



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**EL BLOQUEO DE LA HIDRÓLISIS DE ATP AMPLIFICA EL BRONCOESPASMO
INDUCIDO POR EL RETO ANTIGÉNICO EN COBAYOS: PAPEL PROTECTOR DE
LAS ECTONUCLEOTIDASAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

DIANA CLAUDIA REBOLLAR AYALA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS MANUEL MONTAÑO RAMÍREZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA MERCEDES PERUSQUÍA NAVA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. JAIME CHÁVEZ ALDERETE
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2014



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**EL BLOQUEO DE LA HIDRÓLISIS DE ATP AMPLIFICA EL BRONCOESPASMO
INDUCIDO POR EL RETO ANTIGÉNICO EN COBAYOS: PAPEL PROTECTOR DE
LAS ECTONUCLEOTIDASAS**

TESIS

QUE OPTA POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

DIANA CLAUDIA REBOLLAR AYALA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS MANUEL MONTAÑO RAMÍREZ

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA MERCEDES PERUSQUÍA NAVA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. JAIME CHÁVEZ ALDERETE

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2014



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

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 23 de junio de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **REBOLLAR AYALA DIANA CLAUDIA** con número de cuenta **302124453**, con la tesis titulada **“EL BLOQUEO DE LA HIDRÓLISIS DE ATP AMPLIFICA EL BRONCOESPASMO INDUCIDO POR EL RETO ANTIGÉNICO EN COBAYOS: PAPEL PROTECTOR DE LAS ECTONUCLEOTIDASAS”**, realizada bajo la dirección del **DR. LUIS MANUEL MONTAÑO RAMÍREZ**:

Presidente: DRA. ANNIE PARDO CEMO
Vocal: DR. CARLOS BARAJAS LÓPEZ
Secretario: DR. JAIME CHÁVEZ ALDERETE
Suplente: DRA. MARÍA EUGENIA BETINA SOMMER CERVANTES
Suplente: DRA. MARÍA MERCEDES PERUSQUÍA NAVA

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

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de agosto de 2014

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

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

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

A los miembros de comité tutor:

Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez

Dra. María Mercedes Perusquía Nava

Dr. Jaime Chávez Alderete

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez por darme la oportunidad de hacer mi servicio social y confiar en mí para hacer mis estudios de maestría.

Gracias Dr. Jaime Chávez Alderete por su ayuda y paciencia desde mis primeros pasos por el laboratorio, su orientación, consejos y enseñanzas son algo que me acompañaran a lo largo de mi vida.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Investigación en Asma de la Facultad de Medicina de la UNAM , y al Laboratorio de Hiperreactividad Bronquial del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, agradezco el apoyo brindado para la elaboración de esta tesis.

DEDICATORIAS

A Dios:

por guiarme en cada paso de mi vida y darme la fuerza necesaria para superar los retos que se han presentado.

A mi madre:

mi ejemplo a seguir y a la que debo lo que soy. Por impulsarme con amor a lograr cada una de mis metas, sin ella nada de esto sería posible.

A mi padre:

por las lecciones de vida impartidas.

A mis hermanas Mayra y Cynthia:

por ser mis mejores amigas y aliadas.

A mi amado amigo y compañero de vida Alejandro:

por su apoyo, amor y confianza incondicionales que son pilares fundamentales para mí.

A mi familia y amigos:

por cada momento de alegría o tristeza compartidos, ya que cada uno ha aportado de diversas maneras un granito de arena para que este trabajo llegue a su conclusión.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	1
Lista de figuras	3
Lista de tablas	5
Resumen	6
Abstract	7
Introducción	8
Planteamiento del problema	15
Hipótesis	15
Objetivo General	15
Metodología general	
Protocolo de sensibilización	16
Pletismografía barométrica en animales anestesiados	16
Obtención de Lavado broncoalveolar	17
Órganos aislados	17
Medición de ATP liberado de plaquetas y lavado broncoalveolar	18
Inmunofluorescencia para receptores purinérgicos	19
RT-PCR	20
Resultados	20
Discusión	28
Conclusión	31
Bibliografía	32
Apéndice	35

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
°C	Grado Celsius
μM	Micromolar
ADP	Adenosina difosfato
Al (OH) ₃	Hidróxido de aluminio
AP	Fosfatasa Alcalina
ARL-67156	6-N,N-Diethyl-D-β,γ-dibromomethylene ATP trisodium salt
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
Ca ²⁺	Ion calcio
CaCl ₂	Cloruro de calcio
cmH ₂ O	Centímetro de agua
CO ₂	Dióxido de carbono
Cu ²⁺	Ion cobre
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DNAc	Ácido desoxirribonucleico copia
dNTPs	Oligonucleótidos
EEM	Error estándar de la media
FcεRI	Receptor de alta afinidad de IgE
FEV1	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
g	Gramo
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
H ⁺	Ión hidrógeno
i.p	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
IAP	Fosfatasa alcalina intestinal
K ⁺	Ion potasio
KCl	Cloruro de potasio
kg	Kilogramo
KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio
LBA	Lavado broncoalveolar
M	Molar
mg	Miligramos
Mg ²⁺	Ion magnesio
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
min	Minuto
ml	Mililitro
MLVA	Músculo liso de la vía aérea
mM	Milimolar
mm	Milímetro
NaCl	Cloruro de sodio
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido

NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
NDP	Nucleótido de difosfato
NMP	Nucleótido de monofosfato
NANC	No adrenérgica no colinérgica
NTP	Nucleótido de trifosfato
NTPDasa	Ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa
NPP	Ectonucleotidasa trifosfato pirofosfatasa
O₂	Ion Oxígeno
OVA	Ovoalbúmina
PA	Fosfatasa alcalina
pb	Pares de bases
Pi	Fosfato inorgánico
PLAP	Fosfatasa alcalina placentaria
PLCβ	Fosfolipasa C β
PRP	Plasma rico en plaquetas
RB2	Reactivo azul 2
R_L	Resistencia pulmonar total
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa reversa
s	Segundo
SNC	Sistema nervioso central
SQ29548	7-(3-{{2(phenylcarbamoyl)hydrazinyl}methyl}-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-2-yl)hept-5-enoic acid
SSF	Solución salina fisiológica
SSF-IN	Solución salina fisiológica intratraqueal
SUR	Suramina
TNAP o NSAP	Fosfatasa alcalina tejido no específico
TXA₂	Tromboxano A ₂
UDP	Uridina difosfato
UTP	Uridina trifosfato
V-ATPasa	Bomba de protones V-ATPasa
V-NUT	Transportador vesicular de nucleótidos
vol	Volumen
Zn²⁺	Ion zinc
ΔP	Diferencia de presión
ΔV	Diferencia de volumen
μL	Microlitro
μM	Micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Estructura química del ATP.	8
2	Representación esquemática del V-NUT (Transportador vesicular de nucleótidos).	10
3	Sitios de hidrólisis extracelular en la molécula de ATP por distintos tipos de ectonucleotidasas.	10
4	Estructura de las ectonucleotidasas membranales del tipo NTPDasa, NPPs y AP que hidrolizan al ATP y otros nucleótidos extracelulares. Tomado y modificado de Burnstock, 2007	11
5	Estructura de los receptores P2.	13
6	Equipo de pletismografía para pequeñas especies.	17
7	Potenciación del broncoespasmo inducido por reto antigénico a través de la inhibición de las ectonucleotidasas por ARL-67156.	21
8	La administración de apirasa vía intratraqueal abolió la potenciación del broncoespasmo inducido por la inhibición de las ectonucleotidasas.	22
9	La potenciación del broncoespasmo inducido por la inhibición de las ectonucleotidasas fue abolida por los antagonistas de los receptores P2Y y del receptor de TXA ₂ .	22
10	Efecto de la inhibición de las ectonucleotidasas y/o antagonismo de los receptores P2Y sobre la respuesta de contracción inducida por el reto antigénico en la tráquea y parénquima pulmonar de cobayos sensibilizados.	23
11	Efecto del reto antigénico en la liberación de ATP de plaquetas y lavado broncoalveolar de cobayo sensibilizado.	24

12	Microscopía confocal para los receptores P2Y ₄ y P2Y ₆ en tráqueas de cobayos sensibilizados y no sensibilizados.	25
13	Microscopía confocal para los receptores P2Y ₁ y P2Y ₂ , y controles negativos para los receptores P2Y ₄ y P2Y ₆ en tráqueas de cobayos sensibilizados.	26
14	Control positivo con anticuerpo para el receptor P2Y ₁ .	27
15	Detección de ARNm para los receptores P2Y ₄ y P2Y ₆ en epitelio traqueal de cobayo por RT-PCR.	28

LISTA DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Descripción general de las ectonucleotidasas que hidrolizan nucleótidos extracelulares.	12
2	Características de los receptores P2Y.	14

RESUMEN

Las ectonucleotidasas son ectoenzimas que hidrolizan a nucleótidos extracelulares, como el adenosina 5' trifosfato (ATP), en sus respectivos nucleósidos. Una vez que el ATP es liberado al espacio extracelular puede activar a una serie de receptores llamados purinoreceptores (P2), los cuales han sido clonados y clasificados en dos subfamilias: P2X y P2Y. Cada subfamilia tiene varios miembros: P2X₁₋₇ y P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}. Los receptores P2X son receptores ionotrópicos, catiónicos no selectivos, y en el músculo liso de las vías aéreas (MLVA) del cobayo participan en el llenado con Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico, pero no en la contracción de dicho músculo. Los P2Y son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G, donde los receptores P2Y_{1,2,4,6} se encuentran acoplados a una proteína Gq₁₁. Estos receptores al activarse desencadenan una cascada de segundos mensajeros, cuyo fin es la producción y liberación de tromboxano A₂ (TXA₂), el cual genera contracción en el músculo liso de la vía aérea. Esta vía es a través de la movilización de Ca²⁺ intracelular del retículo endoplásmico vía trifosfato de inositol.

Existen numerosos trabajos relacionados al efecto del ATP sobre el músculo liso de las vías aéreas, sin embargo, hay pocos estudios donde se evalúa el papel del ATP en el asma. El objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de las ectonucleotidasas en el broncoespasmo inducido por el reto antigénico en animales sensibilizados y los receptores P2Y epiteliales involucrados.

Los cobayos sensibilizados a ovoalbúmina (proteína extraída del huevo del pollo) son un modelo alérgico bien establecido dentro del grupo de investigación en asma, que desarrolla características fisiopatológicas comparables con el asma (1,2).

Durante el reto antigénico a cobayos sensibilizados con ovoalbúmina (OVA) administrando una dosis baja de OVA, se produjo un ligero broncoespasmo (~2 veces la resistencia pulmonar basal). En cambio, con la misma dosis de OVA y la previa inhibición de las ectonucleotidasas con ARL-67156, se intensificó en gran medida esta respuesta (11 veces la resistencia pulmonar basal con 44% de mortalidad). Esta potenciación fue disminuida al antagonizar farmacológicamente los receptores purinérgicos (suramina+RB2) y el receptor de TXA₂ (SQ29548) o por la administración de apirasa intratraqueal. Los lavados broncoalveolares obtenidos durante el broncoespasmo contenían concentraciones incrementadas de ATP. En anillos traqueales y tiras de parénquima de pulmón de cobayos sensibilizados, la OVA causó una contracción dependiente de la concentración; suramina+RB2 o levamisol produjeron un corrimiento significativo hacia la derecha de esta respuesta, y el ARL-67156 no la modificó. Cuando las plaquetas obtenidas de animales sensibilizados fueron estimuladas con OVA liberaron ATP. Las imágenes de microscopía confocal de tráqueas no sensibilizadas mostraron una fluorescencia marcada para los receptores P2Y₆ en epitelio, pero no para el P2Y₄. En cambio, tejidos provenientes de animales sensibilizados mostraron una fuerte fluorescencia para ambos receptores. Esto se correlaciona con el incremento observado en el ARNm para los receptores P2Y₂ y P2Y₄ en animales sensibilizados.

Con estos resultados se puede concluir que el ATP incrementa enormemente el broncoespasmo alérgico cuando las ectonucleotidasas son inhibidas. Este efecto es debido probablemente a una síntesis *de novo* de los receptores P2Y₄ y P2Y₆ en el epitelio de la vía aérea durante el proceso de sensibilización.

ABSTRACT

Ectonucleotidases are ectoenzymes that hydrolyze extracellular nucleotides such as ATP and their respective nucleosides. Once ATP is released into the extracellular space, it might activate a number of receptors called purinoceptors (P2), which have been cloned and classified into two subfamilies: P2X and P2Y. Each subfamily has several members: P2X₁₋₇ and P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14}. P2X receptors are ionotropic, nonselective cation-permeant channels and, in the guinea pig airway smooth muscle, they are not involved in muscle contraction, but in sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ refilling. P2Y receptors are metabotropic and therefore coupled to G proteins. Within these, the P2Y_{1, 2, 4, 6} receptors are coupled to a protein Gq11, when activated, mobilize Ca²⁺ of the endoplasmic reticulum via inositol triphosphate with the subsequent production and release of this thromboxane, and induce airway smooth muscle contraction.

Many studies are related to the ATP effect on the airway smooth muscle, however only a few evaluate the role of ATP in asthma. Therefore, the aim of this study was to evaluate the involvement of ectonucleotidases in the bronchospasm induced by the antigenic challenge in sensitized guinea pigs and to determine the epithelial P2Y receptors involved.

Guinea pigs sensitized to ovalbumin (protein extracted from chicken egg) are a well established allergic model within the Asthma Research group, which develops pathophysiological characteristics comparable with asthma

A low-dose ovalbumin (OVA) challenge in sensitized guinea pigs only produced a small bronchospasm (~2-fold the basal lung resistance), but the inhibition of ectonucleotidases with ARL-67156 greatly intensified this response (~11-fold the basal lung resistance, with 44% mortality). Bronchoalveolar lavage fluid obtained during this bronchospasm contained increased ATP concentration. This bronchospasm potentiation was abolished by pharmacological antagonism of the purinergic receptors (suramin+RB2) or the TXA₂ receptor (SQ29548), or by intratracheal apyrase. In tracheal rings and lung parenchyma strips from sensitized guinea pigs, OVA caused a concentration-dependent contraction. Suramin+RB2 or levamisole produced a significant rightward displacement of this response while ARL-67156 did not modify it. Platelets from sensitized guinea pigs stimulated with OVA released ATP. Confocal images of non-sensitized tracheas showed only slight fluorescence for P2Y₆ receptors in epithelium and none for P2Y₄. This correlated with a large increment in mRNA for P2Y₄ and P2Y₆ receptors in sensitized animals.

With these results we conclude that ectonucleotidases greatly potentiate the allergic bronchospasm when its activity is diminished; this effect is probably favored by the up-regulation of P2Y₄ and P2Y₆ receptors in airway epithelium during sensitization.

These results prompt for further research on these mechanisms in human asthma.

INTRODUCCIÓN

La molécula de ATP

El trifosfato de adenosina (ATP), es un nucleótido fundamental presente en todas las formas de vida, es un intermediario de alta energía que constituye la principal moneda de energía celular. (3). Estructuralmente consta de una base nitrogenada (adenina), una D-ribosa y tres grupos fosfato. El nitrógeno 9 de la adenina se une al carbono 1 de la D-ribosa por medio de un enlace N-glucosídico, y el grupo fosfato se une al carbono 5 de la D-ribosa a través de un enlace éster (4).

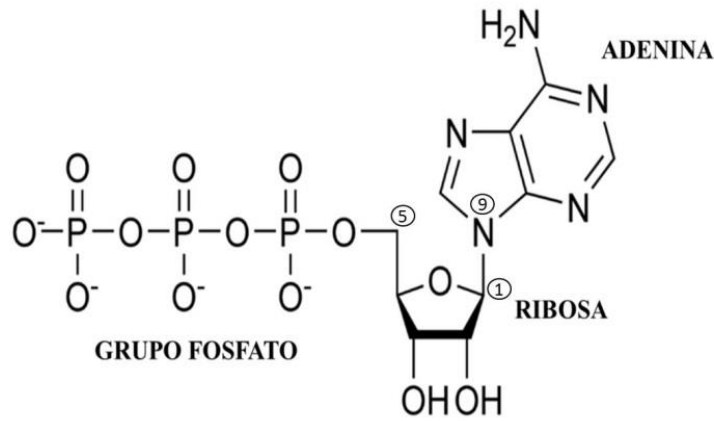


Figura 1. Estructura química del ATP, conformada por una base nitrogenada (adenina), una pentosa (ribosa) y 3 moléculas de fosfatos.

Para completar su función como intermediario metabólico, el ATP debe ser generado y regenerado. Esto se consigue principalmente a través de dos tipos de procesos:

1) Fosforilación a nivel de sustrato

El ATP puede formarse a partir del fosfoenolpiruvato, por transferencia directa de un grupo fosforilo de un compuesto de alta energía al ADP. Tales reacciones tienen lugar sobre todo en las primeras etapas del metabolismo de los carbohidratos (3).

2) Fosforilación oxidativa.

El metabolismo oxidativo funciona para generar un gradiente electroquímico (H^+) a través de la cadena de transporte de electrones en la membrana interna de la mitocondria. La descarga de este gradiente se encuentra acoplada enzimáticamente a la formación de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico mediante una ATPasa (3).

En 1960 Burnstock y sus colaboradores en la Universidad de Melbourne, estudiaban la neurotransmisión colinérgica y adrenérgica en el músculo liso de *Teniae coli* de cobayo en presencia de atropina y berilio, los cuales, bloqueaban dicha neurotransmisión. Esperaban ver una despolarización y contracción al estimular directamente al músculo liso, pero para su sorpresa, lo que observaron fue una hiperpolarización en respuesta a estímulos

individuales y una hiperpolarización y relajación con estímulos continuos. En 1964 este investigador, utilizó tetrodotoxina, la cual bloquea la conducción nerviosa pero no afecta la actividad del músculo liso, y lo que observó fue un bloqueó completo de las hiperpolarizaciones, mostrando que eran potenciales inhibidores en respuesta a la neurotransmisión no adrenérgica no colinérgica (NANC) (5, 6).

En 1929 Drury y Szent-Györgyi describieron las acciones extracelulares de las purinas en el corazón y los vasos sanguíneos, y en 1959, Holton *et al* describieron por primera vez que el ATP podía actuar como un neurotransmisor en el sistema nervioso periférico, y propusieron que el ATP liberado de los nervios sensoriales durante la estimulación del nervio auricular causaba vasodilatación en la arteria de la oreja de conejo (5, 6).

Años después, en 1972, Burnstock propuso el papel del ATP como neurotransmisor en fibras nerviosas no adrenérgicas no colinérgicas de nervios del tracto digestivo de diversas especies, e introdujo el término “purinérgico”. Implícitamente dentro de este concepto de señalización quedó la existencia de receptores purinérgicos, los cuales median las acciones potentes del ATP y sus metabolitos y han sido descritos en una amplia gama de funciones en una gran variedad de órganos y tipos celulares (5, 7).

Durante algún tiempo existió la idea de que la liberación y acción extracelular del ATP ocurría únicamente durante el daño o muerte celular, pero ahora se reconoce que también es un mecanismo fisiológico llevado a cabo por células sanas (8).

Exocitosis y metabolismo extracelular del ATP

El ATP es una molécula de señalización celular que actúa en todos los tejidos y tipos celulares, que tiene múltiples vías de liberación, que pueden o no combinarse, siempre en función del contexto fisiológico o fisiopatológico que se lleve a cabo (6).

La fuente más importante en la síntesis de ATP es la mitocondria, la cual mantiene las concentraciones de ATP citosólico de la célula entre 3 y 10 mM. Sin embargo, la concentración de ATP pueden ser mayor en compartimentos especializados, por ejemplo, en vesículas secretoras que tienen transportadores de nucleótidos, la concentración de ATP pueden llegar a 100 mM, entre 5 y 50 mM en las vesículas secretoras de los mastocitos, y entre 150 y 200 mM en vesículas que contienen serotonina y acetilcolina (6, 9).

La liberación vesicular y el almacenamiento del ATP es muy extendido, y se ha demostrado tanto en células excitable como en no excitables (neuronas, células epiteliales, plaquetas, células cebadas, células mononucleares y polimorfonucleares). El ATP es almacenado y liberado solo o con otros neurotransmisores, como por ejemplo GABA, acetilcolina o noradrenalina (6, 7, 10, 11).

La liberación vesicular de ATP requiere un mecanismo específico para su acumulación en las vesículas secretoras. El almacenamiento de ATP en vesículas requiere un gradiente electroquímico proporcionado por la bomba H^+ -ATPasa vesicular (V-ATPasa,) localizada en la membrana vesicular. Esta bomba crea una alta concentración de protones en el interior de la vesícula secretora, lo que hace que sea más positivo que el citosol. El gradiente electroquímico impulsa la captación de ATP mediante el transportador vesicular de nucleótidos (V-NUT) (6, 11).

La liberación de ATP por exocitosis es bien conocida en tejidos neuroendócrinos, neuronas excitatorias y plaquetas. Al recibir un estímulo, las vesículas que contienen ATP,

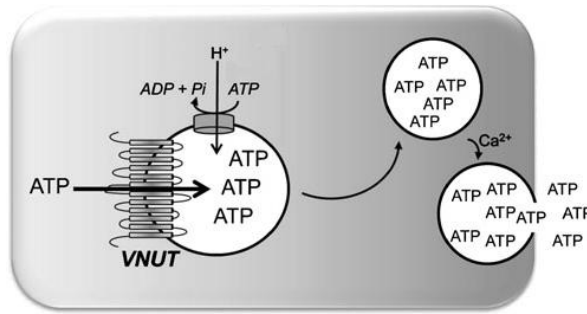


Figura 2. Representación esquemática del V-NUT (Transportador vesicular de nucleótidos). V-NUT transporta nucleótidos al interior de los gránulos secretorios, utilizando el gradiente electroquímico provisto por la bomba de protones V-ATPasa. La exocitosis de ATP es dependiente de Ca²⁺ en tejidos especializados. Tomado de Lazarowski, 2012.

serotonina u otras catecolaminas, migran hacia la membrana plasmática a través de los filamentos del citoesqueleto, ahí se fusionan con la membrana plasmática y liberan su contenido al espacio extracelular. Este mecanismo es dependiente de Ca²⁺ (11).

Una vez que el ATP es liberado al espacio extracelular, puede ser metabolizado por reacciones secuenciales, no sólo para degradarlo, sino también para generar intermediarios con diversas propiedades de señalización en diversos tejidos, o unirse y activar a un grupo de receptores en la membrana celular llamados purinoreceptores (P2), los cuales han sido clonados y clasificados en dos subfamilias: P2X y P2Y (6,12).

El ATP liberado al espacio extracelular es metabolizado por un grupo de enzimas llamadas ectonucleotidasas. Las ectonucleotidasas son ectoenzimas que hidrolizan a nucleótidos extracelulares, como el ATP, en sus respectivos nucleósidos, los cuáles, inician una serie de respuestas celulares a través de la activación de los receptores purinérgicos P2, por lo tanto, las ectonucleotidasas tienen un papel importante mediante la regulación de las

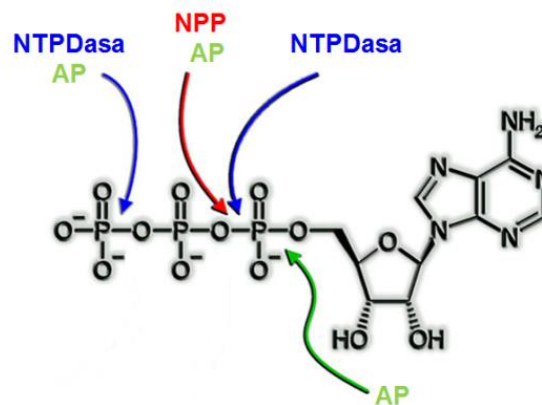


Figura 3. Sitios de hidrólisis en la molécula de ATP por distintas familias de ectonucleotidasas. Ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa (NTPDasa), fosfatasa alcalina (AP) Y ectonucleotidasa pirofosfatasa fosfodiesterasa (NPP). Tomado y modificado de Zimmerman et al., 2012.

hidrólisis de estas moléculas (13, 14). Existen cuatro tipos de ectonucleotidasas: la ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa (NTPDasa), la fosfatasa alcalina (PA), la ectonucleotidasa pirofosfatasa fosfodiesterasa (NPP) y las 5-nucleotidasas. De estas, tres familias son las que hidrolizan al ATP: la NTPDasa, la NPP y la fosfatasa alcalina (15).

Ocho diferentes genes codifican a ocho miembros de la familia de la NTPDasa, cuatro de ellas, las NTPDasas 1, 2, 3 y 8 ejercen su actividad catalítica de manera extracelular, teniendo afinidad por ATP y ADP, mientras que las cuatro restantes, las NTPDasas 4, 5, 6 y 7 su actividad catalítica es intracelulares, teniendo afinidad por cualquier otra base nitrogenada. Las NTPDasas hidrolizan trifosfatos y difosfatos de nucleótidos dando como producto final nucleótidos monofosfatos. Las NTPDasas 1, 2, 3 y 8 se cree tienen dos dominios transmembranales y su función requiere la presencia de Ca^{2+} o Mg^{2+} . La actividad de estas 4 enzimas también es dependiente del pH, con un 60% de actividad a un pH en rangos fisiológicos (14, 16).

La familia de las NPP está representada por siete miembros (NPP 1-7), pero de estas, únicamente NPP1, NPP2 y NPP3 están involucradas en la hidrólisis de nucleótidos extracelulares (6). Las NPPs tienen un solo dominio transmembranal y un dominio catalítico extracelular que tienen afinidad por ATP y otros nucleótidos. Su actividad enzimática es óptima a un pH alcalino y depende de la presencia de iones divalentes como el Mg^{2+} o Zn^{2+} (14, 17).

Finalmente, cuatro enzimas son reconocidas como fosfatasas alcalinas (AP): AP intestinal (IAP), AP tejido no específico (TNAP o NSAP), AP placentaria (PLAP) y AP germinal. Estas enzimas pueden hidrolizar el ATP extracelular a adenosina. Son las únicas ectonucleotidasas que pueden defosforilar secuencialmente nucleótidos trifosfatados a nucleósidos. Un pH alcalino (>9) es el óptimo para la actividad enzimática de las AP. Las AP son proteínas diméricas y sus sitios catalíticos contienen tres iones metálicos, de los cuales dos son iones de Zn^{2+} y uno de Mg^{2+} necesarios para llevar a cabo su actividad catalítica (6, 16).

La importancia biológica que tienen las ectonucleotidasas en enfermedades neurológicas, inflamatorias y autoinmunes se ha asociado con una alteración de la actividad y/o la expresión de estas enzimas, que, en algunos casos, está vinculada a los polimorfismos genéticos (15).

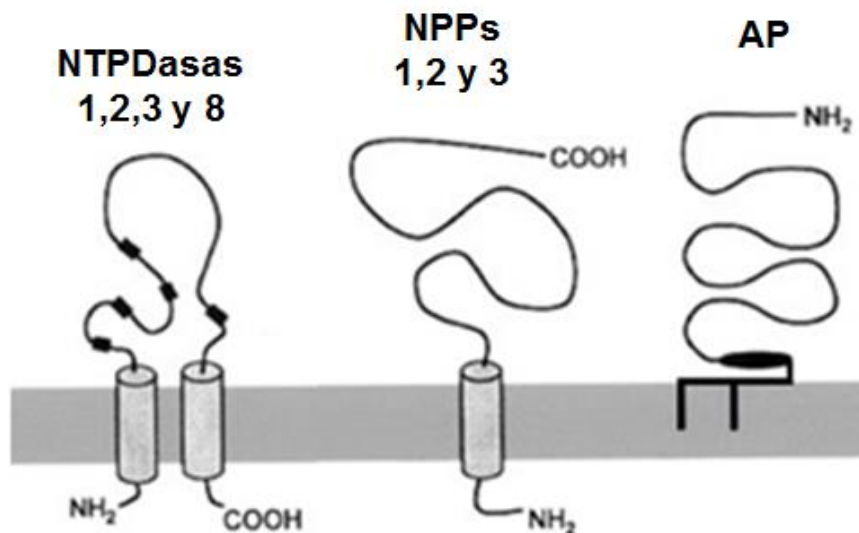


Figura 4. Estructura de las ectonucleotidasas membranales del tipo NTPDasa, NPPs y AP que hidrolizan al ATP y otros nucleótidos extracelulares. Tomado y modificado de Burnstock, 2007

Familia	Enzima	Principales sustratos	Tejido de distribución
Ectonucleotidasas trifosfato difosfohidrolasas	NTPDasa 1	NTP, NDP	SNC, células endoteliales, epitelio, sistema inmune, músculo, tracto intestinal, sistema reproductivo y riñón.
	NTPDasa 2	NTP, NDP	Neuronas, neuroglia, vasos sanguíneos y paladar.
	NTPDasa 3	NTP, NDP	El Sistema Nervioso es su principal localización.
	NTPDasa 8	NTP, NDP	Hígado, yeyuno y riñón
Ectonucleotidasas pirofosfatasas fosfodiesterasas	NPP 1	NTP	Hígado, epitelio de la vía aérea, tejido adiposo, corazón, riñón, vejiga, riñón, pulmón, timo, osteoblastos, condrocitos, macrófagos y linfocitos.
	NPP 2	NTP	Sistema nervioso central, casi exclusivamente en precursores de la oligodendroglía y células leptomeníngeas, astrocitos.
	NPP 3	NTP	Músculo cardíaco, epitelio de la vía aérea, epitelio del plexo coroideo, hepatocitos y basófilos.
Fosfatasas Alcalinas	AP intestinal (IAP)	NTP, NDP, NMP	Intestino
	AP tejido no específico(TNAP o NSAP)	NTP, NDP, NMP	Durante el desarrollo del sistema nervioso, hueso, hígado y riñón.
	AP placentaria (PLAP)	NTP, NDP, NMP	Sincitiotrofoblasto y en algunos tumores.
	AP germinal.	NTP, NDP, NMP	Testículo, cáncer de testículo, malignización del trofoblasto.

Tabla 1. Descripción general de las ectonucleotidasas que hidrolizan nucleótidos extracelulares. Tomado y modificado de Bursntock G. y Verkhatsky A, 2012.

Receptores Purinérgicos (P2)

Los receptores purinérgicos (P2) son clasificados en dos subfamilias: P2X y P2Y, y cada subfamilia tiene varios miembros: P2X₁₋₇ y P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14} (6, 12).

Los receptores P2X son receptores ionotrópicos, catiónicos no selectivos (permeables a Ca²⁺, Na⁺ y K⁺) y modulados por Ca²⁺ extracelular, Mg²⁺, H⁺ e iones metálicos tales como Zn²⁺ o Cu²⁺ (6,18). En el músculo liso de las vías aéreas (MLVA) del cobayo, los P2X no participan en la contracción muscular, pero si en el relleno del retículo endoplásmico con Ca²⁺ (19).

Los receptores P2Y son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G, dentro de estos, los receptores P2Y_{1, 2, 4, 6} se encuentran acoplados a una proteína Gq₁₁, que a través de la activación de la PLC_β produce la movilización de Ca²⁺ intracelular del retículo endoplásmico vía trifosfato de inositol, con la subsecuente producción y liberación de tromboxano A₂, el cual genera contracción del músculo liso de la vía aérea (12, 19,20).

Los receptores P2X son activados principalmente por ATP, mientras que los receptores P2Y pueden ser activados por ATP, ADP, UTP, UDP, aunque la especificidad varía entre las múltiples especies animales (13).

a) Receptor P2X



b) Receptor P2Y

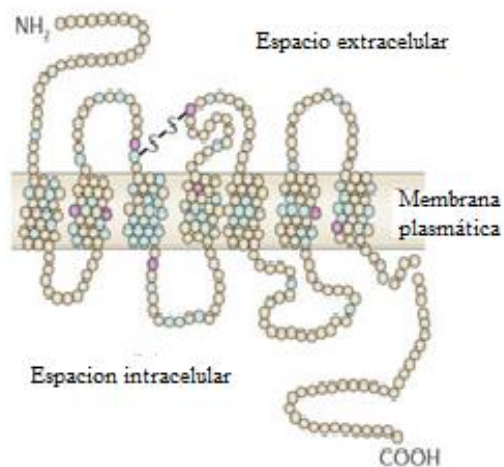


Figura 5. Estructura de los receptores P2. a) Receptores P2X: familia de purinoreceptores del tipo ionotrópicos, catiónicos no selectivos. B) Receptores P2Y: familia de purinoreceptores acoplados a proteínas G. Tomado y modificado de Burnstock 2007; von Kugelgen y Wetter, 2000.

Receptor	Mecanismo de transducción	Tejido de distribución	Principal agonista
P2Y ₁	G _q /G ₁₁ ; activación PLC- β	Plaquetas, corazón, músculo esquelético, tejido neuronal y tracto digestivo.	2-metiltioADP > 2-metiltioATP = ADP > ATP, MRS2365
P2Y ₂	G _q /G ₁₁ ; activación de PLC- β	Pulmón, corazón músculo esquelético, riñón y bazo.	UTP = ATP, UTP γ S, INS37217
P2Y ₄	G _q /G ₁₁ y posibilidad de G _i , activación de PLC- β	Placenta, pulmón, músculo liso vascular e hígado.	UTP \geq ATP, UTP γ S
P2Y ₆	G _q /G ₁₁ ; activación de PLC- β	Pulmón, corazón, aorta, riñón, placenta, timo, intestino, cerebro.	UDP > UTP >> ATP, UDP β S
P2Y ₁₁	G _q /G ₁₁ y G _s ; activación de PLC- β	Bazo, intestino y células del sistema inmune.	ARC67085 > BzATP \geq ATP γ S >ATP
P2Y ₁₂	G _i , inhibición de la adenilato ciclasa	Plaquetas y tejido neuronal.	2-metiltioADP \geq ADP >> ATP
P2Y ₁₃	G _i /G _o	Bazo, leucocitos, hígado, cerebro y medula ósea.	ADP = 2-metiltioADP >> ATP y 2-metiltioATP
P2Y ₁₄	G _q /G ₁₁	Placenta, tejido adiposo, intestino, cerebro y bazo.	UDP-glucosa = UDP-galactosa

Tabla 2. Características de los receptores P2Y. Tomado y modificado de Burnstock, 2007 y Burnstock y Verkhatsky, 2012.

ATP en el asma

Existen numerosos trabajos relacionados al efecto del ATP sobre el músculo liso de las vías aéreas, sin embargo, existen pocos estudios donde se evalúa el papel del ATP en el asma. Esta enfermedad se caracteriza por un proceso inflamatorio crónico de las vías aéreas en el que están involucradas diversas células, como eosinófilos, neutrófilos, basófilos, linfocitos T, macrófagos, células cebadas y células epiteliales (21, 22). Estas células tienen la capacidad de liberar diversos mediadores químicos, tales como histamina, serotonina, leucotrienos, tromboxano A₂, factor de activación plaquetaria, y algunas citosinas como el factor de necrosis tumoral alfa y la interleucina 5, todos ellos capaces de producir hiperreactividad de las vías aéreas (23, 24). Adicionalmente, la degranulación de las células cebadas, la estimulación de las células epiteliales, linfocitos o la activación plaquetaria, pueden liberar sustancias potencialmente broncoconstrictoras tales como el ATP (6,9,11). En 1996, Pellegrino *et al.* (25) estudió la función pulmonar de 8 sujetos asmáticos y 8

sanos, quienes se sometieron a una prueba de reto bronquial, bajo la inhalación de metacolina, histamina y ATP. De acuerdo con sus resultados, las vías aéreas de los sujetos asmáticos fueron 6400 veces más sensibles a la inhalación de ATP que los sujetos sanos, evaluado por la disminución del 15% del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1). Además, entre los sujetos asmáticos que inhalaron ATP, este fue 51 veces más potente que la metacolina y 87 veces más potente que la histamina para producir la disminución de un 15% del FEV1. En el 2007, Idzko *et al.* (26) en sujetos asmáticos y ratones sensibilizados observó que durante el reto antigénico existía un fuerte incremento en la concentración de ATP en los lavados broncoalveolares. Igualmente este autor encontró que la eosinofilia, la inflamación de la vía aérea y la hiperreactividad bronquial desaparecieron cuando la hidrólisis de ATP fue incrementada por la administración exógena de una apirasa (E-NTPDasa1) o suramina (un antagonista no selectivo de los receptores purinérgicos). Recientemente en el laboratorio de investigación en asma, se corroboró que las células polimorfonucleares y mononucleares de humano, también tienen la capacidad de liberar ATP (datos aún no publicados). Claramente los estudios mencionados anteriormente indican que el ATP es una sustancia broncoconstrictora muy potente. Por lo tanto, podríamos especular que tal efecto puede ser modulado por la rápida hidrólisis del ATP por las ectonucleotidasas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los estudios mencionados anteriormente indican que el ATP es una potente sustancia constrictora del músculo liso de las vías aéreas. Por lo tanto nuestro planteamiento del problema es conocer el papel que tiene el ATP en la vía aérea y sus posibles mecanismos de regulación en el broncoespasmo inducido por el reto antigénico.

HIPÓTESIS

1. La respuesta al reto antigénico en animales sensibilizados se incrementará al inhibir las ectonucleotidasas con ARL-67156.
2. Los antagonistas de los receptores purinérgicos bloquearán el efecto broncoconstrictor del ATP liberado en respuesta al reto antigénico.
3. El broncoespasmo en el reto antigénico inducido por ATP, será bloqueado usando un antagonista específico del receptor de tromboxano A₂.
4. El proceso de sensibilización producirá un incremento en la expresión de los receptores P2Y epiteliales.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de las ectonucleotidasas en el broncoespasmo inducido por el reto antigénico en animales sensibilizados y los receptores P2Y epiteliales involucrados.

METODOLOGÍA GENERAL

Protocolo de sensibilización

Los cobayos sensibilizados a ovoalbúmina (OVA), son un modelo animal alérgico bien establecido dentro del grupo de investigación en que realicé este trabajo. Estos animales desarrollan algunas características fisiopatológicas comparables con el asma en humanos (1,2).

Los cobayos machos (300-350 g, cepa Hartley) fueron sensibilizados a OVA, mediante la administración intraperitoneal y subcutánea (día 0) de una solución que contiene 60 mg de OVA mezclada con 1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ disueltos en 1 ml de solución salina fisiológica al 0.9 % (SSF). Mediante nebulización, los animales fueron retados durante 5 min con 3 mg/ml de OVA disuelta en SSF 0.9 % (día 8) y por 10 segundos con una concentración de 1 mg/ml de OVA (día 15). Los animales sensibilizados se utilizaron a partir del día 21 posterior al inicio del protocolo.

Pletismografía barométrica en animales anestesiados

La resistencia pulmonar (R_L) se midió a través de un método isovolumétrico, mediante una cámara de pletismografía (Buxco Electronics Inc., Wilmington, NC, EUA). Los animales sensibilizados se anestesiaron con pentobarbital sódico (35 mg/kg i.p.), manteniendo el estado de anestesia profunda con dosis adicionales de pentobarbital (9 mg/kg i.v.) administrados en un periodo de ~1 hora. Una vez anestesiado, cada animal fue colocado en la base de la cámara de acrílico del pletismógrafo y la tráquea se canuló para ventilarlo mecánicamente a un volumen de 10 ml/kg y 48 respiraciones/min (ventilador mecánico para roedores, modelo 7025 Ugo Basile Biological Research Apparatus, Varese, Italia). Posteriormente, la vena yugular fue canulada para la administración de los fármacos. Otra cánula se colocó en el tercio medio del esófago, la cual mide la presión intraesofágica, que sirve como un sustituto de la presión intrapleurales. Finalmente, al animal se le administró bromuro de pancuronio (0.06 mg/kg i.v.) con el objetivo de suprimir los movimientos respiratorios espontáneos. A continuación, la cámara se cerró para poder obtener la señal de presión traqueal, que se integra a través de un transductor de presión diferencial. Para registrar la señal de flujo se conectó a un extremo de la cámara un segundo transductor de presión diferencial. Ambas señales se analizaron a través de un software (Buxco, Biosystem XA v.2.11), el cual, calcula la relación de estas señales para obtener la R_L , cuya fórmula es $R_L = \Delta P / \Delta V$, donde ΔP es el cambio de presión y ΔV es el cambio de volumen. El broncoespasmo inducido por el reto antigénico, se evaluó como el máximo incremento de R_L registrado minutos después a la administración de OVA (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.). En animales sensibilizados control, el pico máximo de R_L se obtuvo usualmente a los ~5 minutos.

Varios grupos de animales fueron estudiados. El grupo control recibió únicamente el reto antigénico con OVA. A todos los grupos experimentales restantes se les administró 5 mg/kg i.v. de ARL-67156 (un inhibidor de las ectonucleotidasas) 15 minutos antes de la OVA. Algunos de estos grupos experimentales recibieron además los siguientes tratamientos ~10 min antes de OVA: a) 20 mg/kg/i.v. suramina, un antagonista de los receptores $\text{P2X}_{1, 2, 3, 5}$ y $\text{P2Y}_{1,2,6,11,12,13}$ b) suramina más 7.7 mg/kg/i.v. RB2, un

antagonista de los receptores $P2Y_{1,4,6,11,12,13}$ o c) 0.3 mg/kg/i.v. SQ29548, un antagonista de los receptores de TXA_2 .

En un grupo separado de cobayos sensibilizados, recibieron cada uno 300 unidades de apirasa (NTPDase1) disuelta en 1 ml de SSF (vía intratraqueal). Después de la estabilización de los animales dentro del pletismógrafo (~5 min), el ARL-67156 fue administrado 15 minutos antes del reto antigénico. El grupo control para estos experimentos recibió 1 ml de SSF intratraqueal. Se corroboró que el ARL-67156 no modificara los valores basales de R_L en animales controles (cobayos sometidos al mismo protocolo que los animales sensibilizados, pero sin la administración de OVA).

El efecto de cada fármaco sobre el incremento en la R_L al reto antigénico se evaluó comparando los valores máximos obtenidos en un periodo de tiempo preestablecido (~30 min).

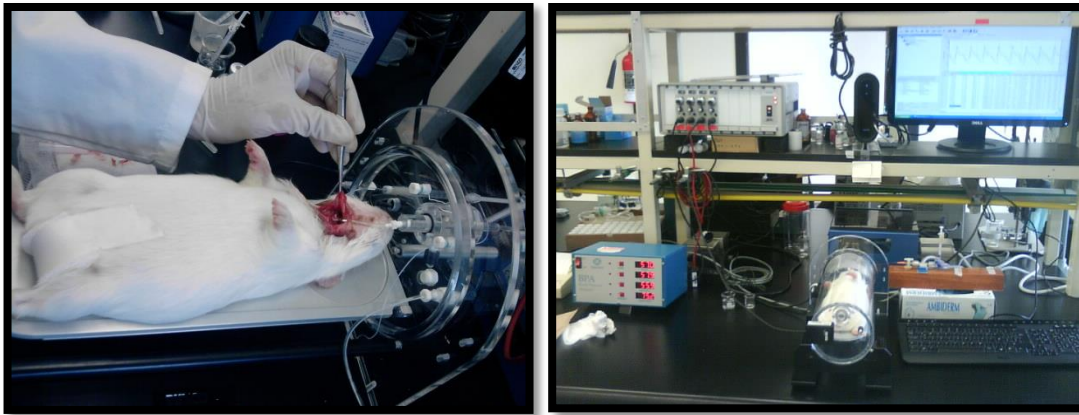


Figura 6. Equipo de pletismografía para pequeñas especies. Permite evaluar en animales anestesiados los cambios en la R_L durante el reto antigénico y el uso de distintos fármacos.

Obtención de Lavado broncoalveolar

El lavado broncoalveolar (LBA) se colectó 5 minutos después de la administración del reto antigénico, con o sin la administración previa de 5 mg/kg de ARL-67156 (15 minutos antes de la OVA). El LBA fue obtenido introduciendo 10 ml de SSF a temperatura ambiente a través de una cánula intratraqueal, seguida de una gentil recuperación del fluido. El total de LBA fue centrifugado a 1800 rpm y almacenado a -70°C hasta su análisis.

Órganos aislados

Con la finalidad de investigar de manera local el papel del ATP y otros nucleótidos en anillos traqueales y tiras de parénquima pulmonar de cobayo sensibilizado, se realizó una curva de OVA (10^{-12} a 10^{-6} M) en estos tejidos, con o sin una incubación previa (10 minutos) con 100 μM de ARL-67156, 100 μM de suramina más 100 μM de RB2 o 10 μM de levamisol (inhibidor de la fosfatasa alcalina).

Se sacrificaron cobayos machos sensibilizados a OVA (cepa Hartley, 500-550 g). Una vez anestesiados con pentobarbital sódico (35 mg/kg, i.p.) y desangrados, se extrajo la tráquea o el parénquima pulmonar, retirándoles tejido adyacente. Los tejidos fueron colocaron en una cámara de disección que contenía solución Krebs-Ringer con la siguiente composición [mM]: 118 NaCl, 25 NaHCO₃, 11 Glucosa, 4.6 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 2 CaCl₂. La solución fue burbujeada con una mezcla de carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) manteniendo un pH estable en intervalos fisiológicos (7.3-7.4). La tráquea fue seccionada en 8 segmentos, cada uno con 4 anillos de cartílago, que se colgaron en distintas cámaras de órganos aislados a una tensión de 1g, hasta que fueron totalmente estables (aproximadamente 30 minutos). Para la obtención de parénquima pulmonar, se extrajo el bloque cardiopulmonar completo, el cual se colocó en una cámara de disección que contenía solución de Krebs-Ringer con las mismas características mencionadas anteriormente. Con una jeringa se perfundió solución Krebs (20 mL) a través del ventrículo derecho con el fin de remover la sangre de los pulmones; posteriormente se eligieron los lóbulos inferiores (cara diafragmática), retirándoles la superficie pleural. Se cortaron 8 tiras de aproximadamente 3x3x20 mm, con un peso seco de ~56 mg. Se colgaron en distintas cámaras que contenían solución Krebs a una tensión de 300 mg, hasta que fueron totalmente estables (aproximadamente 30 minutos).

Con el propósito de normalizar las respuestas de los tejidos, éstos se estimularon tres veces con KCl (60 mM) en el caso de la tráquea y dos veces en el parénquima pulmonar, durante 20 min o hasta alcanzar la respuesta máxima de contracción. Todas las respuestas contráctiles subsecuentes obtenidas durante los experimentos fueron expresadas en porcentajes de la tercera contracción inducida por KCl.

La tensión isométrica fue registrada con un transductor de tensión (modelo FT03, Grass Instruments, West Warwick, RI, EUA) conectado a un sistema integrador de señales (CyberAmp 380, Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Para obtener los datos y registros de la contracción del músculo liso traqueal de cobayo se utilizó una computadora con el software (AxoScope versión 10.2, Axon Instruments, Foster City, CA, USA).

Medición de ATP liberado de plaquetas y lavado broncoalveolar.

Para la cuantificación de ATP en plasma rico en plaquetas (PRP), la sangre de los cobayos previamente sensibilizados se recolectó en tubos que contenían 0.129 mol/L de solución de citrato como anticoagulante (9:1 vol/vol), y se centrifugó a 200×g durante 4 minutos a temperatura ambiente (20-24 °C). El PRP se recuperó y se mantuvo a temperatura ambiente. Las plaquetas (250 µL de PRP contenían ~ 2.5×10⁵ plaquetas/µL) se incubaron durante 3 min a 37 °C. Posteriormente, la liberación de ATP de las plaquetas se indujo con 1 µM de OVA bajo condiciones de agitación (1200 rpm), y se dejó reaccionar durante 8 minutos. La energía química del ATP se convierte en energía lumínica mediante una reacción enzimática usando luciferasa-luciferina, oxígeno y Mg²⁺, y se midió a través de un lumi-agregómetro (modelo 560 CA acoplado a un modelo de 810 Aggro / Link, Chrono-log, Havertown, PA). Para los controles, las plaquetas fueron estimuladas con 5 mM de ADP.

Para medir la concentración de ATP en el LBA se utilizó un ensayo colorimétrico comercial. Las muestras que previamente fueron deshidratadas y descongelaron se

reconstituyeron en 100 μ L del buffer perteneciente a dicho ensayo (Abcam, Cambridge, MA, USA).

Inmunofluorescencia para receptores purinérgicos

Las tráqueas obtenidas de cobayos no sensibilizados y sensibilizados fueron fijadas histológicamente con paraformaldehído al 4% durante 2.5 horas y colocados en etanol al 30% hasta su inclusión en parafina. Los bloques de tejido parafinizados fueron cortados (5 μ m) y se colocaron sobre laminillas silanizadas. La parafina fue removida con xilol, seguido con un lavado de soluciones de alcohol a varios grados de concentración. Las laminillas de pulmón se colocaron en PBS tres veces por 5 minutos cada una. Para realizar el desenmascaramiento antigénico se colocó el portaobjetos en un contenedor a presión con un buffer de citrato (0.01 M) a un pH de 6 durante 3 minutos. Las laminillas fueron puestas en una solución PBS y permeabilizadas con una solución 0.1% Triton X-100 en PBS. Para bloquear la unión no específica a proteínas, se aplicó suero de caballo al 5% sobre las laminillas por 2 horas. Los anticuerpos primarios para P2Y₁ (cat. no. APR-009), P2Y₂ (cat. no. APR-010), P2Y₄ (cat. no. APR-006) y P2Y₆ (cat. no. sc-20127), de Laboratorios Alomone (Jerusalén, Israel), se incubaron (dilución 1:50) durante la noche a 4°C, y las laminillas fueron lavadas cuatro veces con PBS durante 5 minutos cada una. El anticuerpo secundario de cabra anti-conejo IgG conjugado con Cy3 (AP187C, Millipore, CA, EE.UU.), fue incubado en una dilución 1:100 por una hora en oscuridad. Las laminillas fueron lavadas con PBS cuatro veces durante 5 minutos cada una, y fijadas con paraformaldehído al 4% por 10 minutos y lavadas con PBS.

Para incubar el siguiente anticuerpo primario, fue utilizado el protocolo descrito anteriormente para incubar las laminillas con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-pan citoqueratina (AE1/AE3 8/18 Cat. No. CM162B, Biocare Medical, Concord CA, EE.UU.), usando suero de caballo al 1% para bloquear la unión inespecífica de proteínas, y como anticuerpo secundario se utilizó Alexa flúor 488 de burro anti-ratón (A21202 Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA).

A las laminillas se les colocó VectaShield mounting (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.) para preservar la fluorescencia, facilitar la manipulación y almacenamiento del tejido montado. La especificidad del inmunomarcaje del antígeno para P2Y₄ se determinó utilizando un péptido bloqueador para saturar el anticuerpo primario; en el caso de P2Y₆, debido a que no existe péptido bloqueador comercial, el control negativo del anticuerpo primario se omitió. No hubo marcaje del P2Y₁ en la vía aérea, por lo que se realizó un control positivo en el hipocampo de cobayo y se corroboró la especificidad con un péptido bloqueador. El control negativo para P2Y₂ con su péptido bloqueador fue realizado en un trabajo previo (27). Todas las laminillas se tiñeron con DAPI (Sigma, cat. no. D9542) para la visualización del núcleo.

El marcaje de las laminillas fue observado con un microscopio confocal laser (Leica TCS SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) utilizando el objetivo 40x con aceite de

inmersión. La resolución original de todas las imágenes fue 1,024 x 1,024 píxeles. Para fines de visualización, se hicieron imágenes sobrepuestas, en las que los receptores P2Y fueron coloreados de rojo y la queratina de verde.

RT-PCR

El ARN total fue obtenido del epitelio traqueal del cobayo usando un reactivo de estabilización del ARN (RNAlater, Qiagen, Dusseldorf, Alemania). La purificación del ARN se hizo usando un kit comercial para ARN (Ambion, Foster City, CA). Se usó 1 µg de ARNm y transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) en presencia de oligonucleótidos (dNTPs) por 1.5 horas a 42°C. Se diseñó el PCR 25 µl con 1/20 de la reacción de transcripción reversa con el kit de DNA polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Los primers sentido y antisentido para el receptor P2Y₄ (secuencias a partir del consenso de Genbank: NM_020621.4, NM_002565.3, NM_031680.1, NM_001198703.1 y XM_002700045.1) fueron los nucleótidos 5-CTATGCAGTTGTCTTTGTGCTG-3 y 5-AAGCAGACAGCAAAGACAGTCA-3, respectivamente. Los primers sentido y antisentido para el receptor P2Y₆ (Ensembl-ENSCPOT0000008023.2) fueron los nucleótidos 5-CCAGTCCTTGAGCTTGCCAC-3 y GCCACTTGGCTGTGAGTTTCTG-3, respectivamente. Los primers sentido y antisentido para GAPDH fueron los nucleótidos 5-TGAAGGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3 y 5-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3, respectivamente.

Después de 5 minutos a 94°C, la amplificación se efectuó con 30 ciclos en las siguientes condiciones:

- a) Para el receptor P2Y₄, 15 s a 94°C, 30 s a 49°C y 1.10 minutos a 68°C.
- b) Para el receptor P2Y₆, 30 s a 94°C, 30 s a 50°C, y 1.10 minutos a 68°C.
- c) Para GAPDH, 20 s a 94°C, 20 s a 60°C y 1 min a 68°C

Durante un período final de 5 min se mantuvo las muestras a 68 °C. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% teñidos con 1 µg/ml de bromuro de etidio. Las imágenes se obtuvieron con un sistema de documentación Gel-Doc 2000 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.).

Cada experimento se realizó por duplicado (epitelio traqueal de dos cobayos). Se realizaron tres experimentos en animales sensibilizados y tres en animales no sensibilizados.

RESULTADOS

Los valores basales de resistencia pulmonar total en todos los animales evaluados tiene un promedio de 0.609 ± 0.015 cmH₂O/ml/s, $X \pm EEM$, n = 41. El reto antigénico con

OVA a una dosis baja produjo un incremento no significativo de la R_L de alrededor de 2 veces los valores basales ($p = 0.08$, $n = 10$) Por el contrario, cuando las ectonucleotidasas son inhibidas con ARL-67156, la misma dosis baja de OVA causa un severo broncoespasmo en los animales, incrementando cerca de 11 veces sus valores basales ($p = 0.008$, $n = 9$) y produciendo un 44.4% de mortalidad, lo que nos sugiere que las ectonucleotidasas están involucradas en el incremento en la respuesta en condiciones *in vivo* (**Fig. 7**).

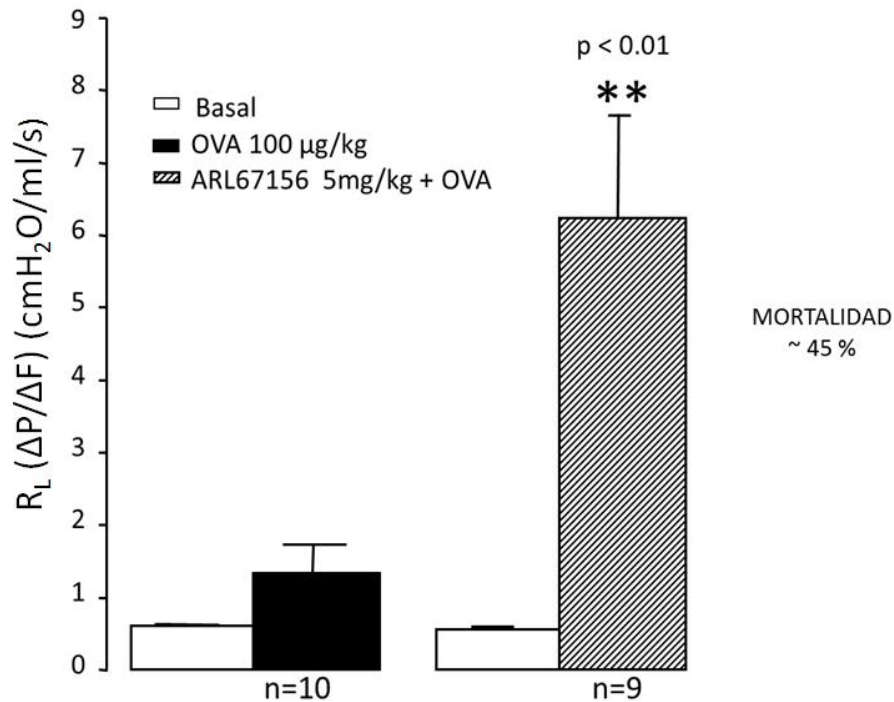


Figura 7. Potenciación del broncoespasmo inducido por reto antigénico a través de la inhibición de las ectonucleotidasas por ARL-67156. En cobayos sensibilizados, una dosis baja de OVA (100 μg/kg, i.v.) indujo un ligero incremento de la resistencia pulmonar total (R_L , barra negra, $n=10$), en comparación con sus valores basales (barra blanca, $n=10$). Con la inhibición previa de las ectonucleotidasas con 5 mg/kg de ARL-67156 i.v., hubo un amplificación significativa de la respuesta al reto antigénico (barras diagonales, $n=9$, $*p < 0.01$, prueba t de Student, pareada), provocando una mortalidad del ~45% de los animales. Los datos representan el promedio y error estándar.

Con la administración previa de 300 unidades intratraqueales de apirasa, se logró abolir completamente el efecto de potenciación del ARL-67156 sobre el reto antigénico ($48 \pm 89\%$ incremento de R_L , $n = 8$), de manera que el broncoespasmo resultante no fue diferente al del grupo control sin ARL-67156 ($46 \pm 34\%$ incremento de R_L , $n = 4$, **Fig. 8**).

El gran incremento en la R_L inducido por ARL-67156 fue parcialmente bloqueado por la administración de suramina previa al reto antigénico ($p < 0.05$, $n = 5$), y totalmente abolida por la combinación de suramina más RB2 ($p < 0.01$, $n = 4$) o por SQ29548 ($p < 0.01$, $n = 6$). (**Figura 9**).

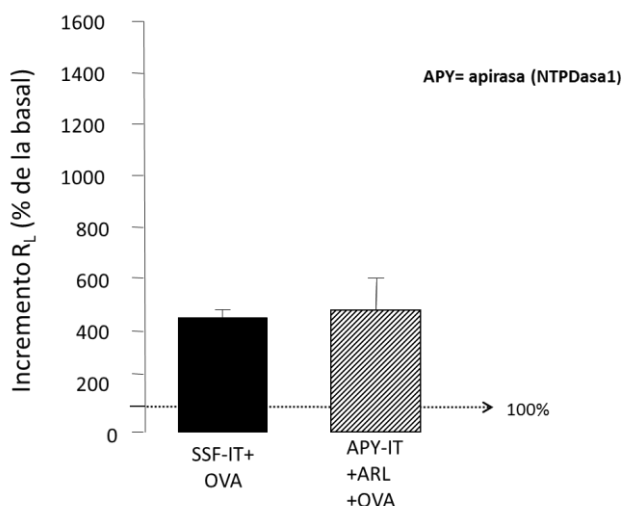


Figura 8. La administración de apirasa vía intratraqueal abolió la potenciación del broncoespasmo inducido por la inhibición de las ectonucleotidasas. En el grupo control, el reto antigénico con OVA (100 μ g/kg) produjo un incremento de la resistencia pulmonar total (R_L), este grupo fue instilado con 1 mL de Solución Salina Fisiológica vía intratraqueal (SSF-IT) 15 min previos al reto antigénico (R_L , Barra negra, n=4). En el grupo experimental, se instilaron 300 UI de apirasa disueltas en 1 mL de SSF vía intratraqueal (APY-IT), el ARL i.v. se administró 15 minutos previos a la OVA, no se observó la potenciación de la respuesta al reto antigénico generada por la inhibición de las ectonucleotidasas (Barra con líneas diagonales, n=7). No hay diferencia significativa entre los valores de R_L entre el grupo control y el experimental (Prueba T de student). Las barras representan la media y las líneas verticales el error estándar.

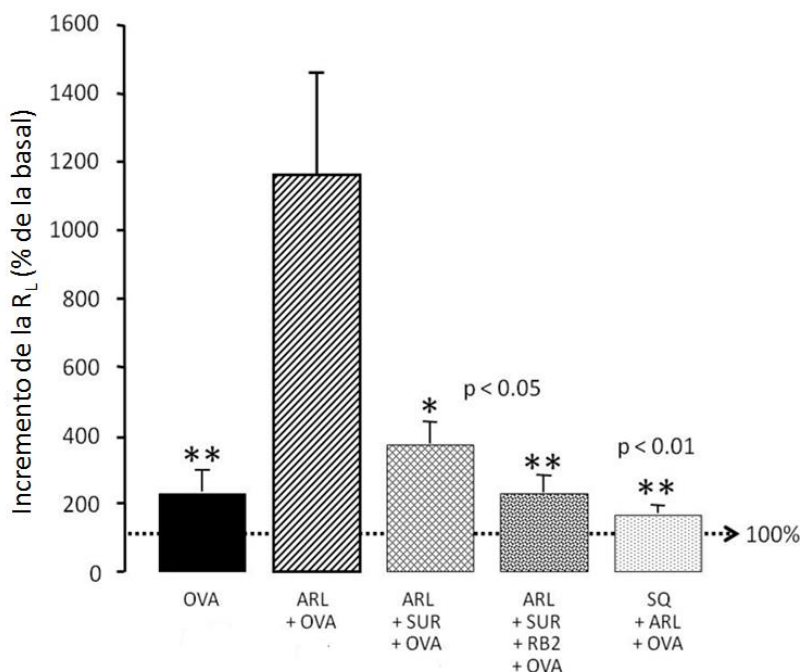


Figura 9. La potenciación del broncoespasmo inducido por la inhibición de las ectonucleotidasas fue abolida por los antagonistas de los receptores P2Y y del receptor de TXA_2 . ARL= ARL-67152 (5 mg/kg), OVA = ovoalbúmina (100 μ g/kg); SUR = suramina (20 mg/kg), RB2 = reactivo azul (7.7 mg/kg), SQ = SQ29548 (0.3 mg/kg). * p <0.05, ** p <0.01 fue comparado con el grupo de ARL+OVA (ANOVA, seguida de una prueba de Dunnett). Las barras representan la media y las líneas verticales el error estándar.

En condiciones *in vitro*, en anillos traqueales (n = 6–7 por grupo) y tiras de parénquima pulmonar (n = 4 por grupo) de cobayos sensibilizados, el incremento en las concentraciones de OVA causó una contracción dependiente de la concentración en ambos tejidos. Como se puede observar en las figuras **10A** y **10B**, la inhibición de las ectonucleotidasas con ARL-67156 no modificó la respuesta de contracción a OVA, pero la adición de suramina (100 μ M) más RB2 (100 μ M) causan un desplazamiento a la derecha de la curva concentración respuesta a OVA. La evaluación de sus respectivas regresiones lineales mostró una clara diferencia significativa en los interceptos para ambos tejidos, en tráquea (p < 0.05) y en parénquimas (p < 0.01). Igualmente, el levamisol (10 μ M) produce un desplazamiento a la derecha de la curva concentración respuesta a OVA en anillos traqueales (p < 0.005 para los interceptos, **Fig. 10C**) pero no en parénquima pulmonar (**Fig. 10D**). Los controles negativos (tráquea de cobayos no sensibilizados) no respondieron a OVA (no ilustrado).

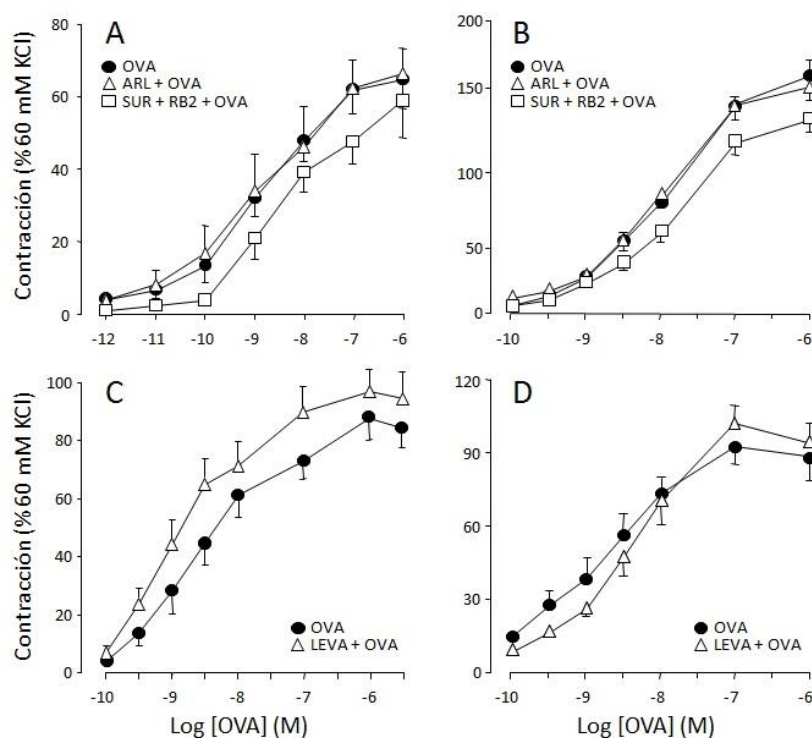


Figura 10. Efecto de la inhibición de las ectonucleotidasas y/o el antagonismo de los receptores P2Y sobre la respuesta de contracción inducida por el reto antigénico en la tráquea y parénquima pulmonar de cobayos sensibilizados. La inhibición de las ectonucleotidasas por ARL-67156 (ARL, 100 μ M) no afectó la contracción inducida por OVA, mientras que la mezcla de suramina (SUR, 100 μ M) más RB2 (100 μ M) provocó un desplazamiento hacia la derecha de la curva concentración respuesta de OVA, tanto en anillos traqueales (A) como en las tiras de parénquima pulmonar (B) de cobayos sensibilizados. Se realizó un análisis de covarianza, evaluando las diferencias de las regresiones lineales obtenidas del grupo control y los experimentales, mostrando diferencias estadísticas en las intersecciones del grupo de OVA contra el grupo de SUR+RB2, tanto en las tráqueas (p < 0,05) como en tiras de parénquima pulmonar (p < 0,01) (prueba de Dunnett para comparar las intersecciones de los grupos experimentales contra el grupo control). El levamisol (LEVA, 10 μ M) desplazó la curva hacia la izquierda en comparación con la curva concentración respuesta a OVA en las tráqueas (p < 0,005, prueba T de student para las regresiones lineales), pero no en los parénquimas pulmonares (D).

Al estimular las plaquetas de cobayo sensibilizado con 1 μM de OVA, se observó una liberación de ATP de 0.50 ± 0.25 nM ($n = 7$), que corresponde a la mitad de la concentración de ATP liberado de los experimentos controles, donde las plaquetas fueron estimuladas con 5 μM de ADP (1.06 ± 0.26 nM, $n = 4$, **Fig. 11 A**). Plaquetas de cobayos sensibilizados ($n=4$) fueron estimuladas con SSF y no se observó respuesta (**Fig. 11A**).

No hubo diferencia estadística entre las concentraciones de ATP medidas en el LBA recuperado poco después del broncoespasmo inducido por el reto antigénico, entre el grupo control (sham, $n=5$) y el grupo de cobayos sensibilizados ($n=12$). Sin embargo se observó un incremento significativo en las concentraciones de ATP en el LBA (191%, $p < 0.01$) cuando se inhiben las ectonucleotidasas con ARL-67156 ($n=6$) en cobayos sensibilizados (**Fig. 11B**).

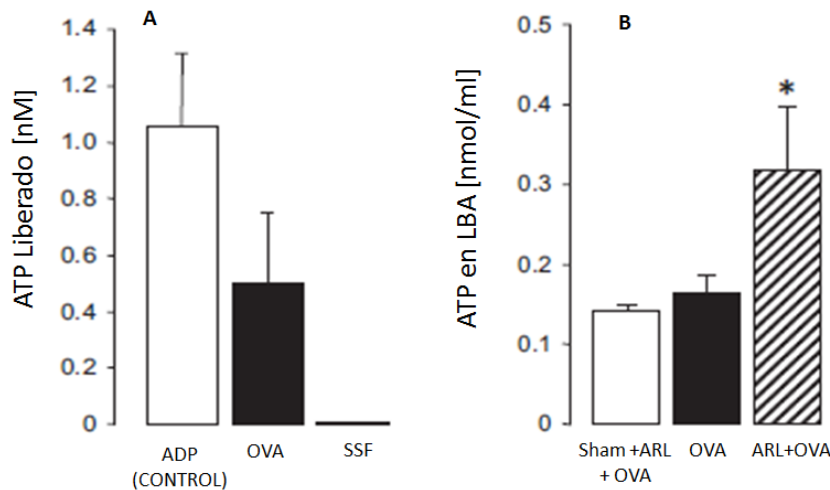


Figura 11. Efecto del reto antigénico en la liberación de ATP de plaquetas y lavado broncoalveolar de cobayo sensibilizado. En la figura A, la barra negra corresponde al ATP liberado por OVA 1 μM , mientras que la barra blanca representa el ATP liberado por un control positivo (5 μM ADP). El ATP liberado de las plaquetas con la estimulación de 1 μM de OVA fue 0.50 ± 0.25 nM correspondiendo a casi la mitad del ATP liberado del grupo control, en los que las plaquetas fueron estimuladas con 5 μM de ADP, cuyo valor fue de 1.06 ± 0.26 nM. La adición de solución salina no produjo ningún efecto. Las barras representan la media y las líneas verticales el EEM. En la figura B, se observa como la concentración de ATP en el LBA después del reto antigénico con OVA es mucho mayor con la previa inhibición de las ectonucleotidasas con ARL-67156 (barra rayada) que con sólo el reto antigénico con OVA (barra negra).

Las imágenes de microscopía confocal de las tráqueas obtenidas de animales no sensibilizados, no mostraron fluorescencia en el epitelio de la vía aérea para los receptores P2Y₄ y P2Y₆ (**Fig. 12, panel A–D y I–L, respectivamente**), en cambio en animales sensibilizados se observó una fuerte fluorescencia para ambos receptores en el borde luminal del epitelio de las vías aéreas (**Fig. 12, panel E–H y M–P, respectivamente**). P2Y₄ también tiene una intensa fluorescencia en el músculo liso de la vía aérea en animales sensibilizados y no sensibilizados, pero se ve fuertemente incrementada en las imágenes de los animales sensibilizados. Por otro lado, en las tráqueas sensibilizadas, los receptores P2Y₁ y P2Y₂ estuvieron ausentes en el epitelio de la vía aérea, aunque P2Y₂ se observó en la músculo liso de la vía aérea y en la capa submucosa (**Fig. 13, panel E–H**). Se corroboró la inmunorreactividad del anticuerpo para el receptor P2Y₁ en secciones

histológicas del hipocampo de cobayo, un tejido que se conoce posee alta densidad de este tipo de receptor purinérgico (**Fig. 14, panel A-D**) (28). El control negativo para el receptor P2Y₂ fue realizado con un péptido bloqueador en un trabajo anterior (27).

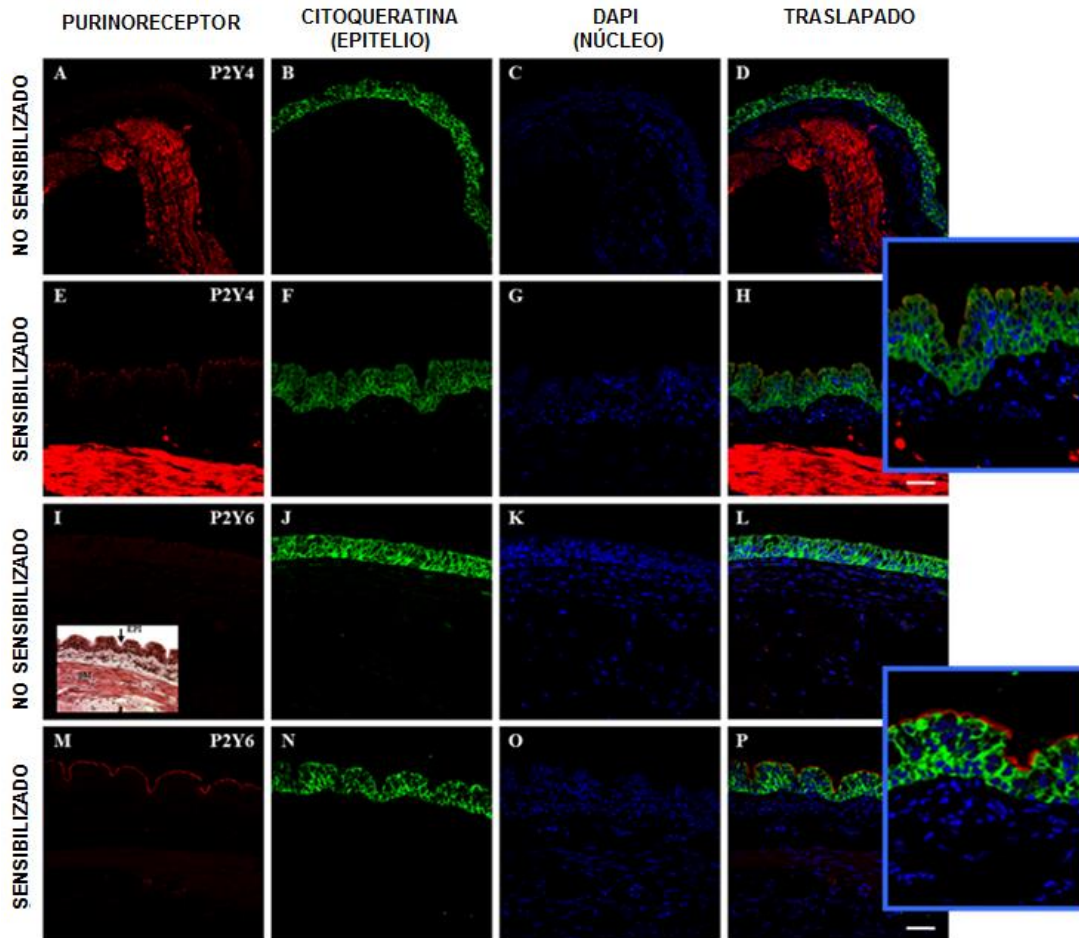


Figura 12. Microscopía confocal para los receptores P2Y₄ y P2Y₆ en tráqueas de cobayos sensibilizados y no sensibilizados. La primera columna muestra la inmunorreactividad de los receptores P2Y₄ y P2Y₆ (color rojo), en la segunda y tercera columna se visualiza la inmunofluorescencia para la citoqueratina en el epitelio de las vías respiratorias (color verde) y DAPI para los núcleos celulares (color azul) respectivamente. La última columna es la fusión de las 3 anteriores. En estas imágenes fusionadas, los receptores P2Y₄ en tráqueas no sensibilizadas (panel D) se localizaron principalmente en el músculo liso bronquial, pero no en el epitelio. En cambio en los tejidos sensibilizados, esta fluorescencia a P2Y₄ se incrementó en gran medida en el músculo liso de las vías respiratorias y, más importantes aún, se observa ahora en el borde luminal del epitelio de las vías respiratorias (panel H). Con respecto a los receptores P2Y₆, en los tejidos no sensibilizados, la fluorescencia fue ligeramente difusa a lo largo del epitelio (panel L), pero en las tráqueas de los animales sensibilizados, un fuerte incremento en la fluorescencia se observó claramente en el borde luminal de las células epiteliales (panel P). La inserción en el panel I corresponde a una tinción de hematoxilina-eosina para mostrar la ubicación de músculo liso (SM) y el epitelio de las vías aéreas (EPI).

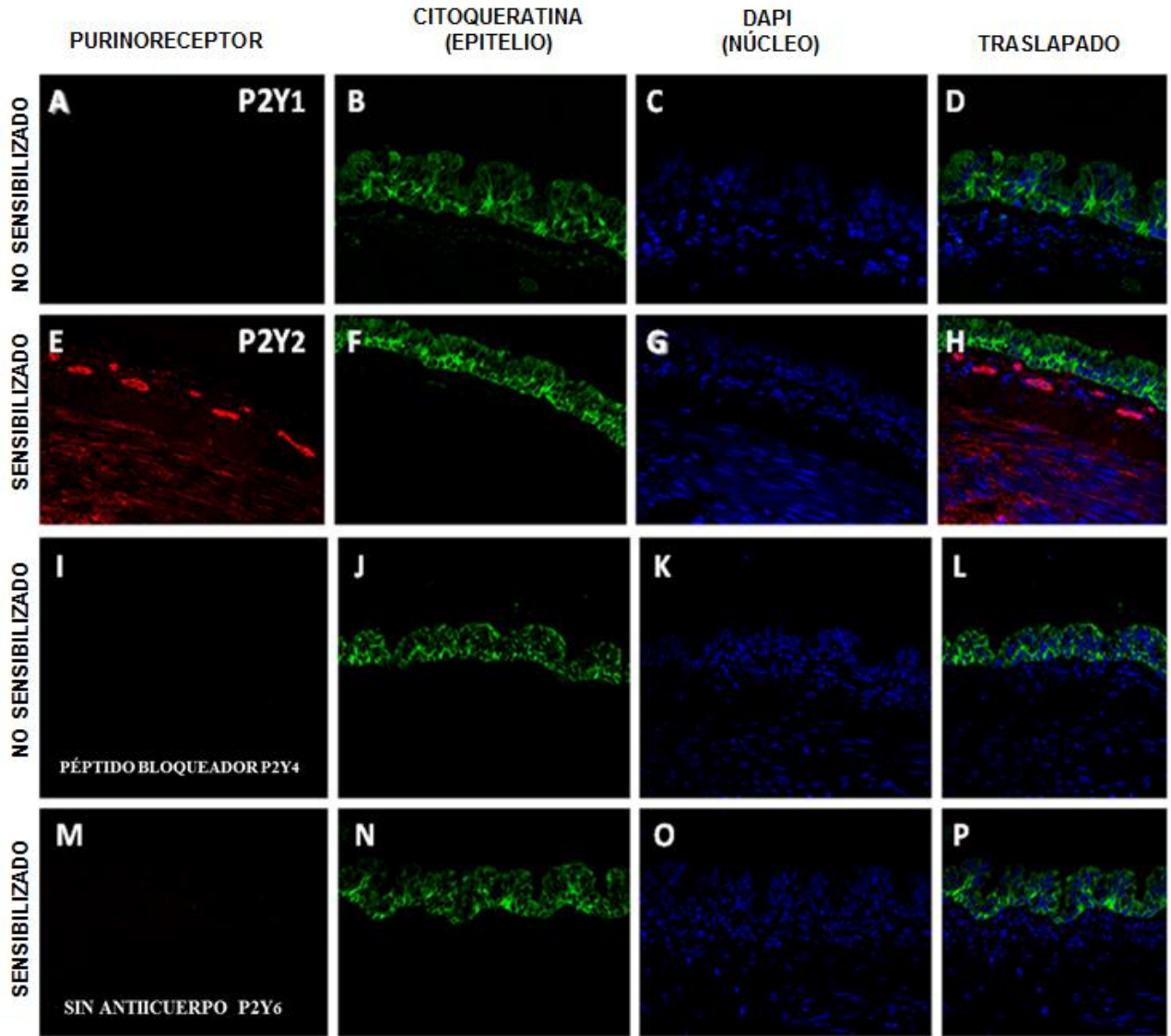


Figura 13. Microscopía confocal para los receptores $P2Y_1$ y $P2Y_2$, y controles negativos para los receptores $P2Y_4$ y $P2Y_6$ en tráqueas de cobayos sensibilizados. En la primera columna se muestra la inmunorreactividad para los receptores $P2Y_1$ y $P2Y_2$ (teñido de rojo), en las segunda columna se observa la fluorescencia de la citoqueratina en el epitelio de la vía aérea (teñido de verde) y DAPI para el núcleo celular (teñido de azul), respectivamente. La siguiente columna muestra el traslapado de las tres columnas anteriores. La inmunorreactividad para el receptor $P2Y_1$ no fue detectada (panel A y D), mientras que $P2Y_2$ fue observado únicamente en el músculo liso de la vía aérea, pero no en el epitelio (panel E y H). Las imágenes de los paneles I-P muestran el control negativo para $P2Y_4$ usando un péptido bloqueador que satura al anticuerpo primario para $P2Y_4$ (panel I-L) o eliminando el anticuerpo primario para $P2Y_6$ (panel M-P).

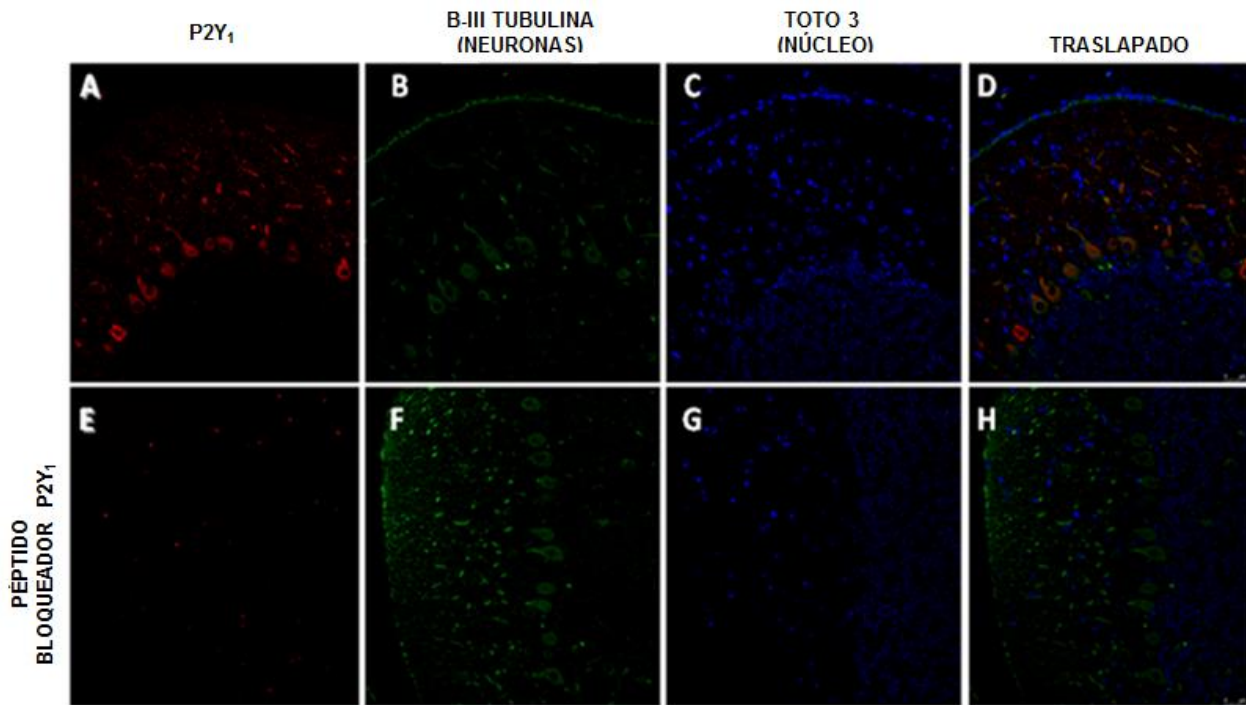


Figura 14. Control positivo con anticuerpo para el receptor $P2Y_1$. La inmunorreactividad del anticuerpo para el receptor $P2Y_1$ usado en este estudio se corroboró usando secciones histológicas del hipocampo de cobayo, un tejido que se conoce posee una alta densidad de este tipo de receptor purinérgico (28). La inmunorreactividad para $P2Y_1$ se observó en neuronas (panel A y D), lo cual desapareció al usar su respectivo péptido bloqueador (panel E-H).

En el epitelio de los cobayos no sensibilizados, el análisis del producto genético por RT-PCR mostró que el ARNm del receptor $P2Y_4$ es ligeramente perceptible, mientras que el ARNm para el receptor $P2Y_6$ fue más evidente. Sin embargo, en el epitelio de los animales sensibilizados con OVA, se observa un fuerte incremento en el ARNm de ambos receptores ($p < 0.05$ para cualquier receptor, **Fig. 15**).

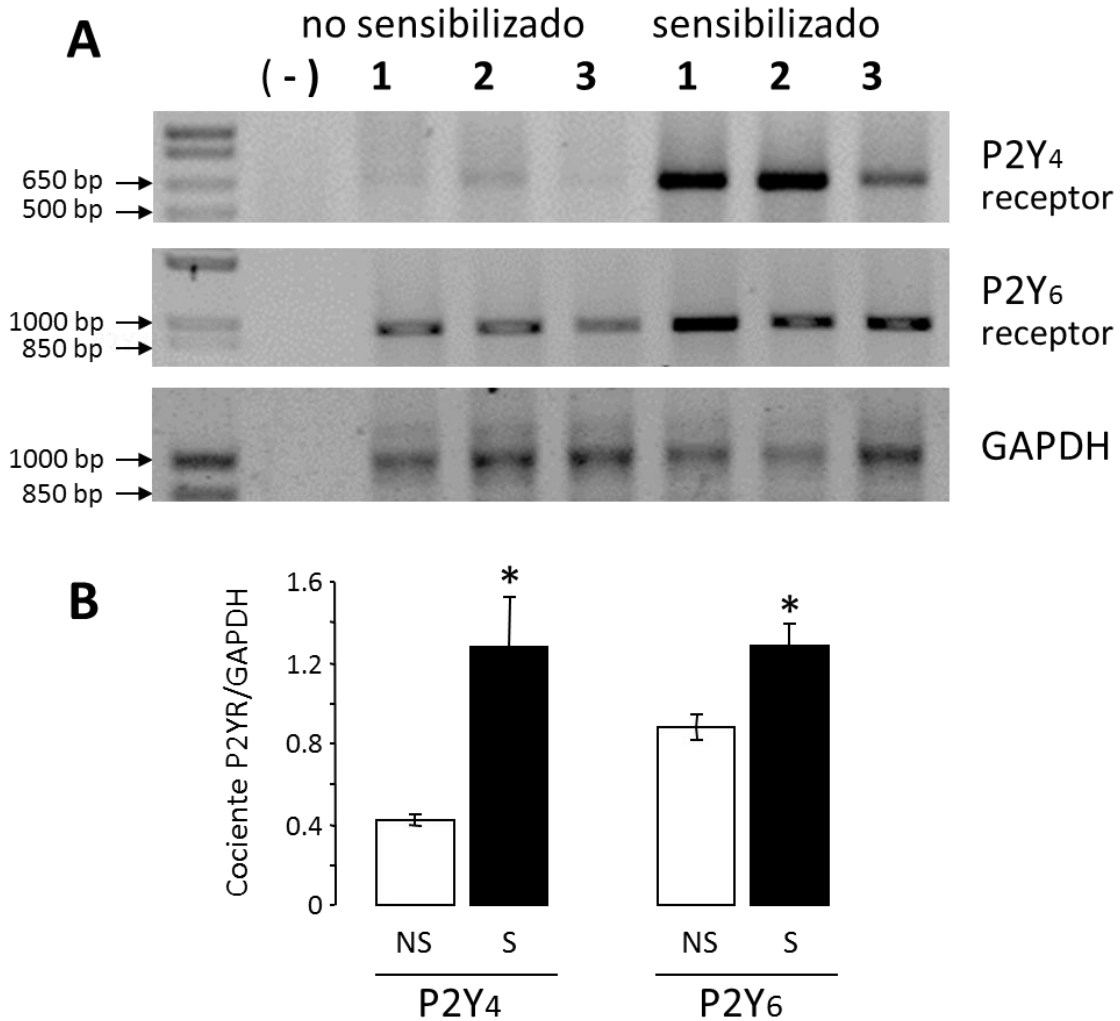


Figura 15. Detección de ARNm para los receptores P2Y₄ y P2Y₆ en epitelio traqueal de cobayo por RT-PCR. A) Producto de PCR de ~650 pb de longitud que corresponde a DNAc del P2Y₄ y el producto de PCR de ~1000 pb de longitud que corresponde al DNAc del P2Y₆. El panel inferior corresponde al DNAc constitutivo de GAPDH. El carril de al lado representa al control negativo sin templado. Los carriles restantes corresponden a los tres experimentos realizados en cobayos no sensibilizados y tres en cobayos sensibilizados. B) Datos de análisis densitométrico para los receptores P2Y que muestran una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$, prueba t de Student no pareada) en el ARNm de los receptores P2Y₄ y P2Y₆ de los animales sensibilizados en comparación con los animales no sensibilizados. Las barras muestran las media \pm EEM.

DISCUSIÓN

En los resultados obtenidos en nuestro modelo alérgico agudo en cobayos *in vivo*, la respuesta al reto antigénico fue amplificada con la previa inhibición de las ectonucleotidasas con ARL-67152, lo que implica que la cantidad de ATP extracelular liberado durante el reto antigénico es suficiente para producir un broncoespasmo severo,

pero que en condiciones normales el ATP liberado es rápidamente hidrolizado por las ectonucleotidasas. Cuando las concentraciones de ATP aumentan y no todo es metabolizado, llega al epitelio de la vía aérea provocando la producción y liberación de TXA₂ a través de la activación de los receptores P2Y (19). De acuerdo con su vía de señalización a través de Gq/11, los únicos receptores P2Y que podrían estar involucrados en la liberación de TXA₂ del epitelio de las vías aéreas son los receptores P2Y_{1, 2, 4 y 6} (5). Sin embargo, en este trabajo, mediante microscopía confocal y RT-PCR se encontró que los receptores P2Y expresados en epitelio de la vía aérea son los receptores P2Y₄ y P2Y₆, y su expresión se incrementa con el proceso de sensibilización. El aumento de la densidad de estos receptores favorecería una respuesta más intensa a los nucleótidos liberados durante la estimulación antigénica, especialmente en condiciones de inhibición de las ectonucleotidasas.

La respuesta incrementada al reto antigénico en el modelo *in vivo* cuando se inhiben las ectonucleotidasas con ARL-67156, se reduce aproximadamente en un ~ 85% con la administración de suramina. Este fármaco antagoniza los receptores P2Y excepto al P2Y₄ (29,30), por lo que el P2Y₆, probablemente, es el principal receptor involucrado en la magnificación del broncoespasmo. El 15% del incremento del broncoespasmo restante, parece ser responsabilidad del receptor P2Y₄ (29,30), ya que esta respuesta restante fue bloqueada al administrar RB2, un fármaco que antagoniza varios receptores P2Y, incluyendo el P2Y₄.

La caracterización farmacológica indicó que los receptores P2Y son los principales involucrados en esta respuesta. El antagonista del receptor de TXA₂ (SQ29548) evitó por completo la potenciación del broncoespasmo potenciado por ARL, por lo que podemos corroborar que la vía final por la cual el ATP está actuando se debe a la liberación de TXA₂.

La administración de apirasa vía intratraqueal (NTPDasa 1) en cobayos sensibilizados, anuló la potenciación del espasmo inducido por el reto antigénico que se produce al inhibir las ectonucleotidasas con ARL-67156, lo que sugiere que el efecto observado se debe a un fenómeno local y no sistémico.

Se encontraron altos niveles de ATP en el LBA recolectado cuando los animales eran sometidos a un reto antigénico previa inhibición de las ectonucleotidasas. Se sabe que moléculas de mayor tamaño que las purinas y las pirimidinas pueden cruzar la barrera epitelial en particular durante condiciones inflamatorias. Los resultados de las concentraciones de ATP en el LBA demuestran que los nucleótidos están llegando al borde luminal de la membrana epitelial; estos resultados concuerdan con lo observado en la administración intratraqueal de la apirasa.

Las plaquetas de cobayo pueden liberar ATP durante el reto antigénico, y por lo que se sabe está es la primera vez que el fenómeno es encontrado. Se ha sugerido que las plaquetas pueden estar involucradas en la patogénesis del asma. Se conoce que las plaquetas poseen receptores FcεRI y FcεRII (31), por lo que es razonable especular que en el modelo del broncoespasmo alérgico de cobayo el reto antigénico provoque activación plaquetaria con la subsiguiente liberación de nucleótidos, pero no se puede descartar la participación de otras células capaces de liberar ATP y otros nucleótidos, como los eritrocitos, basófilos y células endoteliales (32, 33, 34). Y también se debe tomar en cuenta la liberación de ATP estimulada por ATP de algunas células a través de la activación de receptores purinérgicos.

En el grupo de trabajo del Dr. Montaña, para investigar la liberación de ATP estimulada por ATP y los receptores purinérgico que pudieran estar involucrados, se realizaron experimentos con sangre de donadores sanos. Se separaron las células polimorfonucleares y mononucleares y se midió la concentración de fosfatos liberados en el tiempo (0, 4, 8, 16, 32, 62 y 128 minutos), bajo el estímulo de ATP (500 μ M). Al comparar el grupo estimulado con ATP y el grupo al que no se le dio ningún estímulo, se observa una diferencia altamente significativa en la concentración de fosfatos medidos, esto indica que el ATP fue metabolizado. Para caracterizar la participación de los receptores P2 en este fenómeno, se incubaron las células con distintos fármacos 10 minutos previos al estímulo con ATP: SKF (antagonista de receptores P2X), NEM (desacopla proteínas G, como los receptores P2Y) y suramina (antagonista de receptores P2). Se observó una disminución altamente significativa en la concentración de fosfatos al utilizar NEM y suramina, siendo esta última mayor, al compararlo con el grupo estimulado únicamente con ATP. No hubo diferencias entre el grupo incubado con SKF y el grupo con ATP. Los resultados obtenidos de estos experimentos, sugieren que el ATP es capaz de estimular la liberación de ATP, y que los principales receptores purinérgicos involucrados en este fenómeno son los P2Y (datos aún no publicados).

En los experimentos *in vitro*, se observó que la OVA produjo una contracción dependiente de la concentración tanto en anillos traqueales como en parénquimas de pulmón. Como se puede ver en la figura 10, la inhibición de las ectonucleotidasas por el ARL no modificó la respuesta de contracción inducida por la OVA, pero la mezcla de Suramina más RB2 provocó un desplazamiento a la derecha de la curva concentración respuesta a la OVA en parénquimas pulmonares y en los anillos traqueales. Igualmente con el levamisol se observó un corrimiento a la izquierda de la curva concentración respuesta a la OVA en anillos traqueales, pero no en parénquima de pulmón. Con estos resultados podemos suponer que las ectonucleotidasas que participan a nivel sistémico no son las mismas que actúan a nivel local, dado que el ARL-67156 no modificó la curva concentración respuesta a OVA ni en anillos traqueales ni en parénquima. La NPP2, la NPP3, TNAP y la PLAP han sido detectadas en el epitelio de la vía aérea y en parénquima pulmonar, pero son insensibles al ARL-67156 y probablemente son las responsables de la hidrólisis de ATP extracelular a nivel local (35). El corrimiento a la izquierda de la curva concentración respuesta de OVA con la adición de levamisol en la tráquea, sugiere la expresión de fosfatasa alcalina a nivel epitelial y no en parénquima pulmonar, ya que en este último no se vió efecto con el levamisol, lo cual se apoya con lo reportado sobre la localización de la fosfatasa alcalina no específica (TNAP o NSAP) y la placentaria (PLAP) en el epitelio de la vía aérea en humanos (36).

La potenciación del broncoespasmo inducido por reto antigénico en presencia de ARL-67156 parece implicar mecanismos sistémicos, porque esto no se observó en experimentos *in vitro*. Como se comentó anteriormente, es posible que los nucleótidos implicados en el broncoespasmo sean liberados por diversos elementos de la sangre, lo que implica que estos compuestos deben difundir desde el torrente sanguíneo al epitelio de las vías aéreas, y durante este viaje, ser catabolizados por las ectonucleotidasas, evitando de este modo la contracción del músculo liso bronquial. Nuestros datos sugieren que una parte importante de este catabolismo fue sensible a la ARL-67156. Este fármaco ha demostrado que inhibe a las NTPDasa 1 y 3, así como la NPP1 (35). Por lo tanto, en nuestros experimentos *in vivo*, es probable que NTPDasa 1 en endotelio y células mononucleares y polimorfonucleares (37, 38), así como NTPDasa 3 en plaquetas (39), sean los principales

responsables del control de los niveles de nucleótidos que se liberan sistemáticamente durante el reto antigénico.

CONCLUSIÓN

En conclusión, en este trabajo se ha descrito un nuevo papel protector de las ectonucleotidasas para evitar el efecto nocivo de ATP u otros nucleótidos durante el reto antigénico. Además, se encontró que el procedimiento de sensibilización *per se*, provoca un incremento en la expresión de los receptores P2Y₄ y P2Y₆ en el epitelio de las vías respiratorias, que parecen ser los dos principales receptores purinérgicos involucrados en el broncoespasmo inducido por nucleótidos durante el reto antigénico. Estos resultados son muy alentadores e invitan a explorar si estos mecanismos están presentes en los pacientes asmáticos, ya que a pesar de los múltiples tratamientos existentes para esta patología siguen existiendo sujetos refractarios al tratamiento o de difícil control, la hipótesis de que hay disminución en la actividad de las ectonucleotidasas podría estar relacionado con esta patología y/o sus exacerbaciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Montaña LM, Selman M, Ponce-Monter H, Vargas M. H. *Role of airway epithelium on the reactivity of smooth muscle from guinea pigs sensitized to ovalbumin by inhalatory method*. Res Exp Med. 1988. 188:167-173.
2. M.H. Karol. *Animal models of occupational asthma*. Eur Respir J, 1994, 7, 555–568.
3. Voet D, Voet J, W. Pratt. *Fundamentos de Bioquímica*. Ed. Panamericana. 2° edición. Buenos Aires. 2007.
4. Laguna J, et al. *Bioquímica de Laguna*. Ed manual moderno. 7° edición. México. 2013.
5. Burnstock G. *Historical review: ATP as a neurotransmitter*. TRENDS in Pharmacological Sciences. 2006. 27: 3.
6. Burnstock G, Verkhratsky A. *Purinergic Signalling and the Nervous System*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. 2012.
7. Fitz JG. *Regulation of cellular ATP release*. Trans Am Clin Climatol Assoc. 2007. 118: 199-208.
8. Burnstock G, Brouns I, Adriaensen D, Timmermans JP. *Purinergic Signaling in the Airways*. Pharmacological reviews. 2012. 64: A–AI.
9. Pankratov Y, Lalo U, Verkhratsky A, North Alan R. *Vesicular release of ATP at central synapses*. Pflugers Arch - Eur J Physiol. 2006. 452: 589–597.
10. Fenila J, Pérez C, Bacher Ct, Van Crombruggen K. *Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses*. Purinergic Signalling. 2013. 9:285–306.
11. Lazarowski ER. *Vesicular and conductive mechanics of nucleotide release*. Purinergic Signal. 2012. 3: 359-373.
12. North RA, Barnard EA. *Nucleotide receptors*. Curr Opin Neurobiol. 1997. 7:346-57.
13. Robson SC, Sévigny J, Zimmerman H. *The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance*. Purinergic Signal. 2006. 2:409–430.
14. Kukulski F, Levesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Knowles AF, Robson SC, Kirley TL, Sevigny J. *Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8*. Purinergic Signal. 2005.1:193–204.
15. Kukulski F, Lévesque S, Sévigny J. *Impact of Ectoenzymes on P2 and P1 Receptor Signaling*. Advances in Pharmacology. 2011. 61: 263-299.
16. Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N. *Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases*. Purinergic Signalling. 2012. 8:437–502.
17. Burnstock G. *Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission*. Physiol Rev. 2007. 87: 659-797.
18. North RA, Surprenant A. *Pharmacology of cloned P2X receptors*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2000. 40:563-80.
19. Flores-Soto E, Carbajal V, Reyes-García J, García-Hernández LM, Figueroa A, Checa M, Barajas-López C, Montaña LM. *In airways ATP refills sarcoplasmic reticulum via P2X smooth muscle receptors and induces contraction through P2Y epithelial receptors*. Pflugers Arch. 2011. 461:261-75.

20. Advenier C, Bidet D, Floch-Saint-Aubin A, Renier A. *Contribution of prostaglandins and thromboxanes to the adenosine and ATP-induced contraction of guinea-pig isolated trachea.* Br J Pharmacol. 1982. 77:39-44.
21. Barnes PJ, Chung KF, Page CP. *Inflammatory mediators and asthma.* Pharmacol Rev. 1988. 40: 49-84.
22. Global Initiative for asthma. *Pocket guide for asthma management and prevention.* 2012.
23. Barnes PJ. *Histamine and serotonin.* Pulm Pharmacol Ther. 2001. 14:329-339.
24. Bittleman DB, Casale TB. *Allergic Models and Cytokines.* Am J Respir Crit Care Med. 1994. 150: S72- 6.
25. Pellegrino R, Wilson O, Jenouri G, Rodarte JR. *Lung mechanics during induced bronchoconstriction.* J Appl Physiol. 1996. 81:964-75.
26. Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, Kool M, Willart MA, Muskens F, et al. *Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells.* Nat Med. 2007. 13:913-9.
27. Montano LM, Cruz-Valderrama JE, Figueroa A, Flores-Soto E, Garcia-Hernandez LM, Carbajal V, et al. *Characterization of P2Y receptors mediating ATP induced relaxation in guinea pig airway smooth muscle: involvement of prostaglandins and K⁺ channels.* Pflugers Arch. 2011. 462:573–585.
28. Kittner H, Franke H, Fischer W, Schultheis N, Krugel U, Illes P. *Stimulation of P2Y1 receptors causes anxiolytic-like effects in the rat elevated plus-maze: implications for the involvement of P2Y1 receptor-mediated nitric oxide production.* Neuropsychopharmacology. 2003. 28:435-444.
29. Von Kugelgen I. *Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes.* Pharmacol Ther. 2006. 110:415-32.
30. 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. 140:1177-86.
31. Capron M, Jouault T, Prin L, Joseph M, Ameisen JC, Butterworth AE, et al. *Functional study of a monoclonal antibody to IgE Fc receptor (Fc epsilon R2) of eosinophils, platelets, and macrophages.* J Exp Med. 1986. 164:72-89.
32. Montalbetti N, Leal Denis MF, Pignataro OP, Kobatake E, Lazarowski ER, Schwarzbach PJ. *Homeostasis of extracellular ATP in human erythrocytes.* J Biol Chem. 2011. 286:38397-38407.
33. Osipchuk Y, Cahalan M. *Cell-to-cell spread of calcium signals mediated by ATP receptors in mast cells.* Nature. 1992. 359:241-4.
34. Yamamoto K, Furuya K, Nakamura M, Kobatake E, Sokabe M, Ando J. *Visualization of flow-induced ATP release and triggering of Ca²⁺ waves at caveolae in vascular endothelial cells.* J Cell Sci. 2011. 124:3477-3483.
35. Levesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Sevigny J. *Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases.* Br J Pharmacol. 2007. 152:141–150.
36. Picher M, Burch LH, Hirsh AJ, Szychala J, Boucher RC. *Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase. Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways.* J Biol Chem. 2003. 278:13468-13479.

37. Atkinson B, Dwyer K, Enjyoji K, Robson SC. *Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: potential as therapeutic targets*. *Blood Cells Mol Dis*. 2006. 36: 217–222.
38. Glenn JR, White AE, Johnson A, Fox SC, Behan MW, Dolan G et al. *Leukocyte count and leukocyte ecto-nucleotidase are major determinants of the effects of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate on platelet aggregation in human blood*. *Platelets*. 2005. 16:159–170.
39. Frassetto SS, Dias RD, Sarkis JJ. *Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (APYRASE, EC 3.6.1.5) in rat blood platelets*. *Mol Cell Biochem*.1993.129:47–55.

APÉNDICE

Inhibition of extracellular nucleotides hydrolysis intensifies the allergic bronchospasm. A novel protective role of ectonucleotidases

J. Chávez¹, M. H. Vargas¹, D. C. Rebolgar-Ayala², V. Díaz-Hernández³, J. E. Cruz-Valderrama², E. Flores-Soto², M. Flores-García⁴, N. N. Jiménez-Vargas⁵, C. Barajas-López⁵ & L. M. Montaña²

¹Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México DF;

²Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF; ³Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF; ⁴Departamento de Biología Molecular, Instituto Nacional de Cardiología, México DF; ⁵División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, S.L.P., México

To cite this article: Chávez J, Vargas MH, Rebolgar-Ayala DC, Díaz-Hernández V, Cruz-Valderrama JE, Flores-Soto E, Flores-García M, Jiménez-Vargas NN, Barajas-López C, Montaña LM. Inhibition of extracellular nucleotides hydrolysis intensifies the allergic bronchospasm. A novel protective role of ectonucleotidases. *Allergy* 2013; DOI: 10.1111/all.12113.

Keywords

allergic bronchospasm; ATP; ectonucleotidases; epithelium; P2Y receptors.

Correspondence

Dr Luis M. Montaña, Departamento de Farmacología, Edificio de Investigación, sexto piso, laboratorio 3, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CP 04510, México DF, México.
Tel/fax: +55566665868
E-mail: Immr@unam.mx

Accepted for publication 13 December 2012

DOI:10.1111/all.12113

Edited by: Angela Haczku

Abstract

Background: Nucleotides released to the extracellular space stimulate purinergic receptors, and their effects are modulated by ectonucleotidases. The role of ATP in the allergic bronchospasm has been scantily studied.

Methods: We used several techniques (plethysmography, organ baths, confocal microscopy, RT-PCR, ATP measurement) to explore the role of nucleotides and ectonucleotidases in the allergic bronchospasm in guinea pigs.

Results: While allergenic challenge with a low-dose ovalbumin (OVA) only produced a small bronchospasm (~2-fold the basal lung resistance), previous inhibition of ectonucleotidases by ARL-67156 greatly intensified this response (~11-fold the basal lung resistance, with 44% mortality). Bronchoalveolar lavage fluid obtained during this bronchospasm contained increased ATP concentration. This potentiation was abolished by antagonism of purinergic receptors (suramin+RB2) or TXA₂ receptor (SQ29548), or by intratracheal apyrase. In tracheal rings and lung parenchyma strips, OVA caused a concentration-dependent contraction. Suramin+RB2 or levamisole produced a significant rightward displacement of this response, and ARL-67156 did not modify it. Platelets stimulated with OVA released ATP. Confocal images of nonsensitized tracheas showed slight fluorescence for P2Y₆ receptors in epithelium and none for P2Y₄. Sensitized animals showed strong fluorescence to both receptors and to alkaline phosphatase in the airway epithelium. This correlated with a large increment in mRNA for P2Y₄ and P2Y₆ receptors in sensitized animals.

Conclusions: Nucleotides greatly potentiate the allergic bronchospasm when ectonucleotidases activity is diminished, and this effect is probably favored by the upregulation of P2Y₄ and P2Y₆ receptors in airway epithelium during sensitization. These results prompt for further research on these mechanisms in human asthma.

The potential role of extracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP) and related nucleotides in asthma has not been well documented, but some studies point out that ATP might be relevant. In 1996, Pellegrino et al. reported the lung function in eight asthmatic and eight healthy subjects who underwent bronchial challenge with inhaled methacholine, histamine,

and ATP (1). According to their data, airways from asthmatic subjects were 6400 times more sensitive to inhaled ATP than healthy controls, as evaluated by the provocative concentration causing a 15% decrease in the forced expiratory volume at first second (FEV₁). Moreover, among asthmatic subjects, inhaled ATP was 51 times more potent than

methacholine and 87 times more potent than histamine for producing the 15% fall of FEV₁. In 2007, Idzko et al. observed that during an antigenic challenge, a sharp increment in ATP concentrations was detected in the bronchoalveolar lavage (BAL) of asthmatic subjects or sensitized mice (2). Likewise, these authors found that eosinophilia, airway inflammation, and bronchial hyperresponsiveness disappeared when ATP hydrolysis was increased by exogenously administered apyrase or when suramin (a nonselective antagonist of purinergic receptors) was used.

The above-mentioned studies clearly indicate that ATP has a potent biological ability to trigger airway smooth muscle contraction. However, it is reasonable to speculate that such effect will be modulated by its quick hydrolysis by ectonucleotidases. There are three major groups of ectonucleotidases: the ectonucleotide triphosphate diphosphohydrolases (NTPDase), the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases (NPP) and the alkaline phosphatases. Eight different genes codify for the eight members of NTPDases. In four of them (NTPDase1, 2, 3, 8), the catalytic moiety is located in the extracellular surface of the plasma membrane and has affinity for ATP and ADP, and the remaining four (NTPDase4, 5, 6, 7) have affinity for nucleotides other than ATP (3). Of the seven members of the NPP family, three (NPP1, 2, 3) are also attached to plasma membrane with their catalytic moiety faced extracellularly and have affinity for ATP and other nucleotides (4, 5). Finally, five isoenzymes are recognized for alkaline phosphatase (AP): intestinal AP, tissue nonspecific AP (TNAP or NSAP), placental AP (PLAP), germ-like AP, and embryonic AP (6).

Thus, the aim of the present work was to explore the consequences of ectonucleotidases inhibition during the bronchospasm induced by antigenic challenge in a guinea pig model of allergic asthma and to evaluate the subtype of P2Y receptors located in the airway epithelium involved in this phenomenon.

Materials and methods

Detailed methods are described in the online Data S1.

Sensitization procedure and antigenic challenge

Guinea pigs were sensitized to ovalbumin (OVA), and antigenic challenge was accomplished with a single intravenous bolus of low-dose OVA (100 µg/kg).

Plethysmography for mechanically ventilated animals

Lung resistance (RL) was measured in a Buxco closed-chamber plethysmograph. The control group only received the antigenic challenge. All the remaining (experimental) groups received 5 mg/kg iv ARL-67156, an inhibitor of ectonucleotidases (7, 8) before OVA. Some experimental groups also received: (i) 20 mg/kg suramin, an antagonist of P2X_{1, 2, 3, 5} and P2Y_{1, 2, 6, 11, 12, 13} receptors (9–13), (ii) suramin plus 7.7 mg/kg RB2, an antagonist of P2Y_{1, 4, 6, 11, 12, 13} receptors (9, 11–13), or (iii) 0.3 mg/kg SQ29548, an antagonist of the TXA₂ receptor (14). Furthermore, a separate group received

300 units apyrase (a NTPDase1) intratracheally before ARL-67156 administration. We corroborated that ARL-67156 causes a concentration-dependent inhibition of ectonucleotidase activity (release of inorganic phosphate measured with malachite green) from blood leukocytes from sensitized guinea pigs (data not shown).

Organ baths

To investigate the role of nucleotides locally released in tracheal rings and parenchymal strips during antigenic challenge, a concentration–response curve to OVA was performed with or without preincubation with 100 µM ARL-67156, 100 µM suramin plus 100 µM RB2, or 10 µM levamisole.

Immunofluorescence and alkaline phosphatase activity

Tracheas from sensitized and nonsensitized guinea pigs were used to detect P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, and P2Y₆ receptors. Activity of alkaline phosphatase was detected by using fast red substrate in tracheas from sensitized guinea pigs.

RT-PCR

Total RNA was isolated from sensitized and nonsensitized guinea pig tracheal epithelium, and primers for P2Y₄ and P2Y₆ were used.

Measurement of ATP released by platelets and in BAL

Release of ATP by platelet-rich plasma was measured by the luciferase assay. ATP concentration in BAL fluid was measured by using a commercial colorimetric assay.

Data analysis

Interval variables were compared using Student's *t*-test or ANOVA followed by Dunnett's or Tukey's test. Differences in concentration–response curves were evaluated using ANOVA followed by Dunnett's tests for regression lines (15). Statistical significance was set at *P* < 0.05 bimarginally.

Results

Lung resistance basal values in all studied animals averaged 0.609 ± 0.015 cmH₂O/ml/s, mean ± SEM, *n* = 41. Antigenic challenge with a low-dose (100 µg/kg) OVA produced a non-significant mild increment in RL of about 2-fold the basal value (*P* = 0.08, *n* = 10) (Fig. 1A). By contrast, when ectonucleotidases were inhibited by ARL-67156, the same low dose of OVA caused a severe bronchospasm in most animals, reaching about 11-fold the basal value (*P* = 0.008, *n* = 9) and producing a 44.4% mortality, which suggested that nucleotides were involved in this enhanced response in *in vivo* conditions. Previous administration of 300 units intratracheal apyrase completely abolished the potentiation effect of ARL-67156 on the antigenic challenge, inasmuch as the resulting bronchospasm (484 ± 89% increase in RL, *n* = 8) was not

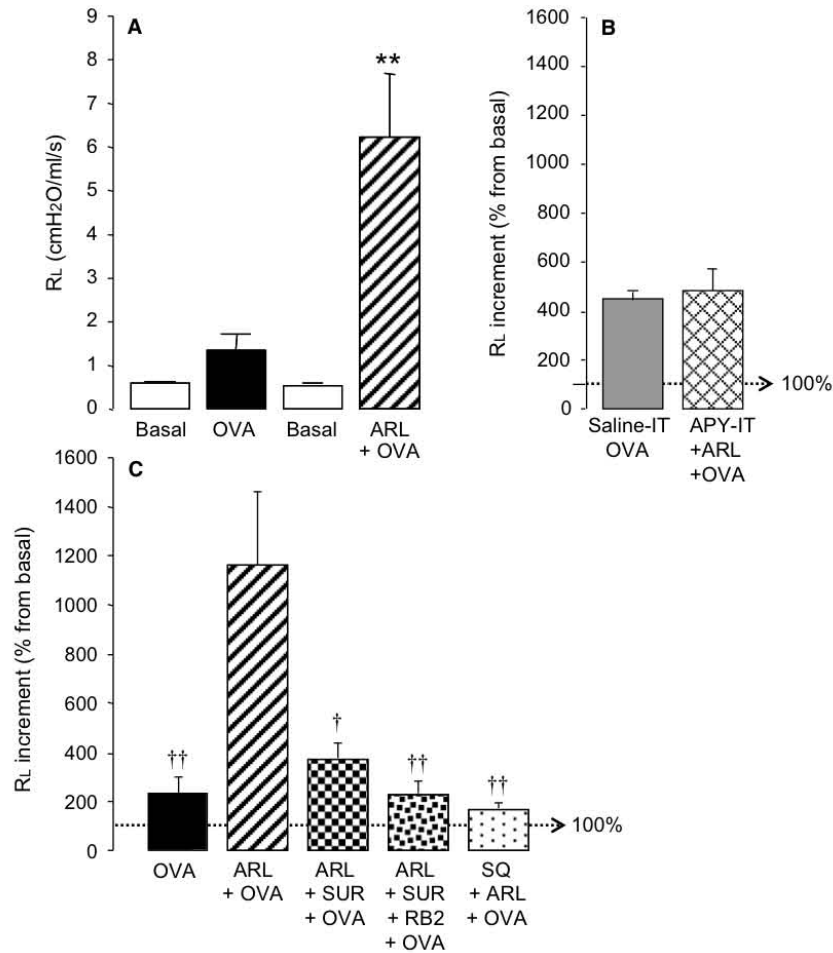


Figure 1 Potentiation of the antigen-induced bronchospasm through inhibition of ectonucleotidases by ARL-67156, and the effect of apyrase and antagonists of P2Y and TXA₂ receptors. A) In sensitized guinea pigs, a low dose of ovalbumin (OVA, 100 µg/kg, iv) induced a relatively small increment in the total lung resistance (RL), as compared with their basal values ($n = 10$). Previous inhibition of ectonucleotidases by 5 mg/kg iv ARL-67156 (ARL) greatly amplified the response to the antigenic challenge ($n = 9$). B) Previous administration of 300 units of intratracheal apyrase (APY-IT) completely abolished the potentiation effect of ARL on the antigenic challenge, as assessed by the lack of statistically significant difference with

respect to the sham-sensitized control group receiving intratracheal saline solution plus 'challenge' with OVA (Saline-IT, $n = 8$, unpaired Student's *t*-test). C) The bronchospasm potentiation induced by inhibition of ectonucleotidases was abolished by antagonists of P2Y and TXA₂ receptors. SUR = suramin (20 mg/kg); RB2 = reactive blue 2 (7.7 mg/kg), SQ = SQ29548 (0.3 mg/kg). In panels B and C, the number of experiments was 4–10 for each group. Bars represent the mean and vertical lines the SEM. ** $P < 0.01$, as compared with the basal value (unpaired Student's *t*-test). † $P < 0.05$ and †† $P < 0.01$ as compared with the ARL+OVA group (ANOVA followed by Dunnett's test).

different from the control group without ARL-67156 ($446 \pm 34\%$ increase in RL, $n = 4$, Fig. 1B).

In Fig. 1C, the large increase in RL induced by ARL-67156 was partially blocked by further administration of suramin before antigenic challenge ($P < 0.05$, $n = 5$) and fully abolished by the combination of suramin plus RB2 ($P < 0.01$, $n = 4$) or by SQ29548 ($P < 0.01$, $n = 6$).

To evaluate whether the participation of nucleotides that we observed in *in vivo* conditions was also occurring locally in the respiratory system, we studied tracheal rings ($n = 6$ –7 per group) and lung parenchyma strips ($n = 4$ per group) from sensitized guinea pigs. In these experiments, increasing

concentrations of OVA caused a concentration-dependent contraction in both tissues. As can be seen in Figs 2A and 2B, inhibition of ectonucleotidases by ARL-67156 did not modify the contractile responses to OVA, but suramin (100 µM) plus RB2 (100 µM) caused a rightward displacement of the concentration–response curve to OVA. For this last analysis, although EC₅₀ between control and experimental tissues did not reach statistical significance, the evaluation of their respective regression lines showed a clear difference in the intercepts both in tracheas ($P < 0.05$) and lung parenchymas ($P < 0.01$). Likewise, levamisole (10 µM) also produced a rightward shift in the concentration–response curve

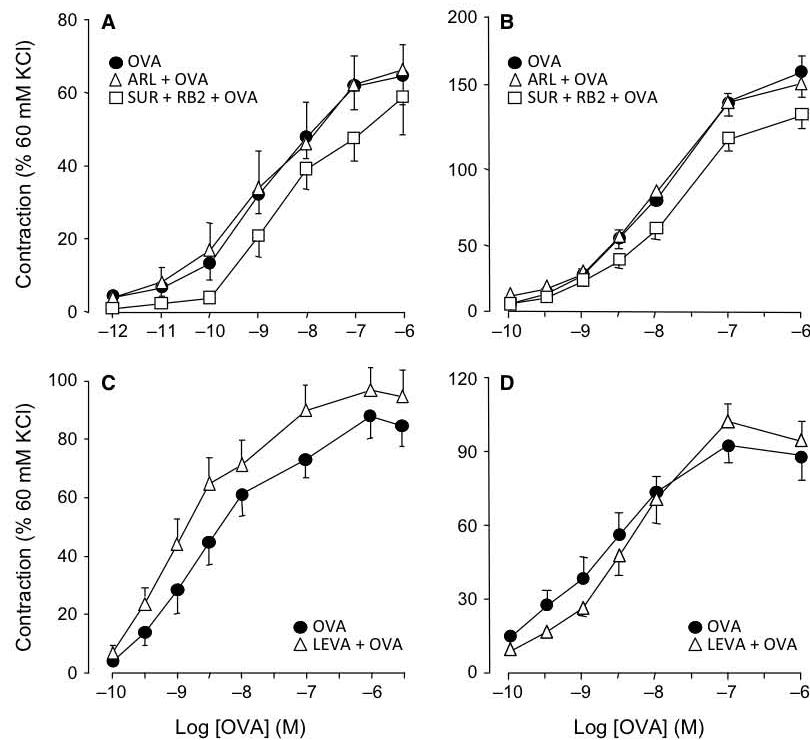


Figure 2 Effect of ectonucleotidases inhibition and/or antagonism of P2Y receptors on the contractile response induced by antigenic challenge in sensitized tissues. Inhibition of ectonucleotidases by ARL-67156 (ARL, 100 μ M) did not affect ovalbumin (OVA)-induced contraction, while suramin (SUR, 100 μ M) plus RB2 (100 μ M) caused a rightward displacement of the cumulative concentration–response curve to OVA either in tracheal rings (A) or in lung parenchyma strips (B) from sensitized guinea pigs. Evaluation of

differences between regression lines of control and experimental groups showed statistical difference in intercepts of OVA group versus SUR+RB2 group either in tracheas ($P < 0.05$) or in lung parenchyma strips ($P < 0.01$, Dunnett's tests for regressions). Likewise, levamisole (LEVA, 10 μ M) displaced rightward the concentration–response curve to OVA in tracheas ($P < 0.005$, Student's *t*-test for regressions, C), but not in lung parenchymas (D).

to OVA in tracheal rings ($P < 0.005$ for intercepts, Fig. 2C) but not in lung parenchymas (Fig. 2D). Negative controls (tracheas from nonsensitized guinea pigs) did not respond to OVA (not illustrated).

ATP released from platelets under stimulation with 1 μ M OVA amounted 0.50 ± 0.25 nM ($n = 7$), corresponding to almost half the ATP released from positive control experiments in which platelets were stimulated with 5 μ M ADP (1.06 ± 0.26 nM, $n = 4$, Fig. 3A). Negative controls (platelets from sensitized guinea pigs, $n = 4$) did not respond to a sham challenge with saline.

ATP concentration measured in the BAL fluid recovered shortly after an antigenic challenge-induced bronchoconstriction ($n = 12$) was slightly higher than a sham-sensitized group (but lacking statistical significance, $n = 5$). However, when compared with animals pretreated with ARL-67156 ($n = 6$), a significant increase in ATP could be observed (191%, $P < 0.01$) (Fig. 3B). Intratracheal administration of apyrase (dissolved in 1 ml saline) prevented the ARL-67156-induced increase in ATP levels, as compared with its control group that received only 1 ml saline before challenge ($P = 0.54$).

Confocal images of tracheas obtained from sensitized guinea pigs showed strong fluorescence to P2Y₄ and P2Y₆ receptors in the luminal border of airway epithelium, and the former also had intense expression in the airway smooth muscle (Fig. 4, panel E–H and M–P, respectively). By contrast, in nonsensitized tracheas, a mild fluorescence in epithelium was only observed for P2Y₆ receptors (Fig. 4, panel I–L), but not for P2Y₄ receptors (Fig. 4, panel A–D). Specificity of immunolabeling for both purinoceptors was corroborated as observed in supplemental online Fig. A (panel I–L and M–P, respectively). On the other hand, in sensitized tracheas, P2Y₁ and P2Y₂ receptors were absent in airway epithelium, although the latter was observed in airway smooth muscle and the submucosal layers (supplemental online Fig. A, panel A–D and E–H, respectively). As immunostaining for P2Y₁ receptor could not be detected anywhere, a positive control with its blocking peptide was carried out in guinea pig hippocampus (supplemental online Fig. B). A negative control for P2Y₂ receptor with its blocking peptide was already carried out in a previous work (16).

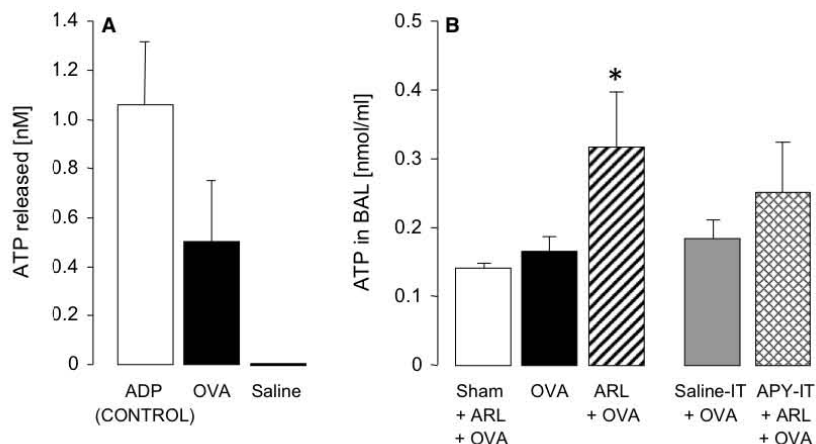


Figure 3 Effect of antigenic challenge on the ATP release from guinea pig platelets and on BAL fluid ATP concentrations. In panel A, closed bar corresponds to ATP released by OVA (1 μ M), while open bar represents the ATP released by a positive control (5 μ M ADP). Addition of saline solution did not produce any effect. In panel B, ATP concentration observed in BAL fluid after an allergic bronchoconstriction with OVA was slightly higher than those found in the

sham-sensitized group, but greatly increased by previous administration of ARL-67156 (ARL, * $P < 0.01$, ANOVA and Tukey's test). Intratracheal administration of apyrase (APY-IT, 300 units dissolved in 1 ml saline) prevented the ARL-induced increase in ATP levels, as compared with its control group that received only 1 ml of intratracheal saline before challenge (Saline-IT, $P = 0.54$). Bars represent the mean and vertical lines the SEM of 4–12 experiments.

With respect to alkaline phosphatase, confocal images showed that activity of this enzyme was minimal in airway epithelium from nonsensitized guinea pigs (Fig. 5, panels A–D), but it was greatly increased in sensitized animals (Fig. 5, panels E–H). We corroborated that staining corresponded to alkaline phosphatase activity because it was fully annulated by levamisole (Fig. 5, panel I).

In airway epithelium from nonsensitized guinea pigs, the gene product analysis by RT-PCR showed that mRNA for P2Y₄ receptor was only slightly noticeable, while the mRNA for P2Y₆ was more evident. However, in epithelium from animals sensitized to OVA, a large increment in mRNA for both purinoceptors was observed ($P < 0.05$ for either receptor, Fig. 6).

Discussion

In this guinea pig model of acute allergic bronchospasm, we found that the response to the antigen was greatly magnified by the previous inhibition of ectonucleotidases. Pharmacological characterization of this enhanced response indicated that P2Y receptors were the main purinoceptors involved. Additionally, we found that the main P2Y receptors expressed in airway epithelium were P2Y₄ and P2Y₆ and that their expression was increased after the sensitization procedure. The antagonism of TXA₂ receptor fully avoided the potentiation of the bronchospasm, thus corroborating that the final pathway by which ATP or other nucleotides such as UTP or UDP were acting was due to TXA₂ release. This implies that the amount of extracellular purines or pyrimidines released during the antigenic challenge would be enough to produce a severe bronchospasm, but that in normal conditions the

airway obstruction is prevented by their quick hydrolysis by ectonucleotidases.

Nucleotides released to the extracellular space stimulate purinergic P2X and P2Y receptors in different tissues, including the airways. P2X receptors are ligand-gated nonselective cation channels that are classified into seven subtypes (P2X₁ to P2X₇) (17). In the smooth muscle from guinea pig airways, P2X₁, P2X₃, and at less extent P2X₂ are the main subtypes of P2X receptors, and their functional role is not to contract smooth muscle but to refill the sarcoplasmic reticulum with Ca²⁺ (18). By contrast, P2Y receptors, which can be stimulated by ATP, ADP, UTP, and UDP (9), belong to the family of G protein-coupled receptors and comprise eight subtypes: P2Y₁, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14. The first four are linked to elevation of cytosolic Ca²⁺ through the G_{q/11} pathway (19). In airway smooth muscle, at least P2Y₂ and P2Y₄ cause relaxation through the release of and autocrine stimulation by PGE₂ (18, 20). However, in guinea pig airway epithelial cells, one or more of these four P2Y receptors are known to stimulate the release of thromboxane A₂ (TXA₂), although the specific P2Y receptor subtype involved in this effect is yet unknown (18, 21, 22). In this context, in 1982, Advenier et al. (21) demonstrated that the guinea pig tracheal contractile response to ATP was greatly diminished by two inhibitors of thromboxane synthase, strongly suggesting that this response was dependent on TXA₂. Some years later, Fedan et al. (22) showed that this contractile response was dependent of airway epithelium. Recently, we have corroborated both findings in our experimental conditions, as the guinea pig tracheal contraction induced by ATP was largely reduced by indomethacin and fully abolished by elimination of airway epithelium (18). Thus, in this animal species, the final effect of ATP is

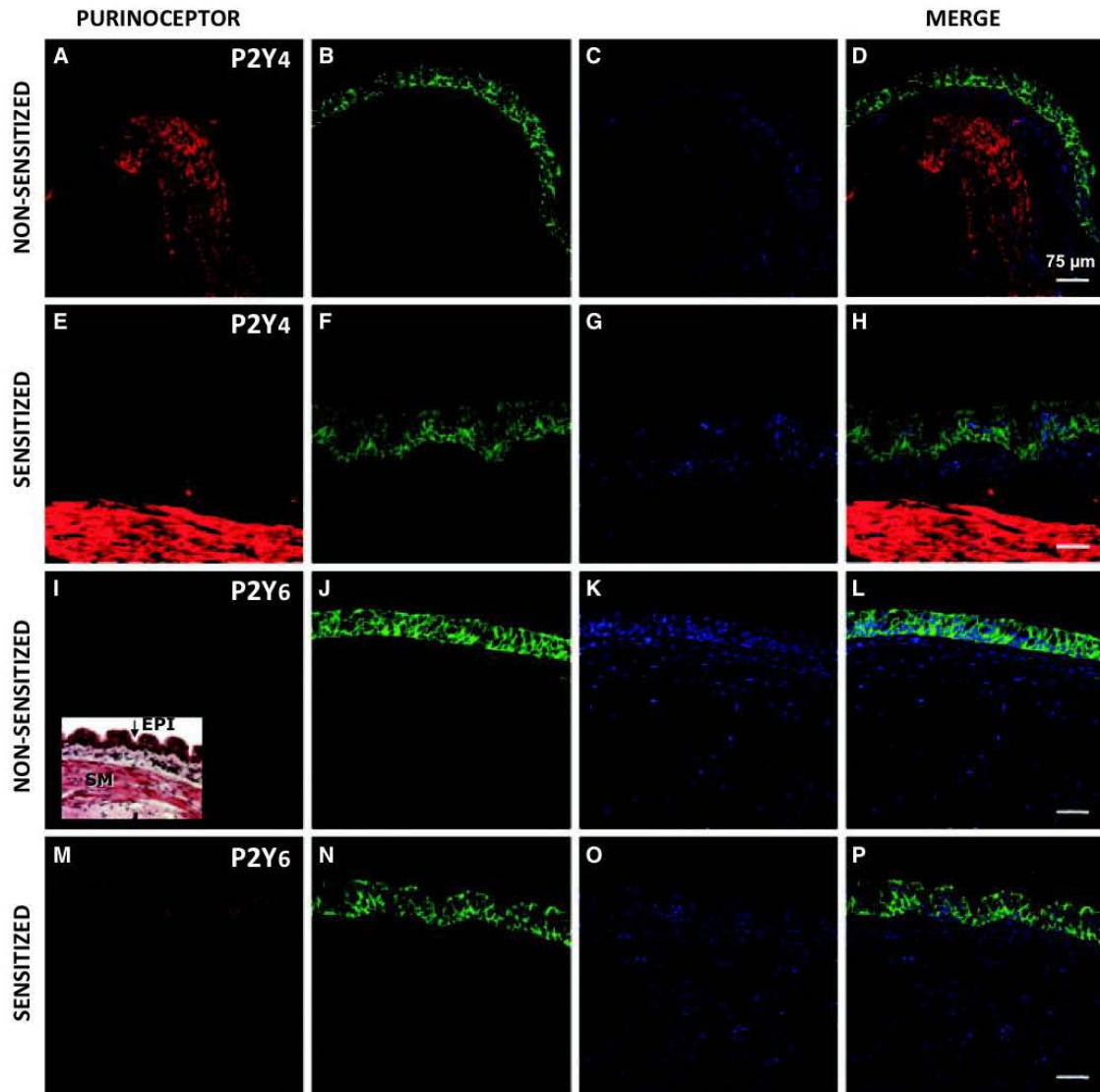


Figure 4 Confocal microscopy for P2Y₄ and P2Y₆ receptors in tracheas from sensitized and nonsensitized guinea pigs. Details of the content in each column of panels are as follows. The first column shows immunoreactivity to P2Y₄ and P2Y₆ receptors (stained red), while the second and third show fluorescence for cytokeratin in the airway epithelium (stained green) and DAPI for cells' nuclei (stained blue), respectively. The last column shows the merge of the three previous columns. In this merged images, P2Y₄ receptors were mainly localized in airway smooth muscle, but not in epithelium, of nonsensitized tracheas (panel D). In

sensitized tissues, this fluorescence to P2Y₄ was greatly increased in airway smooth muscle and, more importantly, it was now observed in the luminal border of airway epithelium (panel H). With respect to P2Y₆ receptors, in nonsensitized tissues, the fluorescence was slightly diffused along the epithelium only (panel L), but in tracheas from sensitized animals, a sharp increment in fluorescence was clearly observed in the luminal edge of epithelial cells (panel P). The inset in panel I corresponds to an hematoxylin–eosin staining to show location of smooth muscle (SM) and airway epithelium (EPI).

the production of airway smooth muscle contraction indirectly through the release of TXA₂ (21).

Our data indicate that different pools of extracellular nucleotides might be involved in the allergic response *in vivo* and *in vitro*. Thus, bronchospasm was potentiated by ARL-67156, and this enhanced response was mostly mediated by purinoceptors, whereas the contraction of tracheal and lung parenchyma tissues was not potentiated by ARL-67156, and it was partly mediated by purinoceptors. Regarding *in vivo* experiments, there are some clues indicating that platelets

might be a major source of nucleotides during the antigenic challenge, as platelets possess large amounts of ATP stored in their secretory granules (up to ~1 M) (23). Furthermore, we found that platelets from guinea pig can release ATP during the antigenic challenge, and as far as we know, this is the first time that such phenomenon is reported. In previous studies, platelets have been suggested to be involved in the asthma pathogenesis. Thus, antigenic challenge in sensitized mice induces platelet accumulation in the lung capillaries (24), and in human bronchi, this type of challenge increases

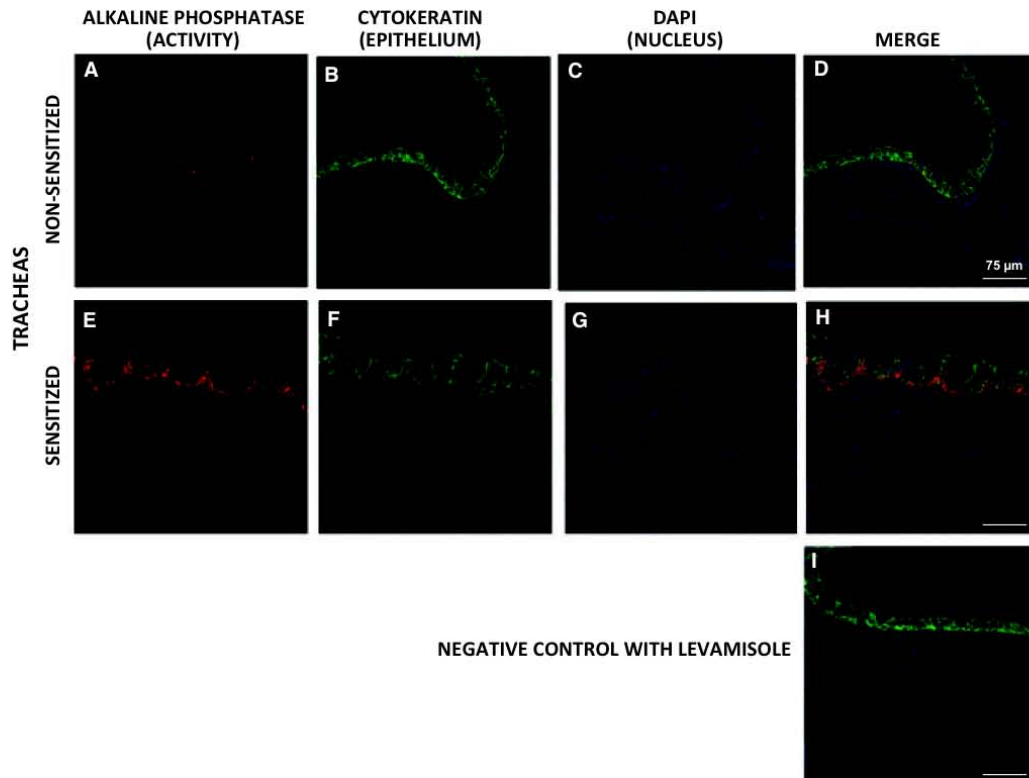


Figure 5 Alkaline phosphatase activity in tracheas from nonsensitized and sensitized guinea pigs. The enzyme activity (stained red) was only localized to airway epithelium (stained green), being minimal in nonsensitized animals (panels A–D) and greatly increased in

sensitized guinea pigs (panels E–H). Nuclei were stained blue. Negative control was carried out by inhibition of alkaline phosphatase activity with levamisole (panel I).

plasma levels of platelet mediators, implicating their intravascular activation by the antigen (25). Finally, platelets are known to possess FcεRI and FcεRII receptors (26, 27). Therefore, it is reasonable to speculate that in our guinea pig model of allergic bronchospasm, the antigenic challenge triggered platelet activation with subsequent release of nucleotides. However, the potential role of other cells that can also release ATP or other nucleotides, such as erythrocytes, basophils, and endothelial cells (28–30), or even the local release of ATP from airway epithelial cells (31), cannot be discarded, especially when considering the possibility that ATP can release more ATP from some cells through purinergic receptor stimulation (29).

In the absence of ARL-67156, ATP or other nucleotides released by the antigenic challenge should be rapidly hydrolyzed by ectonucleotidases. However, under conditions of ectonucleotidases inhibition, the increased quantities of extracellular nucleotides will reach the airway epithelium to produce the secondary release of TXA₂ via activation of P2Y receptors. This hypothesis was supported by our finding that higher levels of ATP could be recovered from BAL fluid when animals submitted to an antigenic challenge were pre-treated with the ectonucleotidase inhibitor ARL-67156. Furthermore, we found that intratracheal apyrase was able to abolish the potentiation of RL caused by the ARL-67156 (as

can be seen Fig. 1B), supporting that at least the final events are related to ATP reaching the luminal surface of airway epithelial cells to stimulate P2Y₄ and P2Y₆ receptors, already overexpressed by the sensitization procedure, as commented below. The fact that in our *in vivo* experiments with ARL-67156 the resulting bronchospasm was so severe (causing up to 44% mortality) implies that ectonucleotidases play a crucial role against the noxious effect of nucleotides. To our knowledge, this protective role of ectonucleotidases has not been described previously.

According to their signaling pathway through G_{q/11}, the only P2Y receptors that could be involved in the release of TXA₂ from airway epithelium are P2Y₁, 2, 4 and 6. However, we found that P2Y₁ and P2Y₂ were absent in the airway epithelium, thus leaving P2Y₄ and P2Y₆ the only two purinergic receptors potentially involved in TXA₂ release. Some studies showed that P2Y₂ receptors were present in airway epithelial cells from humans and rodents (32, 33). In the present study, the lack of detection of epithelial P2Y₂ receptors (even when sensitization notably increased the expression of other purinergic receptors) was not surely due to a low sensitivity of the confocal technique, as this procedure was sensitive enough to disclose the presence of P2Y₂ receptors in airway smooth muscle. In the *in vivo* pharmacological experiments, the ARL-67156-induced heightened response to the

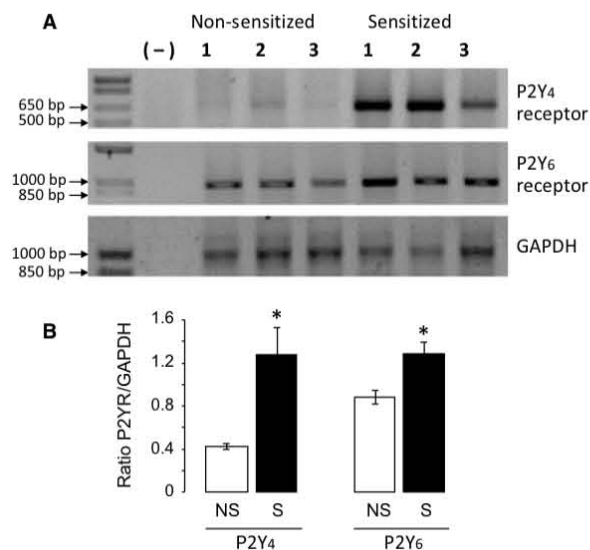


Figure 6 Detection of mRNA for P2Y₄ and P2Y₆ receptors in guinea pig tracheal epithelium, as revealed by RT-PCR. A) The PCR product ~650 bp length corresponds to P2Y₄ cDNA (upper) and the PCR product ~1000 bp length corresponds to P2Y₆ cDNA (middle). The lower panel corresponds to constitutive cDNA of GAPDH. Lane at the left corresponds to 1 Kb Plus DNA Ladder. The next lane is a negative control without template. The remaining lanes correspond to three experiments performed in nonsensitized guinea pigs and three experiments in sensitized animals. B) Densitometry data analysis for P2Y receptors (P2YR) showing a statistically significant increment ($*P < 0.05$, nonpaired Student's *t*-test) in mRNA for P2Y₄ and P2Y₆ receptors in sensitized (S) guinea pigs, as compared with control nonsensitized (NS) animals. Bars correspond to mean \pm SEM.

antigen was reduced by ~85% if guinea pigs were pretreated with suramin. As this last drug antagonizes all P2Y receptors excepting P2Y₄ (IC₅₀ > 1 mM) (12, 13), then P2Y₆ seems to be the major purinoceptor involved in such magnified bronchospasm. The remaining 15% of the exceeding bronchospasm seems to be mediated through P2Y₄, as this residual response was blocked by further addition of RB2, a drug that antagonizes several P2Y receptors, including P2Y₄ (IC₅₀ = 18.5 μ M) (12, 13).

At present, we do not know at what extent each of the several purines or pyrimidines participates in the epithelium-dependent contractile response. Pharmacological studies have demonstrated that P2Y₄ and P2Y₆ receptors are stimulated preferentially by UTP and UDP, respectively, with much less sensitivity to ATP (9, 34). However, in a previous study, we found that both ATP and ATP γ S (a nonhydrolysable ATP analog) were capable to produce a strong (up to 70% of the 60 mM KCl response) concentration-dependent contraction of guinea pig tracheal rings (18). Moreover, suramin and RB2 blocked up to ~30% and ~55% of the ATP-induced contraction, implying the involvement of P2Y₄ and/or P2Y₆ receptors. Thus, the role of ATP might be as relevant as for UTP or UDP, at least in guinea pigs. Nevertheless, whatever

the nucleotide(s) involved in this effect, they are all metabolized by ectonucleotidases (8), and therefore, the activity of these enzymes would still be important to protect from allergic bronchospasm. Finally, the fact that the enhanced bronchospasm was fully avoided by a TXA₂ receptor antagonist (SQ29548) corroborated that the nucleotides-induced bronchospasm was indirectly caused by TXA₂, as has been already well described for ATP (21).

Using confocal and RT-PCR analyses, we were able to demonstrate that sensitization procedure increased the transcription and expression of P2Y₄ and P2Y₆ receptors in the luminal border of airway epithelial cells. Part of these results is in agreement with a recent study by Vieira et al. (35), in which a strong upregulation of P2Y₆ receptors was found after sensitization in a murine model of allergic airway inflammation. The increased density of these P2Y₄ and P2Y₆ receptors would favor a more intense response to nucleotides released during antigenic challenge, especially under conditions of ectonucleotidase inhibition. This would imply that nucleotides are reaching the luminal edge of the epithelial membrane, as we indeed demonstrated for ATP in BAL fluid and with experiments using intratracheal apyrase. In support to this, it has been shown that molecules far larger than purines and pyrimidines can cross the airway epithelium barrier in particular during inflammatory conditions (36, 37), and it has been found that during the antigenic challenge, a sharp increment in ATP concentrations was detected in BAL of asthmatic subjects or sensitized mice (2).

The potentiation of the antigen-induced bronchospasm in the presence of ARL-67156 appears to mainly involve an extrapulmonary mechanism because this was not observed in *in vitro* experiments. As commented above, it is possible that nucleotides involved in the enhanced bronchospasm was released by blood elements, implying that these compounds must diffuse from the blood to the airway epithelium, and during such a trip, they would be catabolized by ectonucleotidases, thus preventing the airway smooth muscle contraction. Our data suggest that an important part of such catabolism was sensitive to ARL-67156. This last drug has been shown to inhibit NTPDase 1 and 3, as well as NPP1 (8). Therefore, in our *in vivo* experiments, it is probably that NTPDase1 in endothelia and mononuclear and polymorphonuclear cells (38, 39), as well as NTPDase3 in platelets (40), were the main responsible for the control of nucleotides levels that are systemically released during the antigenic challenge. Moreover, an ecto-ATPase activity has been recently found in erythrocytes that, although extremely low, might have physiological relevance due to the high density of erythrocytes in blood (28). In the *in vitro* experiments, however, the catabolism sensitive to ARL-67156 appears to be insignificant because this drug failed to potentiate the OVA-induced contraction, despite the fact that the contraction was partially mediated by nucleotides release (as suramin plus RB2 caused rightward displacement of the concentration-response curve to OVA). It is reasonable to speculate that in airways, the catabolism of these compounds is locally carried out by ARL-67156-insensitive ectonucleotidases such as NPP2, NPP3, TNAP, and PLAP (8, 41), which have been detected in airway

epithelium and lung parenchyma (42–45). Moreover, we were able to demonstrate that sensitization procedure dramatically increased the alkaline phosphatase activity in airway epithelium, thus providing a more powerful system to metabolize ATP and other nucleotides. This local ectonucleotidase activity, however, would be not enough to prevent the *in vivo* allergic bronchospasm likely because of enzyme saturation due to the suddenly increase in nucleotides levels.

Our study was based on an intravenous antigenic challenge, which is a usual technique in guinea pig animal models. At what extent these mechanisms are also present after an inhaled antigenic challenge is unclear, inasmuch as the inhalatory route probably involves more local mechanisms.

In conclusion, we have described a novel protective role of ectonucleotidases to prevent the deleterious effect of ATP or other nucleotides during the antigenic challenge. Additionally, we found that sensitization procedure *per se* causes an upregulation of P2Y₄ and P2Y₆ receptors in airway epithelium, which seem to be the two major purinergic receptors involved in the nucleotides-induced bronchospasm after antigenic challenge. These results are very encouraging and pointed out that these mechanisms must be explored in asthma patients under the hypothesis that the level of ectonucleotidases activity could be related to the severity of this disease and/or its exacerbations.

Acknowledgments

This study was partly supported by a grant from CONACYT (81409) and DGAPA-UNAM (IN201810-3) to Dr Luis M. Montaña. This publication is a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the UNAM.

References

- Pellegrino R, Wilson O, Jenouri G, Rodarte JR. Lung mechanics during induced bronchoconstriction. *J Appl Physiol* 1996;**81**:964–975.
- Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, Kool M, Willart MA, Muskens F et al. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat Med* 2007;**13**:913–919.
- Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2006;**2**:409–430.
- Kukulski F, Levesque SA, Sevigny J. Impact of ectoenzymes on P2 and P1 receptor signaling. *Adv Pharmacol* 2011;**61**:263–299.
- Stefan C, Jansen S, Bollen M. Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. *Purinergic Signal* 2006;**2**:361–370.
- Millan JL. Alkaline phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signal* 2006;**2**:335–341.
- Enyoloji K, Kotani K, Thukral C, Blumel B, Sun X, Wu Y et al. Deletion of cd39/entpd1 results in hepatic insulin resistance. *Diabetes* 2008;**57**:2311–2320.
- Levesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Sevigny J. Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases. *Br J Pharmacol* 2007;**152**:141–150.
- Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 2007;**87**:659–797.
- Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford AP. Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch* 2006;**452**:513–537.
- Van Crombruggen K, Van Nassauw L, Timmermans JP, Lefebvre RA. Inhibitory purinergic P2 receptor characterisation in rat distal colon. *Neuropharmacology* 2007;**53**:257–271.
- von Kugelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* 2006;**110**:415–432.
- 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.
- Hong JL, Lee LY. Cigarette smoke-induced bronchoconstriction: causative agents and role of thromboxane receptors. *J Appl Physiol* 1996;**81**:2053–2059.
- Zar JH. Biostatistical analysis, 4th ed. *Upper Saddle River*, New Jersey: Prentice Hall, 1999:360–376.
- Montano LM, Cruz-Valderrama JE, Figueroa A, Flores-Soto E, Garcia-Hernandez LM, Carbajal V et al. Characterization of P2Y receptors mediating ATP induced relaxation in guinea pig airway smooth muscle: involvement of prostaglandins and K⁺ channels. *Pflugers Arch* 2011;**462**:573–585.
- North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 2002;**82**:1013–1067.
- Flores-Soto E, Carbajal V, Reyes-Garcia J, Garcia-Hernandez LM, Figueroa A, Checa M et al. In airways ATP refills sarcoplasmic

Authors acknowledge CONACYT for the scholarship to Erik Cruz-Valderrama and Diana Claudia Rebollar Ayala.

Authors' contributions

JC participated in the study design, guinea pig model of airway sensitization, plethysmographic experiments, ATP measurements, and writing of the manuscript. MHV contributed to the study design, data analysis, and writing of the manuscript. DCRA participated in the plethysmographic experiments. VDH contributed with all the confocal experiments. JECV participated in the organ baths experiments. EFS was involved in the guinea pig model of airway sensitization and confocal experiments. MFG was involved in implementation of the technique for measuring ATP released by platelets. NNJV and CBL contributed with RT-PCR experiments, and CBL also contributed in the writing of the manuscript. LMM contributed with the design and global supervision of the study, data analysis, and writing of the manuscript. All authors read and gave the final approval of the version to be published.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Data S1. Methods and additional figures.

- reticulum via P2X smooth muscle receptors and induces contraction through P2Y epithelial receptors. *Pflugers Arch* 2011;**461**:261–275.
19. Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* 2006;**27**:166–176.
 20. Fortner CN, Breyer RM, Paul RJ. EP2 receptors mediate airway relaxation to substance P, ATP, and PGE₂. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;**281**:L469–L474.
 21. Advenier C, Bidet D, Floch-Saint-Aubin A, Renier A. Contribution of prostaglandins and thromboxanes to the adenosine and ATP-induced contraction of guinea-pig isolated trachea. *Br J Pharmacol* 1982;**77**:39–44.
 22. 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.
 23. Gordon JL. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* 1986;**233**:309–319.
 24. Yoshida A, Ohba M, Wu X, Sasano T, Nakamura M, Endo Y. Accumulation of platelets in the lung and liver and their degranulation following antigen-challenge in sensitized mice. *Br J Pharmacol* 2002;**137**:146–152.
 25. Kowal K, Pampuch A, Kowal-Bielecka O, DuBuske LM, Bodzenta-Lukaszyk A. Platelet activation in allergic asthma patients during allergen challenge with *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* 2006;**36**:426–432.
 26. Capron M, Jouault T, Prin L, Joseph M, Ameisen JC, Butterworth AE et al. Functional study of a monoclonal antibody to IgE Fc receptor (Fc epsilon R2) of eosinophils, platelets, and macrophages. *J Exp Med* 1986;**164**:72–89.
 27. Pitchford SC, Momi S, Baglioni S, Casali L, Giannini S, Rossi R et al. Allergen induces the migration of platelets to lung tissue in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;**177**:604–612.
 28. Montalbetti N, Leal Denis MF, Pignataro OP, Kobatake E, Lazarowski ER, Schwarzbach PJ. Homeostasis of extracellular ATP in human erythrocytes. *J Biol Chem* 2011;**286**:38397–38407.
 29. Osipehuk Y, Cahalan M. Cell-to-cell spread of calcium signals mediated by ATP receptors in mast cells. *Nature* 1992;**359**:241–244.
 30. Yamamoto K, Furuya K, Nakamura M, Kobatake E, Sokabe M, Ando J. Visualization of flow-induced ATP release and triggering of Ca²⁺ waves at caveolae in vascular endothelial cells. *J Cell Sci* 2011;**124**:3477–3483.
 31. Schwiebert EM, Zsembery A. Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2003;**1615**:7–32.
 32. Bahra P, Meshher J, Li S, Poll CT, Danahay H. P2Y₂-receptor-mediated activation of a contralateral, lanthanide-sensitive calcium entry pathway in the human airway epithelium. *Br J Pharmacol* 2004;**143**:91–98.
 33. 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.
 34. 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**:941–948.
 35. Vieira RP, Muller T, Grimm M, von Gerner V, Vetter B, Durk T et al. Purinergic receptor type 6 contributes to airway inflammation and remodeling in experimental allergic airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;**184**:215–223.
 36. Wangenstein OD, Schneider LA, Fahrenkrug SC, Brottman GM, Maynard RC. Tracheal epithelial permeability to nonelectrolytes: species differences. *J Appl Physiol* 1993;**75**:1009–1018.
 37. Xiao C, Puddicombe SM, Field S, Haywood J, Broughton-Head V, Puxeddu I et al. Defective epithelial barrier function in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2011;**128**:549–556.
 38. Atkinson B, Dwyer K, Enjyoji K, Robson SC. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTP-Dase family modulate platelet activation and thrombus formation: potential as therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis* 2006;**36**:217–222.
 39. Glenn JR, White AE, Johnson A, Fox SC, Behan MW, Dolan G et al. Leukocyte count and leukocyte ecto-nucleotidase are major determinants of the effects of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate on platelet aggregation in human blood. *Platelets* 2005;**16**:159–170.
 40. Frassetto SS, Dias RD, Sarkis JJ. Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (APYRASE, EC 3.6.1.5) in rat blood platelets. *Mol Cell Biochem* 1993;**129**:47–55.
 41. Picher M. Mechanisms regulating airway nucleotides. *Subcell Biochem* 2011;**55**:17–49.
 42. Kawagoe H, Soma O, Goji J, Nishimura N, Narita M, Inazawa J et al. Molecular cloning and chromosomal assignment of the human brain-type phosphodiesterase 1/nucleotide pyrophosphatase gene (PDNP2). *Genomics* 1995;**30**:380–384.
 43. Nouwen EJ, Pollet DE, Eerdeken MW, Hendrix PG, Briers TW, De Broe ME. Immunohistochemical localization of placental alkaline phosphatase, carcinoembryonic antigen, and cancer antigen 125 in normal and neoplastic human lung. *Cancer Res* 1986;**46**:866–876.
 44. Picher M, Burch LH, Hirsh AJ, Spychala J, Boucher RC. Ecto 5'-nucleotidase and non-specific alkaline phosphatase. Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. *J Biol Chem* 2003;**278**:13468–13479.
 45. Yang Y, Mou L, Liu N, Tsao MS. Auto-taxin expression in non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;**21**:216–222.

Online Data Supplement

Inhibition of extracellular nucleotides hydrolysis intensifies the allergic bronchospasm. A novel protective role of ectonucleotidases

Jaime Chávez, Mario H. Vargas, Diana C. Rebollar-Ayala, Verónica Díaz-Hernández, José E. Cruz-Valderrama, Edgar Flores-Soto, Mirthala Flores-García, Néstor N. Jiménez-Vargas, Carlos Barajas-López, Luis M. Montañó

METHODS

Animals

Male Hartley guinea-pigs (~500 g body weight at the time of their study) bred in our institutional laboratory animal facilities (12/12 h light/dark cycles, filtered conditioned air, 21±1°C, 40%-60% humidity, sterilized bed) and fed *ad libitum* with pellets (Teklad Guinea Pig Diet 7006; Harlan Teklad, Madison, WI, USA) 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. Experiments were conducted in accordance with the National Research Council "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals".

Sensitization procedure and antigenic challenge

Guinea pigs were sensitized to ovalbumin (OVA) at day 0 with a mixture of 60 µg OVA plus 1 mg Al(OH)₃ in 0.5 ml saline, administered by the intraperitoneal and subcutaneous routes. At day 8, animals were aerosolized during 5 min with 3 mg/ml OVA in saline, and at day 15 with 1 mg/ml OVA in saline for 15 s. Sensitized guinea-pigs were studied on day 21-25.

Antigenic challenge was accomplished with a single intravenous (i.v.) bolus of 100 µg/kg OVA. This relatively low dose was chosen in order to obtain a mild bronchospasm in control conditions.

Plethysmography for mechanically ventilated animals

Lung resistance (RL) was measured through the isovolumetric method in a closed-chamber plethysmograph (Buxco Electronics Inc., Wilmington, NC, USA). For this purpose, guinea-pigs were anesthetized with pentobarbital sodium (35 mg/kg i.p.), and the depth of anaesthesia was maintained with additional doses of pentobarbital (~9 mg/kg i.v.) administered at ~1 h periods. The trachea was cannulated and the animal was mechanically ventilated (model 7025 rodent ventilator, Ugo Basile Biological Research Apparatus, Varese, Italy) with a tidal volume of 10 ml/kg and 48 breaths/min. The right jugular vein and the left carotid artery were cannulated for drug administration and for arterial pressure recording (pressure transducer model BPA-400A, Digi-Med, Louisville, KY, USA), respectively. A water-filled cannula was positioned into the middle third of the oesophagus to measure intraesophageal pressure as a surrogate of intrapleural pressure. Finally, the animal received pancuronium bromide (0.06 mg/kg i.v.) to avoid spontaneous respiratory movements.

Two differential pressure transducers were used to measure: 1) pressures obtained from the oesophageal and tracheal cannulas (model TRD4510, Buxco), and 2) pressures from the plethysmographic and reference chambers (model TRD5700, Buxco). Signal from this last transducer was converted to pseudoflow by a software (Buxco Biosystem XA v2.11), which also calculated the relationship between signals from both transducers to obtain RL using the formula $RL = \Delta P / \Delta V'$, where ΔP is the pressure change and $\Delta V'$ is the flow change. Antigen-induced bronchospasm was evaluated as the maximum RL increment registered at any time during a 30 min period after OVA administration (in control sensitized animals, peak RL is usually achieved at ~5 min).

Several groups of animals were studied. The control group only received the antigenic challenge with OVA. All the remaining (experimental) groups received 5 mg/kg i.v. ARL-67156, an inhibitor of ectonucleotidases (1), 15 min before OVA. Some of these experimental groups further received the following pretreatments ~10 min before OVA: *a*) 20 mg/kg suramin, an antagonist of P2X_{1, 2, 3, 5} and P2Y_{1, 2, 6, 11, 12, 13} receptors (2-6), *b*) suramin plus 7.7 mg/kg RB2, an antagonist of P2Y_{1, 4, 6, 11, 12, 13} receptors (2, 4-6), or *c*) 0.3 mg/kg SQ29548, an antagonist of the TXA₂ receptor (7, 8).

A separate group of guinea pigs received 300 units apyrase (a NTPDase1) dissolved in 1 ml saline and administered by the intratracheal route. After stabilization of the animal (~5 min), ARL-67156 was administered and 15 min later the antigenic challenge. Control animals for these last experiments received 1 ml saline solution intratracheally. We corroborated that ARL-67156 does not modify the baseline values of R_L in sham-sensitized animals (guinea pigs submitted to the same protocol as sensitized animals, but without receiving OVA).

Bronchoalveolar lavage

Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed in five groups of guinea pigs. In the first two, BAL was carried out 5 min after administration of an antigenic challenge (as described above), with or without previous i.v. administration (15 min before OVA) of 5 mg/kg ARL-67156. The three other groups were those described in the last paragraph of the previous section. BAL was performed by introducing 5 ml of saline solution at room temperature through the tracheal cannula followed by gently recovering of the fluid. The procedure was repeated once again, and the total BAL fluid recovered was pooled, centrifuged at 1800 rpm and stored at -70°C until its analysis.

Organ baths

In order to investigate the role of ATP and other nucleotides locally released in tracheal rings and parenchymal strips during antigenic challenge, a concentration response curve to OVA (10^{-12} to 10^{-6} M) was performed in these tissues with or without a 10-min preincubation with 100 μ M ARL-67156, 100 μ M suramin plus 100 μ M RB2 or 10 μ M levamisole. Thus, guinea pigs previously sensitized to OVA were anesthetized with pentobarbital sodium (35 mg/kg, i.p.) and euthanized by exsanguination. Trachea was dissected, freed of connective tissue and eight rings were obtained. For lung parenchyma strips, the lungs-heart block was exposed and intravascular blood was removed by introducing 20 ml saline solution through the right ventricle. Then, the lungs were removed and eight parenchyma strips lacking pleural surface (~3 x 3 x 20 mm, ~56 mg wet weight) were cut from the diaphragmatic edge of the lower lobes. Each tissue (tracheal ring or parenchymal strips) was hung in a 5 ml organ bath filled with Krebs solution (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. Tissues were attached to an isometric force transducer (model FT03, Grass Instruments, West Warwick, RI, USA), connected to a signal conditioner (CyberAmp 380, Axon Instruments, Foster City, CA, USA) plus an analog-to-digital interface (Digidata 1440A, Axon). Data was recorded and analyzed using specialized software (AxoScope v10.2, Axon). Preparations were put under a resting tension of 1 g (tracheas) or 300 mg (parenchymas) during 30 min before testing, and then stimulated three times with 60 mM KCl in order to produce smooth muscle contractions that allow tissue conditioning and optimization of the contractile apparatus. All subsequent contractile responses obtained during experiments were expressed as percentage of the third KCl-induced contraction.

Immunofluorescence for purinergic receptors

Tracheas from sensitized and non-sensitized guinea pigs were obtained as described above, fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) during 2.5 h and placed in 30% ethanol until their inclusion in paraffin. Once paraffinized, tissue blocks were cut into thin slices (5 μ m) and placed over silane-prep slides (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Paraffin was removed by incubation in xylol, followed by graded alcohols. Lung slices were soaked in 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 during 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 to P2Y₁ (cat. no. APR-009), P2Y₂ (cat. no. APR-010), P2Y₄ (cat. no. APR-006), and P2Y₆ (cat. no. sc-20127), all purchased from Alomone Labs (Jerusalem, Israel), were incubated (1:50) overnight at 4°C, and 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. Slices were rinsed with PBS four times for 5 min each, and then 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 anti-pan-cytokeratin (AE1/AE3+8/18 Cat. No. CM162B, Biocare Medical, Concord CA, USA) 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) as the secondary antibody. Tissue sections were mounted with a VectaShield mounting set (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

To determine the specificity of immunolabelling, the antigen for P2Y₄ was used to saturate the primary antibody; in the case of P2Y₆, there was not a commercial blocking peptide, and thus for negative control the primary antibody was omitted. Since immunostaining for P2Y₁ was absent in airways, a positive control with its blocking peptide was done in guinea pig hippocampus (supplemental online Fig B). Negative control for P2Y₂ with its blocking peptide was already done in a previous work (9).

All slides were counterstained with DAPI (Sigma, cat. no. D9542) for visualization of nuclei.

The immunolabelled slices were observed using a confocal laser microscope (Leica TCS SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) using a 40x oil immersion objective. The original resolution of all images was 1,024 x 1,024 pixels. For display purposes, merged images were constructed in which the P2Y receptors were colored in red and keratin colored in green.

Endogenous alkaline phosphatase activity

Tracheas and lung parenchymas from sensitized animals were obtained and processed as described above. The slides were washed with Tris buffered saline (TBS) and incubated with or without 50 mM levamisole during 20 min. Afterward, tissues were preincubated in alkaline phosphatase buffer NTMT (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 50 mM MgCl₂ and 1% Tween 20) during 10 min. Alkaline phosphatase activity was assayed by incubating the tissues with DAKO Fast Red Substrate system (Code No. K0597) during 4 min. Briefly, this technique is based in the conversion of naphthol phosphate (substrate) in naphthol and phosphate by tissue alkaline phosphatase, and next the reaction of naphthol with fast red, yielding a red colored staining. For the airway epithelium immunostaining, heat induced antigen retrieval was performed by placing slides in a pressure cooker in IX Diva Decloaker (Biocare Medical, Concord, CA, USA) during 3 min. Slices were transferred into TBS and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in TBS. To block nonspecific binding to proteins, 1% horse serum was applied on the slices for 30 min. The slides were incubated with the primary antibody, mouse monoclonal pan-cytokeratin AE1/AE3+8/18 (Cat. No. CM162B, Biocare Medical, Concord, CA, USA). The Alexa fluor 488 donkey anti-mouse (A21202 Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA) was used as a secondary antibody. All slices were counterstained with DAPI. Tissue sections were mounted with VectaShield mounting Set (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

The 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 ×40 oil immersion objective. For display purposes, merged images were constructed in which the alkaline phosphatase were in red and keratin was in green.

RT-PCR

Total RNA was isolated from guinea pig tracheal epithelium using a RNA stabilization reagent (RNAlater, Qiagen, Duesseldorf, Germany). Purification of RNA was done using RNA aqueous kit (Ambion, Foster City, CA). For each tissue we used 1 µg of mRNA and SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in presence of oligo (dT) for 1.5 h at 42°C. We performed PCR in 25 µl with 1/20 of reverse transcription reaction whit AccuPrime Pfx DNA polymerase kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Forward and reverse primers for P2Y₄ receptor (consensus from Genbank sequences: NM_020621.4, NM_002565.3, NM_031680.1, NM_001198703.1 and XM_002700045.1) were the nucleotides 5-CTATGCAGTTGCTCTTTGTGCTG-3 and 5-AAGCAGACAGCAAAGACAGTCA-3, respectively. Forward and reverse primers for P2Y₆ receptor (Ensembl-ENSCPOT0000008023.2) were the nucleotides 5-CCAGTCCTTGAGCTTGCCAC-3 and 5-GCCACTTGCTGTGAGTTTCTG-3, respectively. Forward and reverse primers for GAPDH (Genbank: NM_001172951.1) were the nucleotides 5-TGAAGGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3 and 5-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3, respectively.

After 5 min at 94°C, amplification was carried out with 30 cycles at the following conditions: *a*) For P2Y₄ receptor, 15 s at 94°C, 30 s at 49°C and 1.10 min at 68°C. *b*) For P2Y₆ receptor, 30 s at 94°C, 30 s at 50°C, and 1.10 min at 68°C. *c*) For GAPDH, 20 s at 94°C, 20 s at 60°C and 1 min at 68°C. A final period of 5 min at 68°C was applied to all samples. PCR products were analyzed by electrophoresis in 0.8% agarose gels stained with 1 µg/ml ethidium bromide. Images were obtained with Gel-Doc 2000 documentation system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Every experiment was conducted by duplicate (tracheal epithelium pooled from two guinea pigs). Three experiments in sensitized animals and three in non-sensitized animals were performed.

Measurement of ATP released by platelets and in BAL fluid

For ATP quantification in platelet-rich plasma, blood from guinea pigs was collected into plastic tubes containing 0.129 mol/l citrate solution as anticoagulant (9:1 vol/vol) and centrifuged at 200×g for 4 min at room temperature (20–24°C). The platelet-rich plasma (PRP) was carefully withdrawn and pooled. Platelet ATP release was assessed within 120 min after getting blood sample. Platelets (250 µl of PRP containing 2.5×10⁵ platelets/µl) were preincubated for 3 min at 37°C. After incubation, ATP release from platelets was induced by 1 µM OVA under stirring conditions (1200 rpm), and it was allowed to react for 8 min (control response, considered as 100% of ATP release; n=7). Chemical energy from ATP was converted to luminous energy by luciferase, in the presence of luciferin, oxygen and Mg²⁺, and measured through a lumi-aggregometer (model 560 CA coupled to a model 810 Aggro/Link, Chrono-log, Havertown, PA, USA). ATP release was expressed as nM. For positive controls, platelets were stimulated as described above, but using 5 µM ADP instead of OVA.

For measurement of ATP concentration in BAL fluids, the samples were freeze-dried (SC110 SpeedVac System, Savant Instruments, Holbrook, NY, USA) and reconstituted in 100 µl of assay buffer for its ATP determination by using a commercial colorimetric assay (catalog ab83355, Abcam, Cambridge, MA, USA).

Drugs

Ovalbumin, ARL-67156, suramin, reactive blue-2 (RB2), levamisole ((-)-tetramisole hydrochloride), ADP, and apyrase from potato were all purchased from Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA. SQ29548 was purchased from Cayman Chem. Co., Ann Arbor, MI, USA.

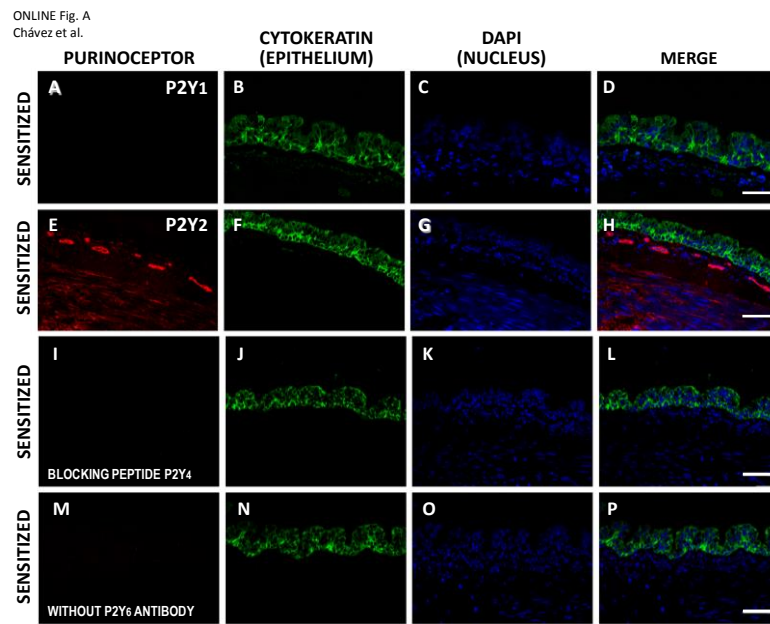
REFERENCES FOR ONLINE DATA

1. Levesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Seigny J. Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases. *Br J Pharmacol* 2007;**152**:141-150.
2. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 2007;**87**:659-797.
3. Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford AP. Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch* 2006;**452**:513-537.
4. Van Crombruggen K, Van Nassauw L, Timmermans JP, Lefebvre RA. Inhibitory purinergic P2 receptor characterisation in rat distal colon. *Neuropharmacology* 2007;**53**:257-271.
5. von Kugelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* 2006;**110**:415-432.
6. 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.
7. Hong JL, Lee LY. Cigarette smoke-induced bronchoconstriction: causative agents and role of thromboxane receptors. *J Appl Physiol* 1996;**81**:2053-2059.
8. Ogletree ML, Harris DN, Greenberg R, Haslanger MF, Nakane M. Pharmacological actions of SQ 29,548, a novel selective thromboxane antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1985;**234**:435-441.
9. Montano LM, Cruz-Valderrama JE, Figueroa A, Flores-Soto E, Garcia-Hernandez LM, Carbajal V, et al. Characterization of P2Y receptors mediating ATP induced relaxation in guinea pig airway smooth muscle: involvement of prostaglandins and K⁺ channels. *Pflugers Arch* 2011.
10. Kittner H, Franke H, Fischer W, Schultheis N, Krugel U, Illes P. Stimulation of P2Y₁ receptors causes anxiolytic-like effects in the rat elevated plus-maze: implications for the involvement of P2Y₁ receptor-mediated nitric oxide production. *Neuropsychopharmacology* 2003;**28**:435-444.

LEGENDS FOR SUPPLEMENTAL ONLINE FIGURES

ONLINE Figure A. Confocal microscopy for P2Y₁ and P2Y₂ receptors, and negative controls for P2Y₄ and P2Y₆ receptors in tracheas from sensitized guinea pigs. Details of the content in each column of panels is as follows. The first column shows immunoreactivity to P2Y₁ and P2Y₂ receptors (stained red), while the second and third show fluorescence for cytokeratin in the airway epithelium (stained green) and DAPI for cells' nuclei (stained blue), respectively. The last column shows the merge of the three previous columns. Immunoreactivity to P2Y₁ could not be detected at any level (panels A and D), while P2Y₂ was only observed in the airway smooth muscle, but not in airway epithelium (panels E and H). Images in panel I-P show negative controls using a blocking peptide to saturate the primary antibody to P2Y₄ (panel I-L) or eliminating the P2Y₆ primary antibody (panel M-P).

ONLINE Figure B. Positive control for antibodies to P2Y₁ receptor. Immunoreactivity of antibodies to P2Y₁ receptors used in our study was corroborated in histological sections of guinea pig hippocampus, a tissue known to possess high density of these purinergic receptors (10). The immunolabelling for P2Y₁ was observed in neurons (panels A and D), which disappeared with the respective blocking peptide (panels E-H).



ONLINE Fig B
Chávez et al.

GUINEA PIG HYPOCCAMPUS

