airway smooth muscle showing that both purinergic receptors are responsible for the $[Ca^{2+}]_i$ increment induced by ATP. The role of P2X receptors is suggested because PPADS and SKF 96365 reduced in about the same magnitude (~40%) the ATP-induced $[Ca^{2+}]_i$ increment. To determine the P2X receptor subtype involved, we used TNP-ATP (antagonist of P2X₁, P2X₃, and heteromeric P2X_{2/3} receptors). This substance has been found to be selective on the latter three receptors at concentrations ≤ 100 nM in HEK 293 cells [35]. Here, we found that 100 nM TNP significantly reduced the $[Ca^{2+}]_i$ increment induced by ATP in guinea pig tracheal myocytes. Additionally, we corroborated by Western blot that P2X₁ and P2X₃ are the most common P2X receptors in this smooth muscle, suggesting that at least part of this $[Ca^{2+}]_i$ increment is mediated by the opening of any of these two

Fig. 12 *Left panel* Representative blots for P2X₁ (~50 kDa), P2X₂ (~75 kDa), and P2X₃ (~55 kDa), shown by an arrow. The molecular mass is expressed according to the specifications of the antibody commercial data sheets. α -Actin (40 kDa) was blotted as a control for protein load. *Right panel* Densitometry data from Western blot analysis showing P2X receptors in guinea pig tracheal smooth muscle. Bars represent mean \pm SEM. ** $p<0.01$ compared with P2X₁ receptors ($n=3$, analysis of variance followed by Tukey multiple comparisons test



P2X receptors. P2X₄ homomeric receptor appears not to be involved in the ATP-induced $[Ca^{2+}]_i$ increment or has a marginal role since suramin, which does not block P2X₄ receptors [7], almost completely blocks the increase in intracellular Ca^{2+} induced by this purine; our observations, however, do not rule out the contribution of heteromeric channels formed by P2X₄ subunits.

It is well known that P2X receptors are ligand-gated nonselective cation channels and when activated could lead to a large subplasmalemmal rise in Na^+ concentration. It is widely accepted that an increase in the intracellular Na^+ concentration activates the reverse mode of the NCX, allowing Ca^{2+} influx and Na^+ efflux [6, 11]. Therefore, it is expected that the activation of P2X receptors by ATP would lead to the modulation of NCX. Accordingly, we found that ATP activates the reverse mode of the NCX. Experimental support for this interpretation are: (1) Blocking NCX reverse mode with KB-R7943 decreased the ATP-induced $[Ca^{2+}]_i$ increment; (2) ATP incubation previous to the activation of the reverse mode of the NCX significantly increased its response, and this effect was completely abolished when cells were pre-incubated with P2X receptor inhibitors; and (3) ATP, via P2X receptors, activates the SR Ca^{2+} refilling, which is partially blocked by KB-R7943.

Hirota et al. [19, 20], by performing experiments in bovine tracheal smooth muscle, concluded that agonists such as acetylcholine, histamine, and 5-HT activate the reverse mode of the NCX to provide a source of Ca^{2+} for store refilling. Our results with guinea pig tracheal smooth muscle cells showed that NCX, in its reverse mode, increased the activity of the SR-ATPase Ca^{2+} pump to refill the store. Additionally, we found that activation of P2X receptors also increased the activity of this pump. Since ATP favors NCX_{REV}, and stimulates P2X receptors, we also consider that this purine is increasing the SR Ca^{2+} refilling. This interpretation is further corroborated in our organ bath experiments in which successive ATP-induced contractions were significantly diminished by KB-R7943 in tracheal rings.

Nonspecific actions of KB-R7943 have been reported, such as the inhibition of voltage-activated Na^+ , L-type Ca^{2+} , and K^+ currents [5, 11, 36]. However, it is very unlikely that any of these potential effects are involved in the actions reported here for KB-R7943. In this context, airway smooth muscle does not express voltage-activated Na^+ channels. Indeed, in our tissues, the only cells that express these channels are the paratracheal neurons. These cells, however, cannot be involved in the ATP-induced contraction because tissue incubation with 3.1 μ M of tetrodotoxin did not modify the response to ATP ($n=3$, data not shown).

In regard to the K^+ currents, if KB-R7943 blocks these channels in airway smooth muscle, one would expect that

such an effect will favor the contraction; however, we observed an inhibition of the contraction in the presence of KB-R7943.

It has been reported that KB-R7943 can block L-type Ca^{2+} channels in canine ventricular cardiomyocytes and in tsA-201 cells [5, 31], and this effect might actually account for the effects observed in the ATP-induced contraction. However, we found that KB-R7943 did not modify the calcium currents in tracheal myocytes and only slightly diminished the airway smooth muscle contraction induced by KCl (~10%). Thus, our experimental approach suggests a minimal participation of Ca^{2+} channels when we use KB-R7943 and the effects observed are mainly due to the reverse mode of the Na^+/Ca^{2+} exchanger. Nevertheless, it is possible that ~10% of the KB-R7943 effect on the successive ATP responses is mediated by L-type Ca^{2+} channels. However, we were unable to corroborate this hypothesis since SN-6, a more selective inhibitor of the NCX reverse mode [22], only slightly modified the responses observed with LiCl in tracheal myocytes at concentrations higher than 30 μ M (~17%), suggesting that this drug is a weak NCX reverse mode inhibitor in airway smooth muscle. SEA 0400 is another known NCX reverse mode inhibitor; however, this product is only available in Japan.

In conclusion, our observations show that ATP: (1) indirectly promotes muscle contraction by inducing the production of a bronchoconstrictor prostaglandins, which partially involves epithelial P2Y receptors; (2) increases the $[Ca^{2+}]_i$ through a prostaglandin-independent manner by activating P2X and P2Y receptors in smooth muscle, and this $[Ca^{2+}]_i$ increment is not involved in the ATP-induced contraction; and (3) activates P2X₁, P2X₃ ligand-gated channels and the reverse mode of the NCX to refill the SR and facilitate Ca^{2+} availability for bronchoconstrictor agonists that act through the PLC-IP₃ pathway. The physiological meaning of these findings is complex; however, one fact is that ATP effects on smooth muscle would be expected to occur independently according to the site where ATP is released. In vivo conditions, if ATP is released only close to the epithelium (by platelets and mast cells), this would likely induce indirect contraction without affecting SR Ca^{2+} refilling. In support to this hypothesis, it has been reported in a perfused tracheal preparation that intraluminal administration of ATP (<10 μ M) induced significant contractions which were epithelium- and prostaglandin-dependent, whereas ATP did not produce any response when administered extraluminally [15]. However, if ATP is released only within the smooth muscle layer by nerve varicosities [8], one would expect that the main effect will be on SR Ca^{2+} refilling and these two mechanisms might occur simultaneously; these, however, require further investigation.

Acknowledgments We acknowledge Posgrado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, UNAM, and CONACYT for the scholarship to Edgar Flores during 10 months. This study was partly supported by a grant from CONACYT (81409 and 102013) and DGAPA-UNAM (IN201810-3) to Dr. Luis M. Montaña.

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

References

- Advenier C, Bidet D, Floch-Saint-Aubin A, Renier A (1982) Contribution of prostaglandins and thromboxanes to the adenosine and ATP-induced contraction of guinea-pig isolated trachea. *Br J Pharmacol* 77:39–44
- Barajas-López C, Espinosa-Luna R, Christofi FL (2000) Changes in intracellular Ca^{2+} by activation of P2 receptors in submucosal neurons in short-term cultures. *Eur J Pharmacol* 409:243–257
- Bazan-Perkins B, Flores-Soto E, Barajas-Lopez C, Montaña LM (2003) Role of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content in Ca^{2+} entry of bovine airway smooth muscle cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 368:277–283
- Bergner A, Sanderson MJ (2002) ATP stimulates Ca^{2+} oscillations and contraction in airway smooth muscle cells of mouse lung slices. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L1271–L1279
- Birinyi P, Acsai K, Bányász T, Tóth A, Horváth B, Virág L, Szentandrassy N, Magyar J, Varró A, Fülöp F, Nánási PP (2005) Effects of SEA0400 and KB-R7943 on $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange current and L-type Ca^{2+} current in canine ventricular cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372:63–70
- Blaustein MP, Lederer WJ (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 79:763–854
- Burnstock G (2006) Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* 27:166–176
- Burnstock G (2010) Purinergic cotransmission. *Exp Physiol* 94:20–24
- Butler SJ, Kelly EC, McKenzie FR, Guild SB, Wakelam MJ, Milligan G (1988) Differential effects of suramin on the coupling of receptors to individual species of pertussis toxin sensitive guanine nucleotide binding proteins. *Biochem J* 251:201–205
- Carbajal V, Vargas MH, Flores-Soto E, Martinez-Cordero E, Bazan-Perkins B, Montaña LM (2005) LTD_4 induces hyperresponsiveness to histamine in bovine airway smooth muscle: role of SR-ATPase Ca^{2+} pump and tyrosine kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288:84–92
- Cai F, Li PY, Yang Y, Liu ZF, Li ML, Zhou W, Pei J, Cheng J, Lan H, Grammer JB, Zeng XR (2007) Characteristic of spontaneous transient outward potassium currents in vascular smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Acta Physiologica Sinica* 59:27–34
- Dai JM, Kuo KH, Leo JM, van Breemen C, Lee CH (2006) Mechanism of ACh-induced asynchronous calcium waves and tonic contraction in porcine tracheal muscle bundle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290:L459–L469
- Eisner DA, Lederer WJ (1985) Na–Ca exchange: stoichiometry and electrogenicity. *Am J Physiol Cell Physiol* 248:C189–C202
- Farmer SG, Canning BJ, Wilkins DE (1988) Adenosine receptor-mediated contraction and relaxation of guinea-pig isolated tracheal smooth muscle: effects of adenosine antagonists. *Br J Pharmacol* 95:371–378
- Fedan JS, Belt JJ, Yuan LX, Frazer DG (1993) Contractile effects of nucleotides in guinea pig isolated, perfused trachea: involvement of respiratory epithelium, prostanoids and Na^+ and Cl^- channels. *J Pharmacol Exp Ther* 264:210–216
- Fedan JS, Stem JL, Day B (1994) Contraction of the guinea pig isolated, perfused trachea to purine and pyrimidine agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 268:1321–1327
- 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
- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440–3450
- Hirota S, Janssen LJ (2007) Store-refilling involves both L-type calcium channels and reverse-mode sodium–calcium exchange in airway smooth muscle. *Eur Respir J* 30:269–278
- Hirota S, Pertens E, Janssen LJ (2007) The reverse mode of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger provides a source of Ca^{2+} for store refilling following agonist-induced Ca^{2+} mobilization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L438–L447
- Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, Kool M, Willart MA, Muskens F, Hoogsteden HC, Luttmann W, Ferrari D, Di Virgilio F, Virchow JC Jr, Lambrecht BN (2007) Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat Med* 13:913–919
- Iwamoto T, Inoue Y, Ito K, Sakaue T, Kita S, Katsuragi T (2004) The exchanger inhibitory peptide region-dependent inhibition of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange by SN-6 [2-[4-(4-nitrobenzyloxy)benzyl]thiazolidine-4-carboxylic acid ethyl ester], a novel benzyloxyphenyl derivative. *Mol Pharmacol* 66:45–55
- Kajita J, Yamaguchi H (1993) Calcium mobilization by muscarinic cholinergic stimulation in bovine single airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 264:L496–L503
- Kamikawa Y, Shimo Y (1976) Mediation of prostaglandin E_2 in the biphasic response to ATP of the isolated tracheal muscle of guinea-pigs. *J Pharm Pharmacol* 28:294–297
- Mendoza-Fernandez V, Andrew RD, Barajas-López C (2000) ATP inhibits the synaptic release by acting at P2Y receptors in pyramidal neurons of hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther* 293:172–179
- Michoud MC, Tao FC, Pradhan AA, Martin JG (1999) Mechanisms of the potentiation by adenosine of adenosine triphosphate-induced calcium release in tracheal smooth-muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21:30–36
- Mounkaïla B, Marthan R, Roux E (2005) Biphasic effect of extracellular ATP on human and rat airways is due to multiple P2 purinoceptor activation. *Respir Res* 6:143
- Nagaoka M, Nara M, Tamada T, Kume H, Oguma T, Kikuchi T, Zaini J, Moriya T, Ichinose M, Tamura G, Hattori T (2009) Regulation of adenosine 5'-triphosphate (ATP)-gated P2X₄ receptors on tracheal smooth muscle cells. *Respir Physiol Neurobiol* 166:61–67
- North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82:1013–1067
- Oguma T, Ito S, Kondo M, Makino Y, Shimokata K, Honjo H, Kamiya K, Kume H (2007) Roles of P2X receptors and Ca^{2+} sensitization in extracellular adenosine triphosphate-induced hyperresponsiveness in airway smooth muscle. *Clin Exp Allergy* 37:893–900
- Ouardouz M, Zamponi GW, Barr W, Kiedrowski L, Stys PK (2005) Protection of ischemic rat spinal cord white matter: dual action of KB-R7943 on $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange and L-type Ca^{2+} channels. *Neuropharmacology* 48:566–575
- Shapiro MS, Wollmuth LP, Hille B (1994) Modulation of Ca^{2+} channels by PTX-sensitive G-proteins is blocked by N-ethylmaleimide in rat sympathetic neurons. *J Neurosci* 14:7109–7116
- 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
34. Takata Y, Nishimura Y, Maeda H, Yokoyama M (1999) Phospholipase A₂ augments contraction and intracellular calcium mobilization through thromboxane A₂ in bovine tracheal smooth muscle. *Eur Respir J* 14:396–404
 35. Virginio C, Robertson G, Surprenant A, North RA (1998) Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X₁, P2X₃, and heteromeric P2X_{2/3} receptors. *Mol Pharmacol* 53:969–973
 36. Watano T, Harada Y, Harada K, Nishimura N (1999) Effect of Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitor, KB-R7943 on ouabain-induced arrhythmias in guinea-pigs. *Br J Pharmacol* 127:1846–1850
 37. Wu C, Sui G, Fry CH (2002) The role of the L-type Ca²⁺ channel in refilling functional intracellular Ca²⁺ stores in guinea-pig detrusor smooth muscle. *J Physiol* 538:357–369

Characterization of P2Y receptors mediating ATP induced relaxation in guinea pig airway smooth muscle: involvement of prostaglandins and K⁺ 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⁺ currents (I_K) 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 γ S and UTP induced a concentration-dependent relaxation similar to ATP; α,β -methylene-ATP was inactive from 1 to 100 μ 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_K

increment was not modified by suramin or RB2 but the combination of both drugs abolished it. This increment in the I_K was also completely nullified by NEM and SQ 22,536. 4-Aminopyridine or iberiotoxin diminished the ATP-induced I_K increment, and the combination of both substances diminished ATP-induced relaxation. The presence of P2Y₂ and P2Y₄ 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 P2Y₄ and P2Y₂ receptors; (2) induces I_K increment through activation of the delayed rectifier K⁺ channels and the high-conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels, therefore both channels are implicated in the ATP-induced relaxation; and (3) this I_K 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⁺ 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 P2X₁₋₇ and P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14} subtypes [7]. P2X receptors are ligand-gated channels [20] and P2Y receptors are coupled to G proteins linked to IP₃ 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 P2Y₂ and P2Y₄ 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 $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 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 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 NaHCO_3 , 4.6 KCl, 1.2 KH_2PO_4 , 1.2 MgSO_4 , 11 glucose, and 2 CaCl_2 . Preparations were maintained at 37°C and

bubbled with 5% 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 μM) to different tracheal rings.

In order to evaluate the relaxing effect of ATP, tracheal rings were precontracted with 10 μM histamine, and then single concentrations (1, 3.2, 10, 32, 100, 320, and 1,000 μM) of ATP, ATP γS (non-hydrolyzable analog), α,β -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_{1,2,6,11,12,13} receptor antagonist, 100 and 200 μM) [7, 30, 31, 33], pyridoxal phosphate-6-azo(benzene-2,4-disulfonic acid) (PPADS, P2X receptor antagonist, 30 μM), reactive blue 2 (RB2; P2Y_{1,4,6,11,12,13} receptor antagonist, 100 and 200 μM) [7, 30, 31, 33], a combination of suramin (100 μM)+RB2 (100 μM), ARL 67156 (ecto-ATPase inhibitor, 100 μM) and *N*-ethylmaleimide (NEM; 30 μM), 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 μM) 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 Uml⁻¹ papain and incubated for 10 min at 37°C. The tissue was washed with Leibovitz's solution to remove the enzyme excess and then placed in Hanks solution containing 1 mg ml⁻¹ collagenase type I and 4 mg ml⁻¹ dispase II (neutral protease) during ~20 min at 37°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°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 Uml⁻¹ penicillin, 10 µg ml⁻¹ streptomycin, and 15 mM glucose and plated on rounded coverslips coated with sterile rat tail collagen. Cell culture was performed at 37°C in 5% CO₂ 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 (~1.5–2.0 ml min⁻¹) with external solution (in mM): 130 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 10 HEPES, 10 glucose, 0.5 MgCl₂, 3 NaHCO₃, 1.2 KH₂PO₄, and 0.1 niflumic acid (pH 7.4, adjusted with NaOH). Experiments were performed at room temperature (~22°C). The standard whole-cell configuration and an Axopatch 200A amplifier (Axon) were used to record the membrane 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 MΩ. 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 K⁺ currents. Once a basal recording of K⁺ currents was obtained after the control protocol, a concentration response curve to ATP or UTP (1, 10, 100, and 1,000 µM) was constructed and changes in the K⁺ currents were quantified. Some myocytes were perfused with indomethacin (1 µM) 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 µM), RB2 (100–200 µM) or the combination of both

drugs, SQ 22,536 (100 µM, adenylyl cyclase inhibitor), and 30 µM NEM.

The protocol to evaluate the participation of the Ca²⁺-dependent K⁺ currents (*I*_{K(Ca)}) and the delayed rectifier K⁺ currents (*I*_{Kv}) on the 1-mM ATP-induced K⁺ currents was as follows. Once a basal recording of K⁺ currents was obtained, voltage-dependent delayed rectifier K⁺ channels (*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 Ca²⁺-activated K⁺ channels (*BK*_{Ca}) was evaluated by adding 100 nM IBTX (a *BK*_{Ca} selective blocker). After each treatment, K⁺ currents were recorded. To evaluate the role of the delayed rectifier 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 µl of lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM Na₂VO₄, 1% Triton X-100, 50 mM NaF, 10 µg ml⁻¹ leupeptin, and 10 µg 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°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°C with rabbit polyclonal antibody raised against P2Y₁ (cat. no. APR-009), P2Y₂ (cat. no. APR-010), and P2Y₄ (cat. no. APR-006), obtained from Alomone Labs (Jerusalem, Israel). Antibody raised against P2Y₆ 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°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 α -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 μ g peptide/1 μ g antibody to P2Y₁, P2Y₂, or P2Y₄) was used to saturate the primary antibody. Since antigen for P2Y₆ antibody was not available, we used guinea pig brain as positive control.

Immunofluorescence

Guinea pigs were deeply anaesthetized with pentobarbital sodium (35 mg kg⁻¹, 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 μ 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, P2Y₁ (cat. no. APR-009), P2Y₂ (cat. no. APR-010), P2Y₄ (cat. no. APR-006), and P2Y₆ (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 α -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 P2Y₁, P2Y₂, and P2Y₄ was used to saturate the primary antibody. In the case of P2Y₆, 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 α -actin was in green.

Drugs

ATP disodium salt, adenosine 5'-[γ -thio]triphosphate tetralithium salt, α , β -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 μ 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

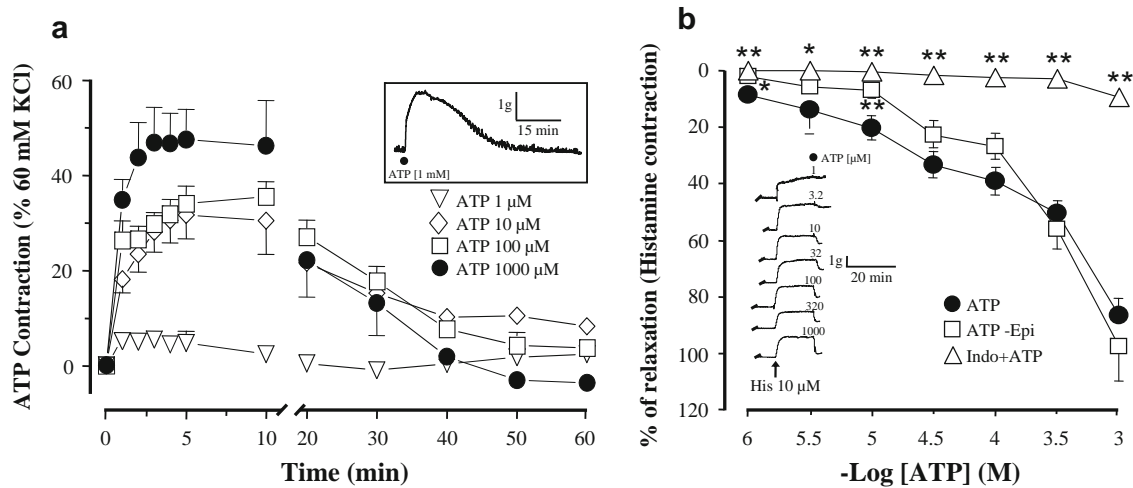


Fig. 1 Effect of ATP on the contraction–relaxation activity in guinea pig tracheal smooth muscle. **a** Time course biphasic responses of guinea pig tracheal rings to different single concentrations of ATP. These responses (contraction–relaxation) were observed at each ATP concentration used ($n=5-7$). **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 μM histamine and the effect of indomethacin (*Indo*) and epithelium (*Epi*). ATP ($n=4-9$) produced a concentration-dependent relaxation and *Indo* (1 μM , $n=5-7$) completely abolished the response to ATP from 1 to 100 μM and

1 μM indomethacin ($n=5-7$), completely prevented the effects of ATP at concentrations below 320 μM 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 μM) 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 γ 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 μM , and only the relaxation observed at 1,000 μM UTP was smaller. α,β -Methylene-ATP (a P2X agonist, $n=4$) did not produce any relaxation from 1 to 100 μM and only induced a small relaxation at 320 μM . PPADS (30 μM , P2X receptor antagonist) did not change the concentration–response curve to ATP (EC_{50} , 37.9 \pm 13.9 μM

essentially almost blocked the effect of 1,000 μM . The removal of *Epi* (*-Epi*; $n=4-8$) significantly diminished the relaxation induced by ATP but only from 1 to 10 μM , 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

vs. 26.2 \pm 5.1 μM , $n=4$). Suramin (100 and 200 μM , P2X and P2Y_{1,2,6,11,12,13} receptor antagonist, $n=4-6$) did not modify the relaxation induced by ATP. Because P2Y₄ is the only P2Y receptor with the lowest sensitivity to suramin ($IC_{50} > 1 \text{ mM}$ [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 μM , $n=5-6$), a potent antagonist ($IC_{50}=18.5 \mu\text{M}$ [33]) of P2Y₄ receptor. This antagonist significantly diminished the relaxation but only at low concentrations of ATP (1 and 3.2 μM ; Fig. 2b, c), which would indicate that another P2Y, suramin sensitive, is involved. P2Y₂ receptor is known to be resistant to RB2 ($IC_{50} > 10 \text{ mM}$ [33]) but sensitive to suramin ($IC_{50} > 8.9 \mu\text{M}$ [33]). Thus, we co-administer both drugs, which significantly reduced the effect of ATP (Fig. 2b) suggesting that P2Y₂ and P2Y₄ are essential for the ATP-induced relaxation.

Inhibition of the ectonucleotidases shifted to the left the concentration response curve to ATP (EC_{50} , 2.0 \pm 0.55 μM ($n=5$) vs. control group, 29.9 \pm 4.4 μM ; $p < 0.01$) suggesting that, under our experimental conditions, this nucleotide is enzymatically hydrolyzed by the ectonucleotidases (Fig. 2d). In the presence of ARL, 100 μM suramin plus 100 μM 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

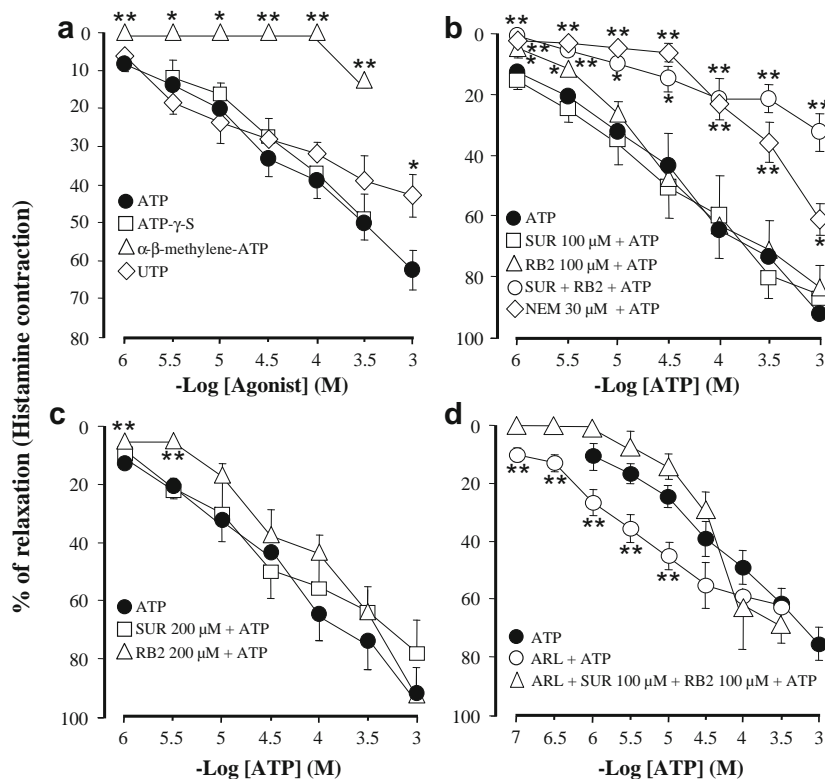


Fig. 2 The ATP-induced relaxation is mimicked by P2Y receptor agonists and inhibited by the combination of two P2Y receptor antagonists. Effect of different agonists and antagonists to ATP in guinea pig tracheal rings precontracted with 10 μ M histamine. **a** ATP γ S (non-hydrolyzable analog, $n=4-7$) and UTP (P2Y agonist, $n=5-10$) induced a relaxation response similar to ATP ($n=4-8$) from 1 to 320 μ M, and only the relaxation observed at 1,000 μ M UTP was smaller. α - β -Methylene-ATP (P2X agonist, $n=4$) did not produced any relaxation from 1 to 100 μ M and only induced a small relaxation at 320 μ M. **b** Suramin (Sur; P2X and P2Y_{1,2,6,11,12,13} receptor antagonist, $n=4-6$) and RB2 (P2Y_{1,4,6,11,12,13} 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 μ M). **d** ARL 67156 (ARL, 100 μ M, an inhibitor of ectonucleotidases) shifted to the left the concentration response curve to ATP (EC_{50} , 2.0 ± 0.55 μ M ($n=5$) vs. control group, 29.9 ± 4.4 μ M; $p < 0.01$). In the presence of ARL, 100 μ M suramin plus 100 μ M RB2, significantly inhibit ATP effects at ≤ 10 μ M, and at higher ATP concentrations, the effect of the antagonists were prevented. These results suggest that P2Y₄ and P2Y₂ 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⁺ currents in single cells

In the voltage clamp experiments with single myocytes, outward K⁺ 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 μ 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 μ 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_{1,2,6,11,12,13} receptor antagonist, 100 μ M, $n=4$) nor by RB2 (P2Y_{1,4,6,11,12,13} receptor antagonist, 100 or 200 μ M) (data not shown for 200 μ 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⁺ 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⁺ currents, which in turn were blocked by 100 nM IBX (a BK_{Ca} selective blocker), thus corroborating that they corresponded to Ca²⁺-dependent K⁺ currents ($I_{K(Ca)}$) (Fig. 5a). Furthermore, ATP addition in the

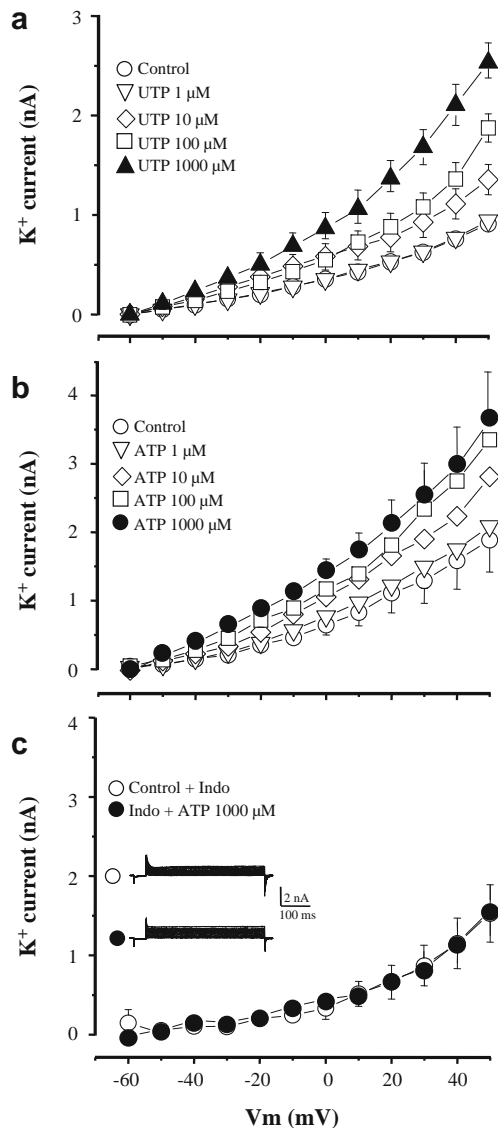


Fig. 3 UTP and ATP increase whole-cell K^+ currents (I_K), in a prostaglandin-dependent manner. Effect of different UTP and ATP concentrations on the I_K in single-airway smooth muscle cells from guinea pig and the effect of indomethacin (*Indo*). I_K were evoked by step depolarization from -60 to 50 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 $1,000 \mu\text{M}$. **c** The ATP increment in the I_K was completely abolished by *Indo* ($1 \mu\text{M}$, $n=6$), 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^+ currents. *Symbols* represent mean \pm 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 ($30 \mu\text{M}$, $n=5$) and SQ 22,536 ($100 \mu\text{M}$, $n=6$), 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_2 in the smooth

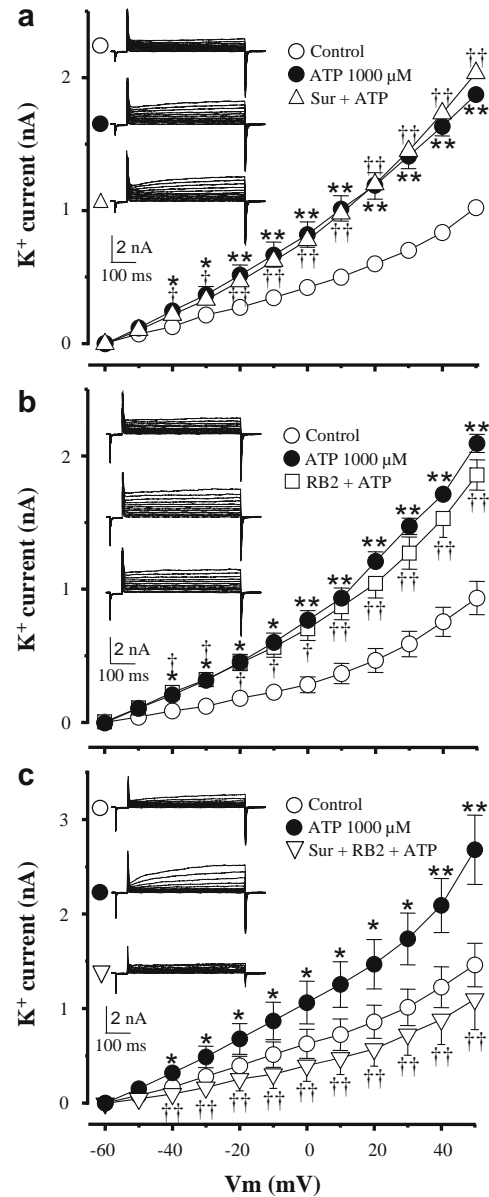


Fig. 4 The I_K increment induced by ATP was completely abolished by the combination of two P2Y receptor antagonists. Effect of suramin (*Sur*) and RB2 on the ATP-induced I_K increment in single-airway smooth muscle cells from guinea pig. I_K were evoked by step depolarization from -60 to 50 mV. ATP ($1,000 \mu\text{M}$) induced a significant increment in the I_K , this effect was not modified by suramin (P2Y_2 and $\text{P2Y}_{1,2,6,11,12,13}$ receptor antagonist, $100 \mu\text{M}$, $n=4$) nor by RB2 ($\text{P2Y}_{1,4,6,11,12,13}$ receptor antagonist, $100 \mu\text{M}$, $n=5$) (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_2 or P2Y_4 are the main purinergic receptors involved in this response. *Insets* correspond to examples of the original recordings of K^+ currents after each treatment. $*p<0.05$; $**p<0.01$ (ATP group vs. control group); $\dagger p<0.05$; $\dagger\dagger p<0.01$ (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^+ currents. *Symbols* represent mean \pm SEM

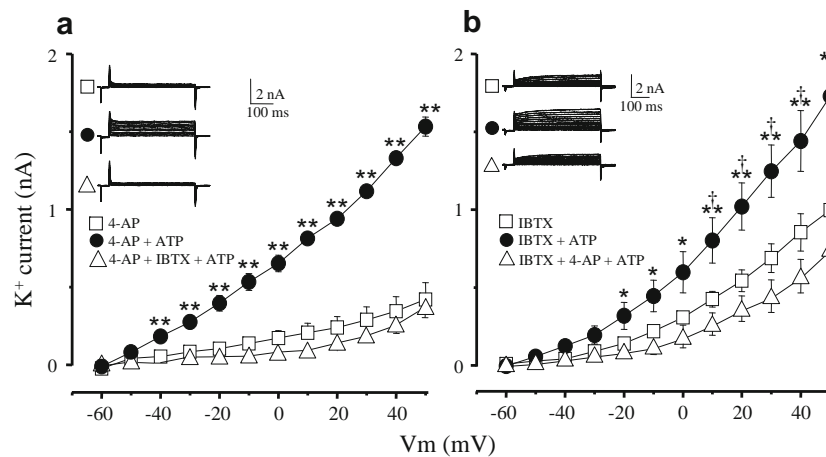


Fig. 5 The ATP-induced I_K increment is mediated at least by two types of K^+ channels. Effect of 4-aminopyridine (4-AP; a delayed rectifier K^+ channels blocker) and iberiotoxin (IBTX; a high-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels blocker) on the ATP-induced I_K increment in single tracheal smooth 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 mM), increased I_K which were blocked by IBTX (**a** $n=7$). Furthermore, ATP addition in the presence of IBTX, also increased

I_K which were blocked by 4-AP (**b** $n=6$). 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 mM 4-AP and 320 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).

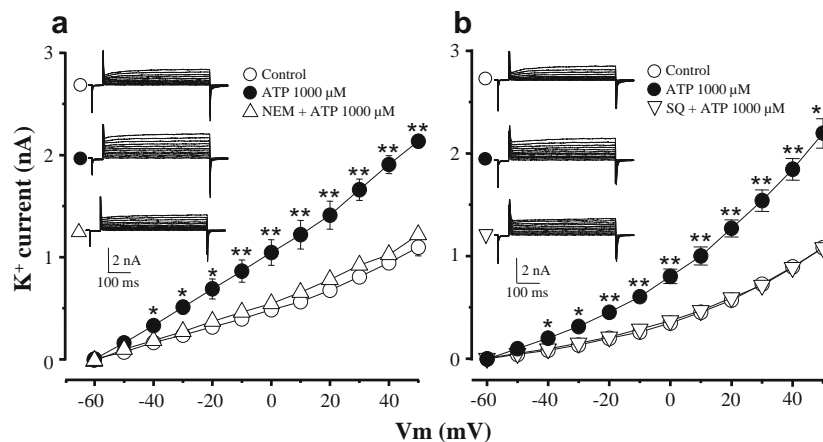


Fig. 6 G proteins and adenylyl cyclase activity are required for the ATP effect on I_K . Effect of SQ 22,536 (SQ; adenylyl cyclase inhibitor) and *N*-ethylmaleimide (NEM; which uncouples G proteins from several receptors) on the ATP-induced I_K increment in single tracheal smooth muscle cells from guinea 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 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

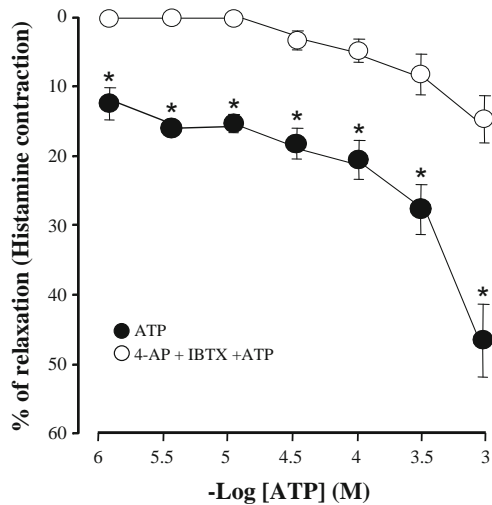


Fig. 7 The relaxation induced by ATP was inhibited by two K^+ channels antagonists. Effect of 4-aminopyridine (4-AP; 3 mM, a delayed rectifier K^+ channels blocker) and iberiotoxin (IBTX, 320 nM, a high-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels blocker) on the ATP-induced relaxation in histamine (10 μ 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

P2Y₄ and P2Y₂ 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,

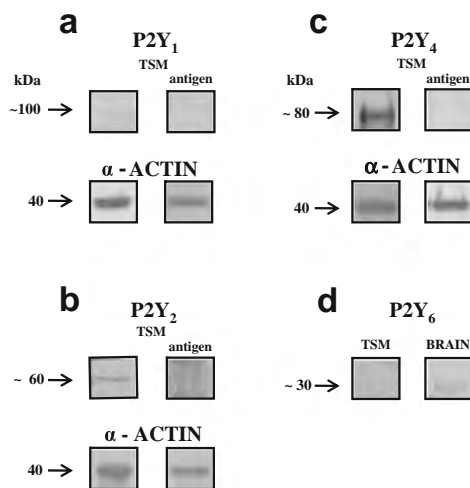


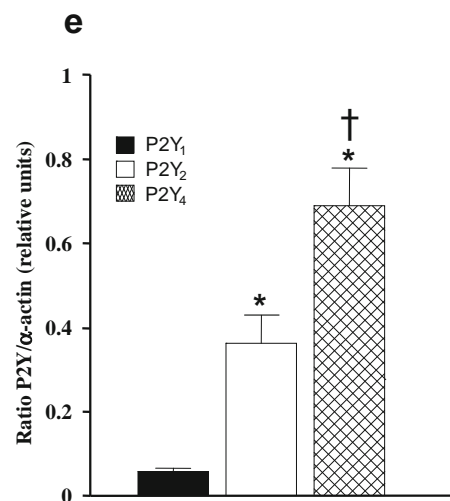
Fig. 8 P2Y₄ and P2Y₂ are the main purinergic receptor expressed in tracheal airway smooth muscle (TSM) from guinea pig. Panels a–d correspond to representative blots for P2Y₁ (~100 kDa), P2Y₂ (~60 kDa), P2Y₄ (~80 kDa), and P2Y₆ (~30 kDa), shown by an arrow. The molecular mass is expressed according to the specifications of the antibody commercial data sheets. α -Actin (40 kDa) was blotted as a control for protein load. To determine specificity of immunolab-

P2Y₄ and P2Y₂ are the main receptors found in guinea pig airway smooth muscle and the P2Y₁ receptor seems to be less expressed in this tissue, while P2Y₆ was not found (Fig. 8). We only performed Western blots experiments for P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, and P2Y₆, 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 P2Y₄ and P2Y₂ receptors in airway smooth muscle (stained red) although with less intensity for P2Y₂ receptors (Fig. 9a, e, and i). Antibody against α -actin shows fluorescence (stained green) in the bronchial smooth muscle (Fig. 9b, f, and j). Merged images show (Fig. 9d, h, and l) that P2Y₂ and P2Y₄ receptors are located in the bronchial smooth muscle. The negative control using the antigen to saturate the primary antibody to P2Y₂ and P2Y₄ receptors did not show any fluorescence (Fig. 10a, e). Antibodies against P2Y₁ and P2Y₆ 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, P2Y₄ and P2Y₂ 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 P2Y₂ and P2Y₄, mediates relaxation in the guinea pig airway smooth muscle, which



eling, the antigen was used to saturate the primary antibody. Since antigen for P2Y₆ 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 P2Y₁ receptors ($n=6$); † $p<0.01$ compared with P2Y₂ receptors ($n=4$), analysis of variance followed by Tukey's multiple comparisons test. P2Y₄ ($n=4$) and P2Y₆ ($n=6$)

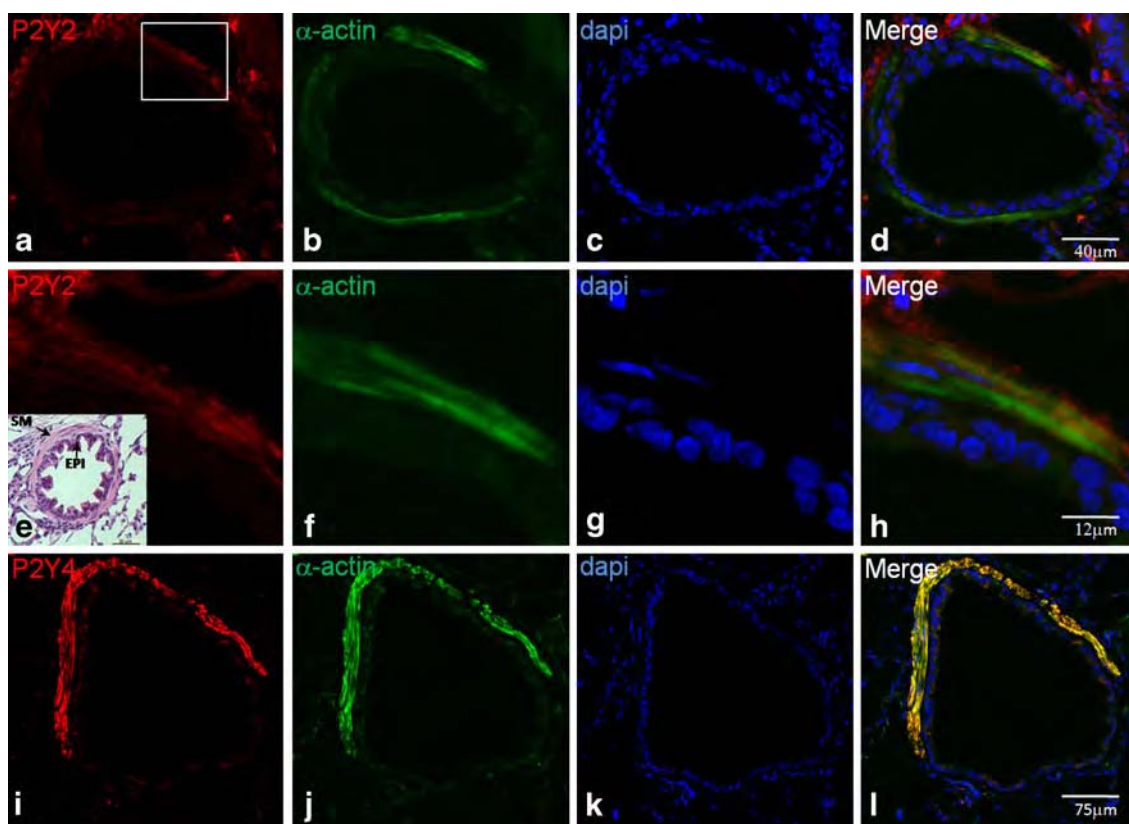


Fig. 9 Confocal microscopy for P2Y₂ and P2Y₄ receptors in guinea pig airway smooth muscle. Confocal images obtained from guinea pig lungs showed fluorescence, mainly to P2Y₂ (a) and P2Y₄ (i) receptors (stained red) although with less intensity for P2Y₂. Antibody against α -actin shows fluorescence (stained 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 P2Y₂ and P2Y₄ receptors are located in the bronchial smooth muscle. e–h Illustration of an amplified area (the square in (a)) of (a–d). c, g, and k Stained with dapi to observe the nucleus of the cells. The inset in (e) corresponds to hematoxylin–eosin staining and shows location of smooth muscle (SM) and airway epithelium (EPI)

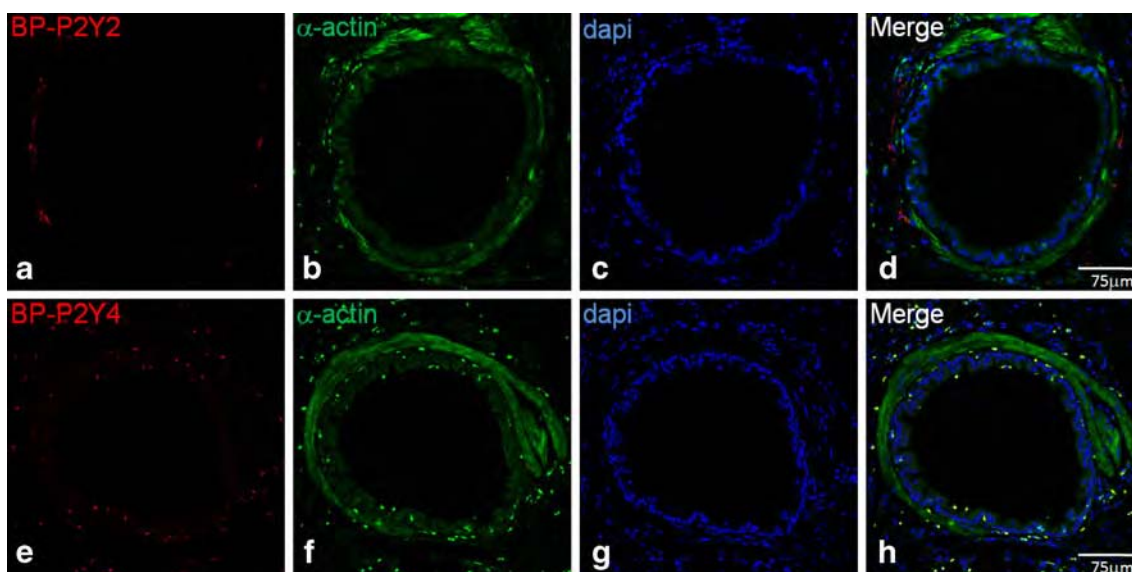


Fig. 10 Confocal images showing the negative controls using the blocking peptide (BP) to saturate the primary antibody to P2Y₂ and P2Y₄ receptors. In these images, there is no fluorescence for either of the P2Y receptors in the bronchial smooth muscle from guinea pig

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

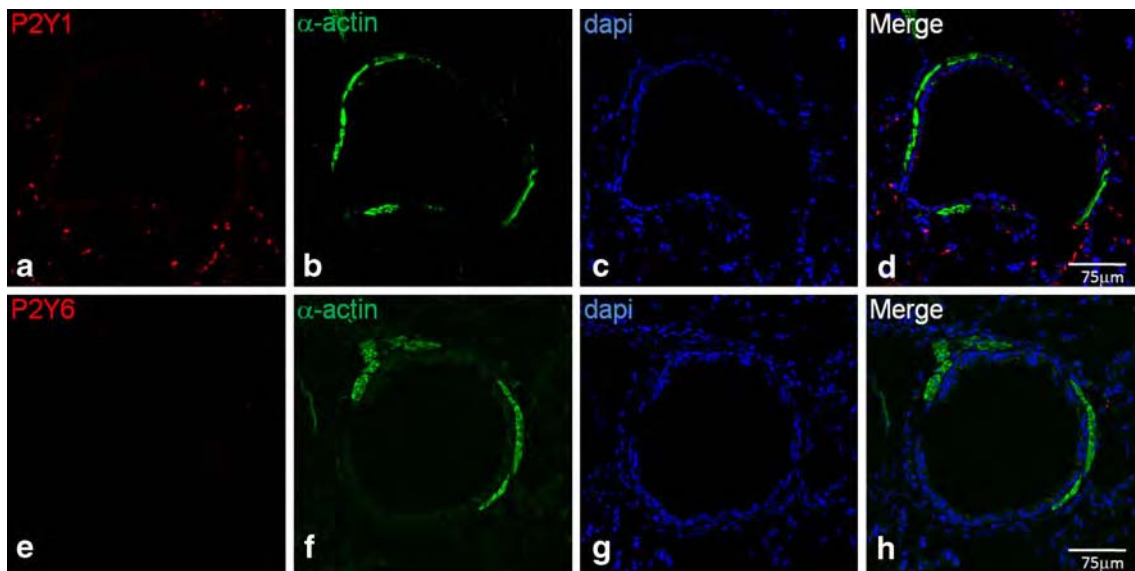


Fig. 11 Confocal microscopy for P2Y₁ and P2Y₆ receptors in guinea pig airway smooth muscle. Confocal images obtained from guinea pig lungs showed no fluorescence to P2Y₁ (a) nor for P2Y₆ (e) receptors. Antibody against α -actin shows fluorescence (stained green) in the airway smooth muscle (b, f). In (d) and (i), merged images of (a) and

(b) are shown while in (e) and (f), it is shown that P2Y₁ and P2Y₆ 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⁺ and Ca²⁺-dependent K⁺ channels. Activation of these K⁺ 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 PGE₂ 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 PGE₂. The relaxation effect of PGE₂ in airway smooth muscle has been demonstrated to be mediated by the stimulation of EP₂/EP₄ receptors producing the accumulation of cAMP and pKa-dependent phosphorylation [29].

Activation of phospholipase A₂ (PLA₂) is an obligated step for eicosanoids production (i.e., PGE₂) and it is likely that ATP modulates PLA₂ in airway smooth muscle by elevation of intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i). Two types of cytosolic PLA₂ are known to be expressed in

vascular smooth muscle cells, one Ca²⁺ independent and another Ca²⁺ dependent. The former PLA₂ is activated by cytosolic ATP through a mechanism that is independent of substrate organization and does not require participation of intermediary kinases. The Ca²⁺-dependent PLA₂ is activated by physiologic increments in [Ca²⁺]_i [18]. In a previous study, we showed that ATP, through P2 receptors, can raise [Ca²⁺]_i in airway smooth muscle cells [9], and therefore, it is likely that this effect increases prostaglandins production (PGE₂) by stimulation of Ca²⁺-dependent PLA₂. Alternatively, activation of purinoceptors in this smooth muscle might modulate the Ca²⁺ independent PLA₂ through an unknown mechanism.

Various observations would indicate that P2Y₂ and P2Y₄ are the main purinoceptors involved in the ATP-induced relaxation. First, the relaxation was mimicked by P2Y receptor agonists (UTP and ATP γ 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_{q/11} in airway smooth muscle. Therefore, when stimulated, P2Y receptors promote IP₃, initiating the signal pathway for [Ca²⁺]_i 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 P2Y₄ and the latter inhibits all P2Y receptors but has no activity on P2Y₂ [7, 30, 31, 33]. Third, the presence of P2Y₂ and P2Y₄ receptors was also demonstrated in smooth muscle cells by Western

blot and confocal microscopy. P2Y₁₁ 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 P2Y₁₁ 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 P2Y₁₂ and P2Y₁₃ 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, P2Y₁₂ and P2Y₁₃ 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 P2Y₂ and P2Y₄ 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 Phipper 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⁺ channels, which is supported by the fact that ATP-induced effect on I_K 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 Ca²⁺-activated K⁺ channels [16], whereas, 4-AP is known to block the voltage-dependent delayed rectifier K⁺ channels in airway smooth muscle [27, 34], which indicate that these channels mediate most of the effects of ATP on I_K. Previous studies in several smooth muscles, including guinea pig tracheal preparations, have reported the modulation of delayed rectifier K⁺ 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⁺ channels are through a biochemical cascade that involves

P2Y receptors, prostaglandin production (probably PGE₂), that in turns activates adenylate cyclase activity, because they were prevented by NEM, P2Y receptor blockers, indomethacin, and SQ 22,536.

ATP stimulatory effect on K⁺ channels is also likely mediated by both, P2Y₂ and P2Y₄ 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 P2Y₂ (resistant to RB2) or P2Y₄ (resistant to suramin) receptors.

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

Altogether, these data point out that in airway smooth muscle, ATP activates P2Y₂ and P2Y₄ receptors, inducing [Ca²⁺]_i increase as reported previously [9] and favoring PGE₂ release from this tissue, which in turn activates cAMP-dependent K⁺ 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 P2Y₄ and P2Y₂ receptors; (2) induces I_K increment through the activation of the delayed rectifier K⁺ channels and the high-conductance Ca²⁺-dependent potassium channels; (3) this I_K 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. Montaña.

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

References

1. Abbracchio 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) β -Adrenoceptor activation and pKa regulate delayed rectifier K⁺ 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 P₂-purinoceptors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10:230–236
4. Bergner A, Sanderson MJ (2002) ATP stimulates Ca²⁺ 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⁺ 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 P₂X smooth muscle receptors and induces contraction through P₂Y epithelial receptors. *Pflugers Arch* 461:261–275
10. Fortner CN, Breyer RM, Paul RJ (2001) EP₂ receptors mediate airway relaxation to substance P, ATP, and PGE₂. *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 E₂ 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 P₂Y₁ and P₂Y₁₁ 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 Ca²⁺-dependent K⁺ 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⁺ 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, Véo KD, Burns N, Nijmeh H, Liubchenko GA, Stenmark KR, Gerasimovskaya EV (2011) P₂Y₁ and P₂Y₁₃ purinergic receptors mediate Ca²⁺ 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 A₂ 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 P₂ purinoceptor activation. *Respir Res* 6:143
20. North RA (2002) Molecular physiology of P₂X receptors. *Physiol Rev* 82:1013–1067
21. Piper AS, Hollingsworth M (1996) ATP and β, γ-methylene ATP produce relaxation of guinea-pig isolated tracheal muscle via actions at P₁ 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 PGE₂. *J Physiol* 586:4843–4857
24. Serir K, Hayoz S, Fanchaouy M, Beny JL, Bychkov R (2006) A delayed ATP-elicited K⁺ current in freshly isolated smooth muscle cells from mouse aorta. *Br J Pharmacol* 147:45–54
25. Shapiro MS, Wollmuth LP, Hille B (1994) Modulation of Ca²⁺ 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⁺ current and three types of large conductance K⁺ channel. *Exp Physiol* 84:835–846
28. Tanaka Y, Yamashita Y, Yamaki F, Horinouchi T, Shigenobu K, Koike K (2003) MaxiK channel mediates β₂-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 E₂ 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 P₂ receptor characterisation in rat distal colon. *Neuropharmacology* 53:257–271
31. von Kugelgen I (2006) Pharmacological profiles of cloned mammalian P₂Y-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 P₂Y₁₂ 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 P₂Y₂ and rat P₂Y₄ receptors and their sensitivity to extracellular H⁺ and Zn²⁺ 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



Pulmonary, Gastrointestinal and Urogenital Pharmacology

PPADS, a P2X receptor antagonist, as a novel inhibitor of the reverse mode of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in guinea pig airway smooth muscleEdgar Flores-Soto ^a, Jorge Reyes-García ^a, Bettina Sommer ^b, Jaime Chavez ^b, Carlos Barajas-López ^c, Luis M. Montaña ^{a,*}^a Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, Mexico^b Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México DF, Mexico^c División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, SLP, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 August 2011

Received in revised form 31 October 2011

Accepted 4 November 2011

Available online 19 November 2011

Keywords:

PPADS

KB-R7943

Airway smooth muscle

 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger

ABSTRACT

The $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) principal function is taking 1 Ca^{2+} out of the cytoplasm and introducing 3 Na^+ . The increase of cytoplasmic Na^+ concentration induces the NCX reverse mode (NCX_{REV}), favoring Ca^{2+} influx. NCX_{REV} can be inhibited by: KB-R7943 a non-specific compound that blocks voltage-dependent and store-operated Ca^{2+} channels; SEA0400 that appears to be selective for NCX_{REV}, but difficult to obtain and SN-6, which efficacy has been shown only in cardiomyocytes. We found that PPADS, a P2X receptor antagonist, acts as a NCX_{REV} inhibitor in guinea pig tracheal myocytes. In these cells, we characterized the NCX_{REV} by substituting NaCl and NaHCO_3 with LiCl, resulting in the increase of the intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) using fura 2-AM. We analyzed 5 consecutive responses of the NCX_{REV} every 10 min, finding no differences among them. To evaluate the effect of different NCX_{REV} blockers, concentration response curves to KB-R7943 (1, 3.2 and 10 μM), and SN-6 (3.2, 10 and 30 μM) were constructed, whereas PPADS effect was characterized as time- and concentration-dependent (1, 3.2, 10 and 30 μM). PPADS had similar potency and efficacy as KB-R7943, whereas SN-6 was the least effective. Furthermore, KCl-induced contraction, sensitive to D600 and nifedipine, was blocked by KB-R7943, but not by PPADS. KCl-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increment in myocytes was also significantly decreased by KBR-7943 (10 μM). Our results demonstrate that PPADS can be used as a reliable pharmacological tool to inhibit NCX_{REV}, with the advantage that it is more specific than KB-R7943 because it does not affect L-type Ca^{2+} channels.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ca^{2+} has been recognized as the main cation modulating diverse cellular activities, i.e. exocytosis, transcription, proliferation, growth and smooth muscle contraction (Berridge et al., 2003). The principal Ca^{2+} sources are extracellular fluid and the intracellular store of the sarcoplasmic reticulum. Extracellular Ca^{2+} is known to enter the smooth muscle cells mainly through membrane L-type voltage dependent calcium channels and intracellular Ca^{2+} is released from the sarcoplasmic reticulum after IP_3 and ryanodine receptor stimulation. Intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) is promptly regulated by many Ca^{2+} handling proteins. One of these molecules is the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) (Floyd and Wray, 2007), that, in its forward mode extrudes Ca^{2+} out of the subplasmalemmal space; this activity seems strictly dependent on the intracellular Na^+ concentration

($[\text{Na}^+]_i$). Hence, any increase in $[\text{Na}^+]_i$ within the so called subplasmalemmal space decreases Ca^{2+} efflux and under such circumstances, the NCX activity changes into reverse mode (NCX_{REV}). When in this mode, this exchanger extrudes Na^+ and allows Ca^{2+} influx from the extracellular space into the cytosol (DiPolo and Beauge, 2006). Several isoforms of NCX have been found in different tissues, NCX1, NCX2 and NCX3 (DiPolo and Beauge, 2006), and in airway smooth muscle, NCX1 has been reported to be the main isoform (Mejia-Elizondo et al., 2002). There are useful experimental methods to induce the NCX_{REV} in airway smooth muscle, for instance, the removal of extracellular Na^+ and its millimolar equivalent substitution with lithium chloride, choline chloride or N-methyl-D-glucamine (Bazan-Perkins et al., 2000; Flores-Soto et al., 2011; Romero-Mendez et al., 2009). There are few inhibitors of the NCX_{REV} and 2-[2-[4-(4-Nitrobenzyloxy)phenyl]ethyl]isothiourea mesylate (KB-R7943) is the most frequently used (Hoyt et al., 1998; Lu et al., 2002). However, some authors reported that KB-R7943 appears to act also on other membrane proteins such as: neuronal nicotinic receptors, N-methyl-D-aspartate receptors, norepinephrine transporters, store operated Ca^{2+} channels and L-type voltage dependent Ca^{2+} channels (Birinyi et al., 2005; Tanaka et al., 2002). In the present

* Corresponding author at: Departamento de Farmacología, Edificio de Investigación, sexto piso, laboratorio de Investigación en Asma, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CP 04510, México DF, Mexico. Tel./fax: + 52 55 56232280.

E-mail address: lmmt@servidor.unam.mx (L.M. Montaña).

study, we explore the use of pyridoxal phosphate-6-azo(benzene-2,4-disulfonic acid) (PPADS), widely considered as a P2 purinoceptor antagonist (Barajas-Lopez et al., 2000; Lambrecht et al., 1992), as a novel NCX_{REV} blocker. Our results show that PPADS is as potent as KB-R7943 to inhibit NCX_{REV} in guinea pig airway smooth muscle cells and it may represent a new lead substance for the synthesis of more potent and specific inhibitors of the NCX_{REV}.

2. Materials and methods

2.1. Experimental animals

Male Hartley guinea pigs (400–600 g) bred in conventional conditions in our institutional animal facilities (filtered conditioned air, 21 ± 1 °C, 50–70% humidity, 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.

2.2. Intracellular Ca²⁺ measurements in tracheal myocytes

Isolated myocytes from guinea pig trachea were obtained as follows. Tracheal smooth muscle freed from any residual connective tissue was placed in 5 ml Hanks solution containing 2 mg cysteine and 0.04 U/ml papaine, pH (7.4) was adjusted with 1 M NaHCO₃, and incubated for 10 min at 37 °C. The tissue was washed with Leibovitz's solution to remove the enzyme excess, and then placed in Hanks solution containing 1 mg/ml collagenase type I and 0.5 mg/ml protease during ~10 min at 37 °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 600 rpm and 20 °C during 5 min then the supernatant was discarded. This last step was repeated once.

Cells were loaded with 2.5 μM fura 2-AM in low Ca²⁺ (0.1 mM) at room temperature (~21 °C). After 1 h, cells were allowed to settle down into a heated perfusion chamber with a glass cover in the bottom. This chamber was mounted on an inverted microscope (Diaphot 200, Nikon, Tokyo, Japan) and cells adhered to the glass were continuously perfused at a rate of 2–2.5 ml/min with Krebs solution at 37 °C, bubbled with 5% CO₂ in oxygen, pH 7.4.

Cells loaded with fura 2-AM were exposed to alternating pulses of 340 and 380 nm excitation light, and emission light was collected at 510 nm using a microphotometer from Photon Technology International model D-104 (PTI, Princeton, NJ, USA). The fluorescence acquisition rate was 0.5 s. [Ca²⁺]_i was calculated according to the formula by Grynkiewicz (Grynkiewicz et al., 1985). The K_d of fura 2-AM was assumed to be 386 nM (Kajita and Yamaguchi, 1993). The mean 340/380 fluorescence ratios R_{max} and R_{min} were obtained as previously reported (Carbajal et al., 2005).

NCX_{REV} in guinea pig tracheal myocytes was induced by the substitution of NaCl and NaHCO₃ (146 mM) with LiCl. When myocytes were stimulated with the LiCl substituted Krebs, an increase in the [Ca²⁺]_i was observed (Flores-Soto et al., 2011). Under these conditions, myocytes were incubated during 5 min with 2-[2-[4-(4-nitrobenzyloxy)phenyl]ethyl] isothiourrea mesylate (KB-R7943, NCX_{REV} blocker, 1, 3.2, 10 μM, n = 5), pyridoxal phosphate-6-azo(benzene-2,4-disulfonic acid) tetrasodium salt, (PPADS, P2X receptor antagonist, 1, 3.2, 10, 30 μM, n = 5) or 2-[4-[(4-Nitrophenyl)methoxy]phenyl]methyl]-4-thiazolidinecarboxylic acid ethyl ester (SN-6, NCX_{REV} blocker, 3.2, 10, 30 μM, n = 5). Some cells were incubated with caffeine (10 mM) or 3,4,5-trimethoxybenzoic acid 8-(diethylamino) octyl ester (TMB-8, an antagonist of IP₃-mediated Ca²⁺ release, 50 μM). To corroborate the reversibility of the NCX_{REV} response at the end of the experiments, 15 min

after washing with normal Krebs, cells were perfused again with LiCl solution.

In another set of experiments, myocytes were stimulated with 60 mM KCl and then incubated with either PPADS (30 μM, n = 4) or KB-R7943 (10 μM, n = 4) and stimulated again with KCl three times. Cell viability was confirmed by a fifth KCl stimulation without PPADS or KB-R7943. Control cells received KCl stimulation only.

2.3. Organ baths

Animals were deeply anesthetized with pentobarbital sodium (35 mg/Kg, i.p.) and exsanguinated. Tracheas were dissected and cleaned of connective tissue; eight rings were obtained and each one was hung in a 5 ml organ bath filled with Krebs solution (in mM): 118 NaCl, 25 NaHCO₃, 4.6 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 11 glucose, and 2 CaCl₂. Preparations were maintained at 37 °C and bubbled with 5% CO₂ in oxygen at pH 7.4. Indomethacin 1 μM was present in Krebs solution throughout the experiments to inhibit prostanooids formation. The 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-to-digital interface (Digidata 1440A; Axon). 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) to stabilize the contractile responses. Different groups of tissues were preincubated with PPADS (30 μM, n = 4) or KB-R7943 (10 μM, n = 4), while the control group received no treatment. During incubation, all tissues were stimulated four times with KCl. All responses were expressed as percentage of the third KCl response.

2.4. Drugs and chemicals

Pyridoxal phosphate-6-azo(benzene-2,4-disulfonic acid) tetrasodium salt (PPADS), indomethacin, nifedipine, D-600, caffeine, 3,4,5-trimethoxybenzoic acid 8-(diethylamino)octyl ester (TMB-8) and LiCl were all purchased from Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA). 2-[2-[4-(4-nitrobenzyloxy)phenyl]ethyl]isothiourrea mesylate (KB-R7943) and 2-[4-[(4-Nitrophenyl)methoxy]phenyl]methyl]-4-thiazolidinecarboxylic acid ethyl ester (SN-6) were purchased from Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA).

2.5. Statistical analysis

Differences in the response of tracheal rings and single cells [Ca²⁺]_i were evaluated through repeated measures analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test. In some experiments we used the paired Student's *t* test. Statistical significance was set at two-tailed P < 0.05. Data are expressed in the text and illustrations as mean ± S.E.M. For single cell experiments, n corresponds to the number of cells and only one experiment was performed per animal.

3. Results

3.1. NCX_{REV} activity is reproducible and inhibited by KB-R7943

NCX_{REV} in guinea pig tracheal myocytes was induced by the substitution of NaCl and NaHCO₃ with LiCl. When myocytes were stimulated with the LiCl substituted Krebs, an increase in the [Ca²⁺]_i was observed (280 ± 24 nM, n = 18); five successive LiCl stimulations, every 10 min, showed a similar [Ca²⁺]_i increment, with small variations that were not statistically different (Fig. 1). This [Ca²⁺]_i increment was blocked, in a concentration-dependent manner, by KB-R7943 (a well known NCX_{REV} inhibitor), with an IC₅₀ of 2.16 ±

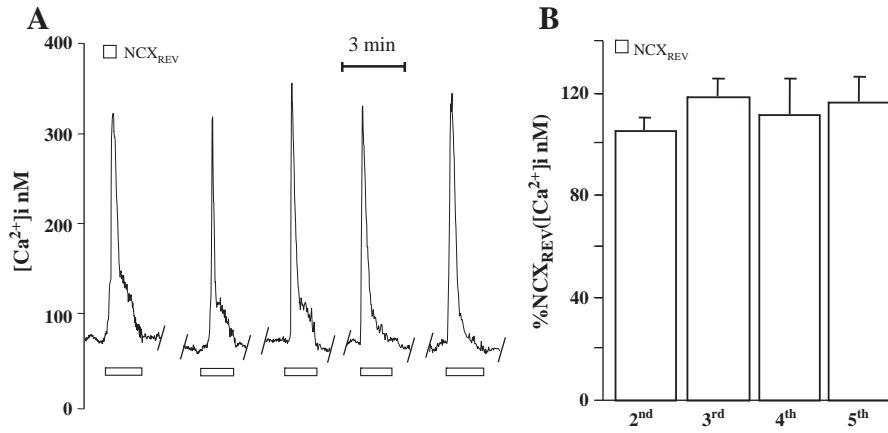


Fig. 1. Repeated activation of the NCX_{REV} induces reproducible $[Ca^{2+}]_i$ transients in tracheal myocytes, that last for 1–2 min, returning then to baseline $[Ca^{2+}]_i$ levels. (A) Original recordings showing $[Ca^{2+}]_i$ increment induced by the reverse mode of the Na^+/Ca^{2+} exchanger (NCX_{REV}) produced by substitution of $NaCl$ and $NaHCO_3$ (146 mM) with $LiCl$. (B) Statistical analysis of the previous results show that $LiCl$ induced responses are similar in five consecutive stimulations as shown by the repeated measures analysis of variance followed by Dunnett comparison test. Bars represent mean relative values expressed as a percentage of the first response \pm S.E.M., ($n = 5$).

0.18 μM ($n = 5$; Fig. 2A), observing the maximal effect ($97.5 \pm 1.2\%$) with 10 μM . This effect was tested to be partially reversible 15 min after washing out this substance. SN-6, another NCX_{REV} inhibitor in cardiac myocytes (Kita and Iwamoto, 2007), had a marginal inhibitory effect ($18.8 \pm 3.4\%$) that was only observed at the maximal concentration used (30 μM ; Fig. 2B). This small effect was reversible after 15 min of wash out.

3.2. Effect of PPADS on the NCX_{REV}

When we were investigating the effects of PPADS as a blocker of the P2X receptors (Flores-Soto et al., 2011), we noticed that it actually

inhibited NCX_{REV} , therefore we decided to characterize this action in the present study. PPADS did not alter the basal $[Ca^{2+}]_i$ in the myocytes, but the inhibition of the NCX_{REV} was time- and concentration-dependent (Fig. 3A–F). Maximal effects were observed 50 min after PPADS addition at concentrations $\leq 10 \mu M$. However, for 30 μM , the maximal effect was observed 20 min after the exposure. The IC_{50} ($2.44 \pm 0.88 \mu M$, $n = 4$) for this PPADS effect was similar to that observed for KB-R7943 ($2.16 \pm 0.18 \mu M$). The PPADS effect was partially reversible after 15 min of wash out. We also tested the effect of suramin (100 μM ; another P2X receptor antagonist) on the NCX_{REV} . We found that this drug did not change the transient Ca^{2+} peak induced by the NCX_{REV} (control, 257 ± 50 nM vs suramin, 290 ± 56 nM, $n = 4$).

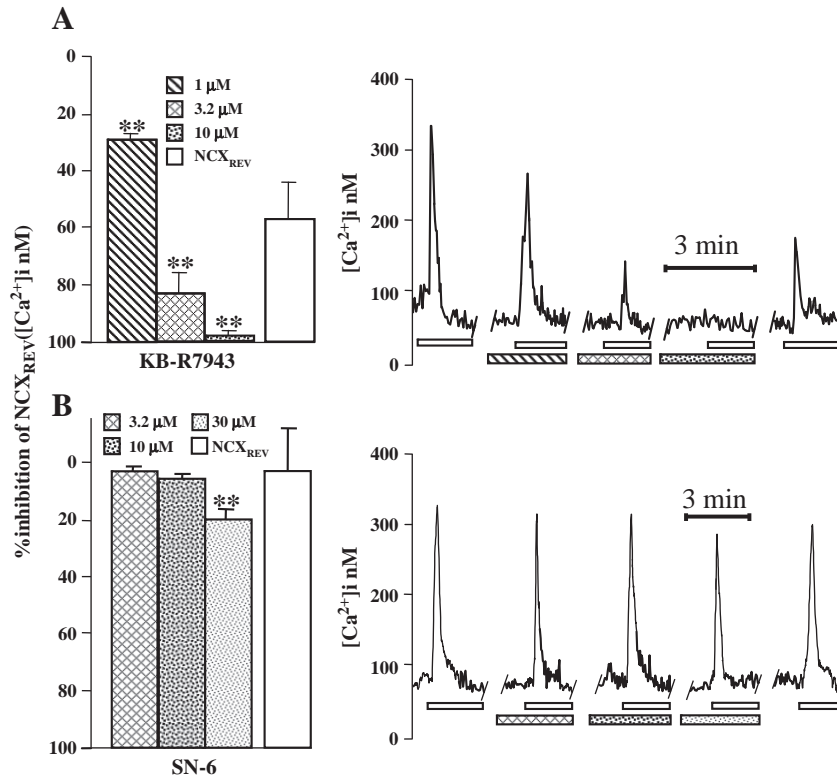


Fig. 2. KB-R7943 and SN-6 block the reverse mode of the Na^+/Ca^{2+} exchanger (NCX_{REV}) in guinea pig tracheal myocytes. Effect of the concentration–response curves to (A) KB-R7943, and (B) SN-6 on the $[Ca^{2+}]_i$ increment induced by NCX_{REV} . Corresponding representative original recordings are shown on the right panels. These results indicate that KB-R7943 is an effective NCX_{REV} blocker, while SN-6 is not. Bars represent mean \pm S.E.M. $**P < 0.01$ when means are compared with their respective control group. Repeated measures analysis of variance followed by Dunnett comparison test were used.

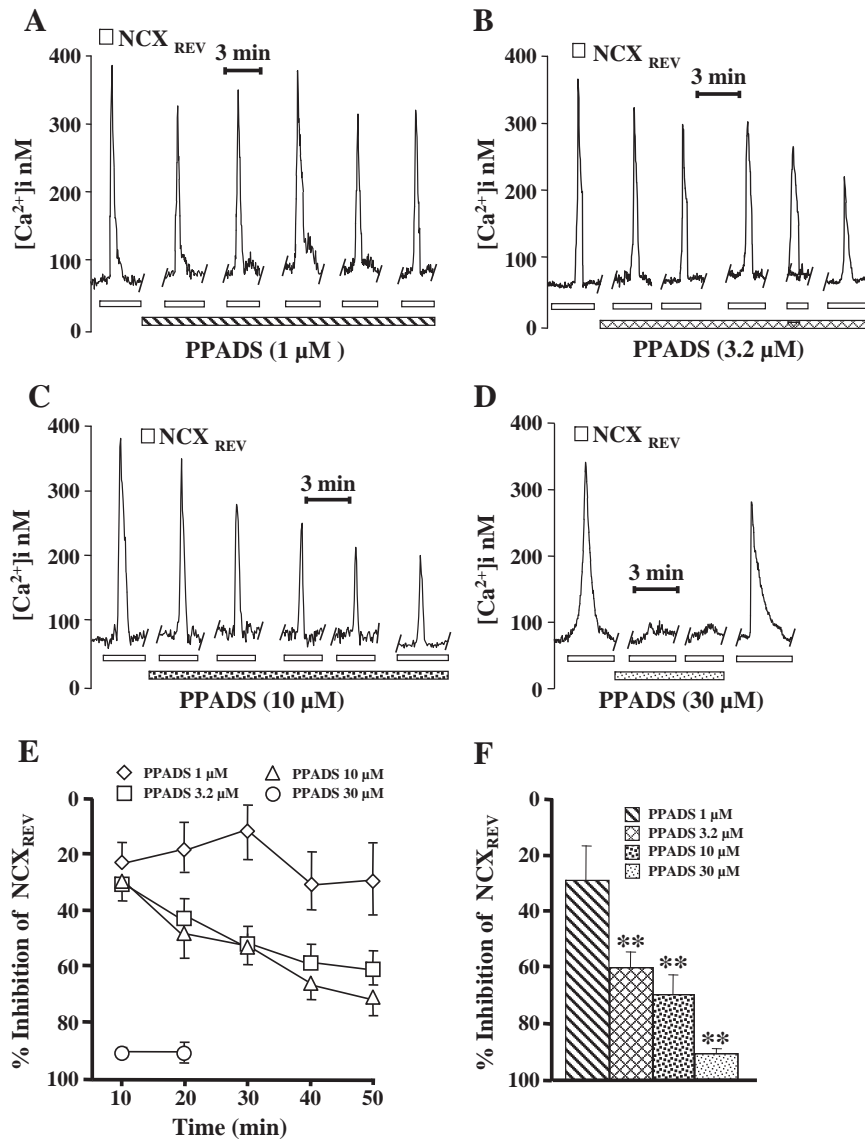


Fig. 3. PPADS inhibits NCX_{REV} in a concentration- and time-dependent manner. (A–D) correspond to original recordings from different PPADS concentrations added to tracheal myocytes. The responses to NCX_{REV} were obtained before or in the continuous presence of PPADS, every ten minutes. (E) Average data from experiments as those showed in A, B, C and D, illustrating the concentration and time dependent PPADS effect. (F) Average data of the maximal NCX_{REV} inhibitory response induced by different PPADS concentrations. Symbols and bars represent mean \pm S.E.M. ** $P < 0.01$ when means were compared with its own control group. Paired Student *t* test was used.

In control experiments we showed that PPADS did not modify the $[Ca^{2+}]_i$ increment induced by 10 mM caffeine (control, 292 ± 60 nM vs PPADS 287 ± 42 nM, $n = 4$). Furthermore, 3,4,5-trimethoxybenzoic acid 8-(diethylamino) octyl ester (TMB-8, 50 μ M), an antagonist of IP₃-mediated Ca²⁺ release (Wu et al., 2002), did not modify the transient Ca²⁺ peak induced by the NCX_{REV} (control, 328 ± 55 nM vs TMB-8, 320 ± 55 nM, $n = 5$). With these results, we corroborated, that the effect of PPADS on the NCX_{REV} is not related to the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content.

3.3. KB-R7943 but not PPADS inhibits L type Ca²⁺ channels in tracheal myocytes

In cardiomyocytes, it has been reported that KB-R7943 blocks L-type Ca²⁺ channels (Birinyi et al., 2005; Tanaka et al., 2002). Here, we tested that, in the guinea pig airway smooth muscle, this effect is also present, because KB-R7943 significantly reduced the KCl induced contractions in a time dependent manner (Fig. 4C, D) and significantly diminished the KCl induced $[Ca^{2+}]_i$ increase (Fig. 5B, D). We also investigated whether or not PPADS has similar inhibitory effects on L-type Ca²⁺ channels.

However, PPADS had no effect on any of these responses, demonstrating that it does not interfere with these channels in this tissue (Figs. 4B, D and 5C, D). In control experiments, we corroborated that KCl-induced contraction and $[Ca^{2+}]_i$ increase did not change during successive stimulations (Figs. 4A, D and 5A, D).

4. Discussion

The present results show that PPADS is an efficient inhibitor of the NCX_{REV} in airway myocytes, because it significantly diminishes $[Ca^{2+}]_i$ increases induced by the activation of NCX_{REV}, with similar potency and efficacy as KB-R7943. Additionally, PPADS shows to be more specific on NCX_{REV} than KB-R7943 because the former substance does not inhibit L-type Ca²⁺ channels as KB-R7943, indicating that PPADS might be a lead substance to synthesize more specific inhibitors.

Various pharmacological effects have been described for PPADS, being the most important as a potent antagonist of P2 receptors (McLaren et al., 1994). However, purinoceptors cannot mediate the PPADS effect on the NCX_{REV} described herein, since suramin does not modify the NCX_{REV} activity.

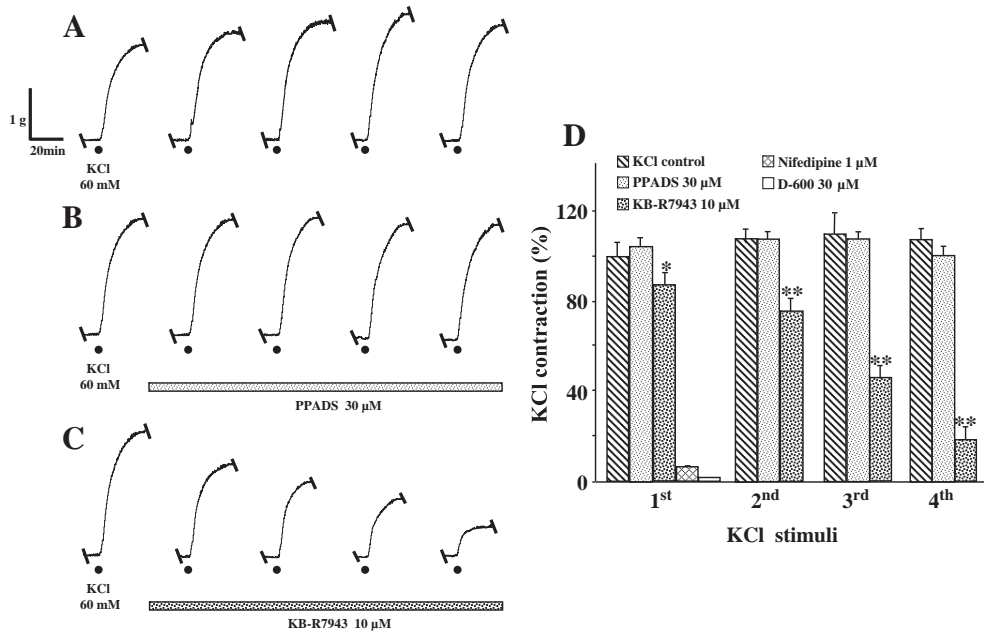


Fig. 4. KB-R7943 but not PPADS inhibits in a time-dependent manner the successive KCl-induced contractions in guinea pig tracheal rings. (A) Original traces showing time control responses. (B) KCl responses in the presence of PPADS or (C) KB-R7943. (D) Average data from experiments as those showed in A, B and C. In this figure we included results from experiments with nifedipine and D-600. These findings indicate that PPADS has no effect on L-type voltage dependent Ca^{2+} channels, as KB-R7943 does. We corroborated that this inhibition corresponds to the blockade of L-type Ca^{2+} channels because nifedipine and D-600 abolished the KCl induced contraction. Bars represent mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ when means were compared with the KCl group. Repeated measures analysis of variance followed by Dunnett comparison test were used.

A possible explanation to the findings reported here could be related to the three NCX isoforms: NCX1, NCX2 and NCX3. NCX2 and NCX3 expressions are mainly restricted to the brain and skeletal muscle, while the NCX1 is more widely expressed in almost all tissues (Blaustein and Lederer, 1999). NCX1 has been reported to present at least 12 splice variants that influence ionic sensitivity and NCX

regulation (Quednau et al., 1997). NCX1.1 has been found in the heart and NCX1.3 in the kidney and tracheal smooth muscle (Mejia-Elizondo et al., 2002; Philipson et al., 2002). Although it has been published that KB-R7943 mainly blocks isotype NCX3, it still acts upon NCX1 (Iwamoto and Shigekawa, 1998), explaining therefore its effect on airway smooth muscle. Regarding SN-6, a well known inhibitor of

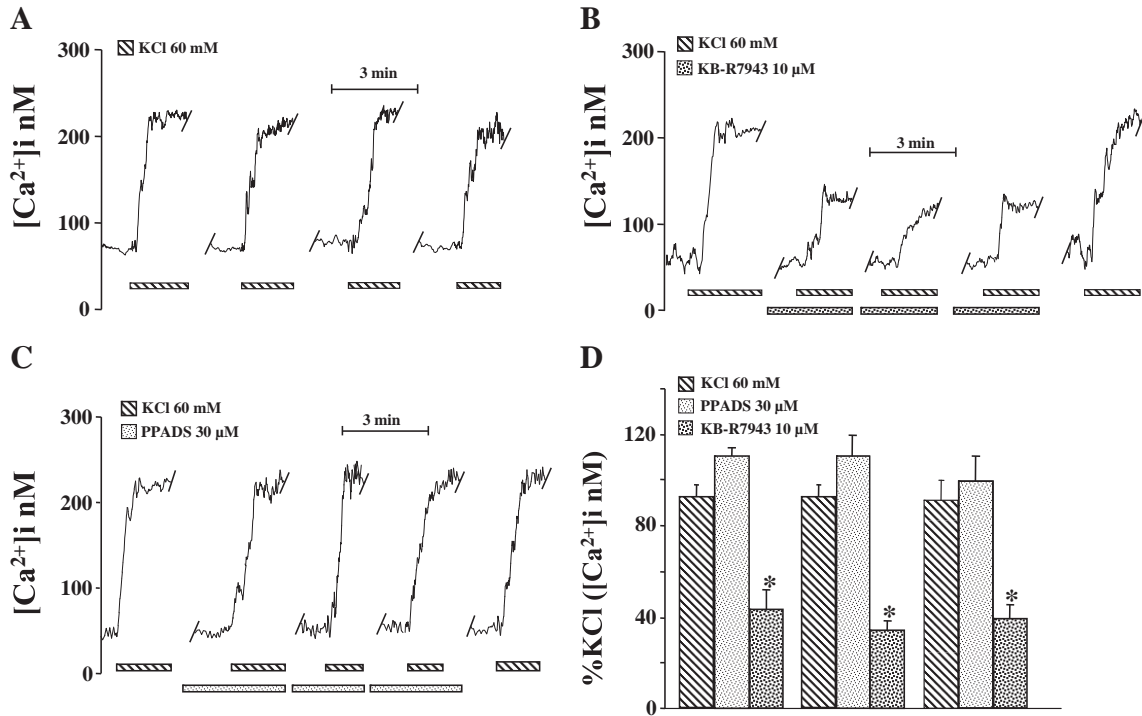


Fig. 5. KB-R7943, but not PPADS diminished successive KCl induced $[Ca^{2+}]_i$ increment in single guinea pig tracheal myocytes. (A) Original traces showing time control responses to KCl. Effect of KB-R7943 (B) and PPADS (C) on $[Ca^{2+}]_i$ increase induced by KCl. (D) Average data from experiments as those showed in A, B and C. Results show that KB-R7943 blocks L-type Ca^{2+} channels, while PPADS does not. Bars represent mean \pm S.E.M. * $P < 0.01$, when means were compared with the KCl group. One-way analysis of variance followed by Dunnett comparison test were used.

NCX_{REV}, extensive work carried out mainly in cardiomyocytes has shown its efficacy (Kita and Iwamoto, 2007; Niu et al., 2007). However, in tracheal myocytes the efficacy of this blocker is quite low as it only slightly diminished the NCX_{REV} at the highest concentration used. It has been shown that cardiomyocytes and airway smooth muscle express different NCX1: NCX1.1 and NCX1.3, respectively (Mejia-Elizondo et al., 2002; Philipson et al., 2002). Therefore, a simple explanation for the low efficacy of SN-6 found here is that the NCX1.3 present in airway smooth muscle has a lower sensitivity to this inhibitor than NCX1.1. Thus, PPADS effect on NCX_{REV} in airway smooth muscle might involve NCX1.3 splice variant. Further studies are needed to explore PPADS actions on NCX isoforms.

There are few available drugs that can inhibit NCX_{REV} and KB-R7943 is likely the most frequent inhibitor used. However, it is known that this substance also affects other proteins directly involved in the modulation of the $[Ca^{2+}]_i$. Thus, KB-R7943 blocks L-type Ca^{2+} currents in ventricular myocytes of different species (Birinyi et al., 2005; Tanaka et al., 2002). The experimental evidence presented herein indicates that this effect is also present in guinea pig tracheal myocytes, because KB-R7943 inhibited the muscle contraction and the raise in $[Ca^{2+}]_i$ induced by a high concentration of extracellular KCl. Another known NCX reverse mode inhibitor is SEA0400 (Tanaka et al., 2002), but unfortunately, this product is only available in Japan.

In regard to the chemical structure, the most used NCX_{REV} inhibitors, KB-R7943, SEA0400 and SN-6, belong to the family of benzyloxyphenyl derivatives (Iwamoto, 2004). Because PPADS does not belong to this chemical group, its chemical structure could be used as a model to explore new NCX_{REV} inhibitors with higher potency and efficacy.

Our results reveal that PPADS is a novel and useful tool to block the NCX_{REV} in airway smooth muscle without affecting L-type Ca^{2+} channels, as long as purinergic receptors are not being studied. These PPADS properties might allow the further study on the NCX_{REV} physiological role in airway smooth muscle.

Acknowledgments

We acknowledge the Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Medicina, UNAM, and CONACYT for the scholarship to Jorge Reyes. This study was partly supported by a grant from CONACYT (81409) and DGAPA-UNAM (IN201810-3) to Dr. Luis M Montaño.

References

- Barajas-Lopez, C., Espinosa-Luna, R., Christofi, F.L., 2000. Changes in intracellular Ca^{2+} by activation of P2 receptors in submucosal neurons in short-term cultures. *Eur. J. Pharmacol.* 409, 243–257.
- Bazan-Perkins, B., Sanchez-Guerrero, E., Carbajal, V., Barajas-Lopez, C., Montano, L.M., 2000. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} depletion by caffeine and changes of $[Ca^{2+}]_i$ during refilling in bovine airway smooth muscle cells. *Arch. Med. Res.* 31, 558–563.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 517–529.

- Birinyi, P., Acsai, K., Banyasz, T., Toth, A., Horvath, B., Virag, L., Szentandrássy, N., Magyar, J., Varro, A., Fulop, F., Nanasi, P.P., 2005. Effects of SEA0400 and KB-R7943 on Na^+ / Ca^{2+} exchange current and L-type Ca^{2+} current in canine ventricular cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 372, 63–70.
- Blaustein, M.P., Lederer, W.J., 1999. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol. Rev.* 79, 763–854.
- Carbajal, V., Vargas, M.H., Flores-Soto, E., Martínez-Cordero, E., Bazan-Perkins, B., Montano, L.M., 2005. LTD₄ induces hyperresponsiveness to histamine in bovine airway smooth muscle: role of SR-ATPase Ca^{2+} pump and tyrosine kinase. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 288, L84–L92.
- DiPolo, R., Beauge, L., 2006. Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions. *Physiol. Rev.* 86, 155–203.
- Flores-Soto, E., Carbajal, V., Reyes-García, J., García-Hernández, L.M., Figueroa, A., Checa, M., Barajas-Lopez, C., Montano, L.M., 2011. In airways ATP refills sarcoplasmic reticulum via P2X smooth muscle receptors and induces contraction through P2Y epithelial receptors. *Pflugers Arch.* 461, 261–275.
- Floyd, R., Wray, S., 2007. Calcium transporters and signalling in smooth muscles. *Cell Calcium* 42, 467–476.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440–3450.
- Hoyt, K.R., Arden, S.R., Aizenman, E., Reynolds, I.J., 1998. Reverse Na^+ / Ca^{2+} exchange contributes to glutamate-induced intracellular Ca^{2+} concentration increases in cultured rat forebrain neurons. *Mol. Pharmacol.* 53, 742–749.
- Iwamoto, T., 2004. Forefront of Na^+ / Ca^{2+} exchanger studies: molecular pharmacology of Na^+ / Ca^{2+} exchange inhibitors. *J. Pharmacol. Sci.* 96, 27–32.
- Iwamoto, T., Shigekawa, M., 1998. Differential inhibition of Na^+ / Ca^{2+} exchanger isoforms by divalent cations and isothiourea derivative. *Am. J. Physiol.* 275, C423–C430.
- Kajita, J., Yamaguchi, H., 1993. Calcium mobilization by muscarinic cholinergic stimulation in bovine single airway smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 264, L496–L503.
- Kita, S., Iwamoto, T., 2007. Inhibitory mechanism of SN-6, a novel benzyloxyphenyl Na^+ / Ca^{2+} exchange inhibitor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1099, 529–533.
- Lambrecht, G., Friebe, T., Grimm, U., Windscheif, U., Bungardt, E., Hildebrandt, C., Baumert, H.G., Spatz-Kumbel, G., Mutschler, E., 1992. PPADS, a novel functionally selective antagonist of P2 purinoceptor-mediated responses. *Eur. J. Pharmacol.* 217, 217–219.
- Lu, J., Liang, Y., Wang, X., 2002. Amiloride and KB-R7943 in outward Na^+ / Ca^{2+} exchange current in guinea pig ventricular myocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 40, 106–111.
- McLaren, G.J., Lambrecht, G., Mutschler, E., Baumert, H.G., Sneddon, P., Kennedy, C., 1994. Investigation of the actions of PPADS, a novel P2x-purinoceptor antagonist, in the guinea-pig isolated vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 111, 913–917.
- Mejia-Elizondo, R., Espinosa-Tanguma, R., Saavedra-Alanis, V.M., 2002. Molecular identification of the NCX isoform expressed in tracheal smooth muscle of guinea pig. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 976, 73–76.
- Niu, C.F., Watanabe, Y., Iwamoto, T., Yamashita, K., Satoh, H., Urushida, T., Hayashi, H., Kimura, J., 2007. Electrophysiological effects of SN-6, a novel Na^+ / Ca^{2+} exchange inhibitor on membrane currents in guinea pig ventricular myocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1099, 534–539.
- Philipson, K.D., Nicoll, D.A., Ottolia, M., Quednau, B.D., Reuter, H., John, S., Qiu, Z., 2002. The Na^+ / Ca^{2+} exchange molecule: an overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 976, 1–10.
- Quednau, B.D., Nicoll, D.A., Philipson, K.D., 1997. Tissue specificity and alternative splicing of the Na^+ / Ca^{2+} exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in rat. *Am. J. Physiol.* 272, C1250–C1261.
- Romero-Mendez, C., Algara-Suarez, P., Sanchez-Armass, S., Mandeville, P.B., Meza, U., Espinosa-Tanguma, R., 2009. Role of extracellular Na^+ , Ca^{2+} -activated Cl^- channels and BK channels in the contraction of Ca^{2+} store-depleted tracheal smooth muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 36, 619–625.
- Tanaka, H., Nishimaru, K., Aikawa, T., Hirayama, W., Tanaka, Y., Shigenobu, K., 2002. Effect of SEA0400, a novel inhibitor of sodium–calcium exchanger, on myocardial ionic currents. *Br. J. Pharmacol.* 135, 1096–1100.
- Wu, C., Sui, G., Fry, C.H., 2002. The role of the L-type Ca^{2+} channel in refilling functional intracellular Ca^{2+} stores in guinea-pig detrusor smooth muscle. *J. Physiol.* 538, 357–369.