



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

TESIS

LIBERACIÓN DE ATP EN LEUCOCITOS SANGUÍNEOS DE HUMANO Y SU
METABOLISMO EN PACIENTES ASMÁTICOS.

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
MARLON DE ITA LEY

DR. LUIS MANUEL MONTAÑO RAMÍREZ
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ TUTOR
DR. HORACIO MERCHANT LARIOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DRA. CRISTINA LEMINI GUZMÁN
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD DE MÉXICO, ABRIL 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

“..Dios te salvó del río, te salvó en todas tus andanzas, incluso ahora te salva de la ira de faraón. Dios nunca te abandonó, así que tu no nos abandones”

Myriam. El príncipe de Egipto

A María del Rosario González Viguera

A quien nos enseñó de la Virtud no con el sermón, si no con el ejemplo.

Nos enseñó del amor, amándonos incondicionalmente.

Siempre en nuestra memoria.

Dedicatorias

Al Dr. Rafael Saavedra, a la Dra. Ruth Jaimez, al Dr. Carlos Rosales, y al Dr. Federico Ávila porque sus críticas enriquecieron esta tesis.

Al Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez, por todas oportunidades y el apoyo que me dio para concluir esta etapa de mi vida. Le estaré eternamente agradecido

A la Dra. Verónica Díaz, por su amistad, por su apoyo, por todas las críticas y por impedir que huyera. Esta tesis es gracias a todo lo que has hecho por mí. Muchas gracias.

A mi familia, a mi madre Tere Ley, a mis hermanos, Darío, Jorge, Christian, porque sin importar a donde vaya estarán ahí siempre, en los hábitos, en los gestos, en las decisiones que tome, jamás estaré sólo.

A Arturo Egea, por acompañarme brazo con brazo los últimos estirones, la etapa más difícil, complicada y ríspida. Gracias por compartir conmigo y no abandonarme.

A la UAP Chimalhuacán de la Universidad Autónoma del Estado de México, por haberme dado trabajo en los momentos más complicados y en especial al Dr. Lecuona por invitarme a participar en la aventura de ser profesor fuera de mi alma máter.

Al Dr. Leonardo Domínguez "Marrufo", la Dra. Karen Illescas, al Dr. Javier Sánchez "Melecio" por haberme ofrecido su amistad en los últimos momentos, los más complicados de esta tarea. Cuando uno cae, el otro está para levantarlo.

A Rodrigo Hernández, porque me acompañaste desde el primer día y me llenaste con tu felicidad para no abandonar esta tarea.

A la Maestría INGENES, a la Dra. Esther López-Bayghen y sobre todo a la Mta. Ángeles Hernández por su amistad y por impulsarme a continuar a terminar este proceso.

Al Dr. Enrique Pedernera y la Dra. Carmen Méndez, porque a pesar de nuestras diferencias, forjaron mi camino en la ciencia.

Al Departamento de Embriología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser parte de mi crecimiento profesional desde antes de ser profesionista.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme crecer hasta donde mis alas han querido.

Y sobre todo a mis pacientes, por su entrega al conocimiento, su generosidad y su deseo de encontrar una mejor vida para los demás.

----- Agradecimientos -----

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por las facilidades otorgadas para la realización de mis estudios de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado CVU: 390453 y beca número 317559.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por el financiamiento de este proyecto de investigación con el número de aprobación 219859.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico por el financiamiento de este proyecto de investigación con el número de aprobación IN200613.

A la Dra. En C. Verónica Díaz Hernández por su asesoría académica y apoyo en la realización de las PCR en tiempo real.

A la Dra. En C. Verónica Carbajal Salinas por su asesoría académica y apoyo en la realización de la detección de fosfatos mediante colorimetría.

A la Dra. En C. Blanca Ortiz Quintero por su asesoría académica y apoyo en la realización de la Citometría de flujo.

Índice

	Página
Abstract	1
Resumen	2
Prólogo	3
Introducción	4
El sistema inmunitario como elemento clave en la homeostasis	4
Eliminación de amenazas por el sistema inmunitario	5
Respuesta inmune innata	5
Respuesta inmune adaptativa	5
Alergia, hipersensibilidad e inflamación crónica	6
Reconocimiento de patrones moleculares asociados a daño o DAMP	7
Adenosin Trifosfato (ATP)	8
Objetivo General	9
Objetivos Particulares	9
Primer capítulo	
“El ATP libera ATP u otros nucleótidos a través de receptores purinérgicos P2 en leucocitos de sangre periférica”	10
Marco Teórico	10
Generalidades de la acción del ATP en el sistema inmune.	
Señalización Purinérgica	10
Receptores P2Y	10
P2RY1	11
P2RY2	11
P2RY4	12
P2RY6	12
P2RY11	12
P2RY12	12

P2RY13	13
P2RY14	13
Receptores P2X	13
P2RX1	14
P2RX2	14
P2RX3	14
P2RX4	15
P2RX5	15
P2RX6	15
P2RX7	15
Antecedentes	17
Señalización purinérgica y sistema inmunitario	17
Células polimorfonucleares	17
Regulación de la función de los neutrófilos por ATP	17
Regulación de la función de los eosinófilos por ATP	19
Regulación de la función de los basófilos por ATP	20
Células mononucleares	20
Monocitos	20
Macrófagos	20
Regulación de la función de los macrófagos por ATP	20
Células dendríticas	21
Regulación de la función de las células dendríticas por ATP	21
Linfocitos T y B	22
Regulación de la función de los linfocitos por ATP	22
Células NK	23
Regulación de la función de las células NK por ATP	24
Células cebadas	25
Regulación de la función de las células cebadas por ATP	25
Liberación de ATP al medio extracelular	25
Daño y muerte celular	25
Exocitosis	26
Hemicanales de conexinas	26
Canales de panexinas	28

ATP y reacción inflamatoria	29
Problema de investigación	31
Importancia	31
Hipótesis	31
Objetivo General	32
Objetivos Particulares	32
Objetivos Específicos	32
Material y métodos	33
Toma de muestras	33
Purificación de leucocitos por gradientes de densidad	33
Medición de la producción de fosfatos	34
Citometría de flujo	34
Detección de receptores P2Y en células mononucleares	34
Detección de receptores P2Y en células polimorfonucleares.	35
Análisis estadístico	36
Eliminación de residuos biológicos	36
Financiamiento	36
Resultados	37
Discusión	53
Conclusiones	57
Segundo capítulo	
“Disminución de la expresión de la ENPP1 en leucocitos de sujetos con crisis	58

grave de asma”

Marco Teórico	58
Asma	58
Epidemiología	58
Prevalencia a nivel mundial	58
Prevalencia en México	59
Incidencia en México	59
Mortalidad	60
Factores de riesgo	61
Genéticos	61
Ambientales	61
Manifestaciones clínicas del asma	61
Histopatología de la vía aérea del paciente asmático	62
Fisiopatología	63
Hiperreactividad de las vías aéreas	63
Inmunología del asma	64
Diagnóstico	64
Historial de síntomas respiratorios variables	64
Pruebas de función pulmonar	65
Ectonucleotidasas	66
Trifosfato difosfohidrolasas	67
ENTPD1	68
ENTPD2	68
ENTPD3	68
ENTPD4	69
ENTPD5	69
ENTPD6	69
ENTPD7	69
ENTPD8	70
Nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa	70
ENPP1	70
ENPP2	70
ENPP3	71
ENPP4	71

ENPP5	71
ENPP6	72
ENPP7	72
Antecedentes	72
Señalización purinérgica y asma	72
Problema de investigación	74
Importancia	74
Hipótesis	74
Objetivo General	75
Objetivos Particulares	75
Objetivos Específicos	75
Material y métodos	76
Toma de muestras	76
Purificación de células mononucleares y polimorfonucleares	76
Medición de la actividad de las ectonucleotidasas	77
Expresión de las ectonucleotidasas mediante PCR en tiempo real	77
Inmunofluorescencia	78
Análisis estadístico	80
Financiamiento	80
Eliminación de residuos biológicos	80
Resultados	81
Discusión	88
Conclusiones	90
Discusión final	91

ATP como regulador clave de la respuesta proinflamatoria	91
Ectonucleotidasas como enzimas con actividad inmunosupresora	92
ATP como blanco terapéutico	94
Perspectivas	96
Conclusión General	97
Conclusiones Puntuales	97
Bibliografía	98
Artículo: ATP releases ATP or other nucleotides from human peripheral blood leukocytes through purinergic P2 receptors	108
Artículo: Decreased expression of ectonucleotidase E-NPP1 in leukocytes from subjects with severe asthma exacerbation	116
Anexo 1.- Clasificación de los asmáticos de acuerdo a su gravedad	120
Anexo 2.- Soluciones empleadas	121
Anexo 3.- Consentimiento informado	122

Abstract

Purinergic signaling has a key role in the immune system function. The idea that ATP can induce the release of ATP, and its degradation in inflammatory pathologies, such as asthma, has been poorly studied. We explored this possibility by assessing the rate of exogenous ATP breakdown (measured by phosphates production) by human peripheral blood leukocytes. In the first time, we detected that ATP treatment increased phosphates formation in a time and concentration-dependent manner in human leukocytes. Pharmacological antagonism and uncoupling of P2Y receptors reduced phosphate formation, suggesting that phosphate production was due to activation of P2 receptors, with subsequent release of ATP. Pharmacologic blockade of P2X receptors did not modify the phosphate production, moreover in monocytes 500 μ M and 1–5mM of ATP induced inward currents suggestive of P2X1 and P2X7 activation, respectively. Flow cytometry identified that almost all leukocytes expressed P2Y1, 2, 4, 6, 11 receptors. These results suggest that ATP induced the release of ATP through activation of P2Y receptors in human leukocytes. To study the breakdown of ATP we analyzed the total ectonucleotidase activity in leukocytes from asthma exacerbation patients and explored the expression of E-NTPDases and E-NPPs in their polymorphonuclear cells. Leukocytes from patients with mild or moderate asthma exacerbation had similar ectonucleotidase activity than leukocytes from healthy subjects, while in patients with severe asthma exacerbation, this activity was lower. Only E-NPP1 displayed diminished protein and mRNA expression, in patients with severe asthma exacerbation. This reduced E-NPP1 expression could be responsible for increased amounts of ATP, capable of worsening asthma exacerbation, and warranting further investigation. This ATP-induced nucleotides release and lack of breakdown constitutes a potential mechanism leading to amplification of ATP signaling.

Resumen

La señalización purinérgica es clave para la función de las células del sistema inmune. La idea de que el ATP pueda inducir la liberación de ATP y el papel que tiene su degradación en patologías inflamatorias, como el asma, ha sido estudiada escasamente. Analizamos la liberación de ATP y su degradación en sujetos sanos y en pacientes con crisis asmática en leucocitos de sangre periférica. En el proceso de liberación observamos que el tratamiento de leucocitos con ATP incrementa la formación de fosfatos (como una aproximación de la degradación de ATP) tiempo y concentración dependiente; mientras que el antagonismo y el desacoplamiento farmacológico de los receptores P2Y redujeron la formación de fosfatos. El bloqueo farmacológico de los receptores P2X no modificó las concentraciones de fosfatos, sin embargo, en monocitos con el tratamiento con 500 μ M tanto como el de 1-5mM de ATP indujo corrientes entrantes sugerentes de la activación de los receptores P2X1 y P2X7, respectivamente. Adicional a esto, identificamos que las células mononucleares y polimorfonucleares expresan los receptores P2Y1, 2, 4, 6 y 11. Estos resultados sugieren que la activación de los receptores P2Y por ATP participan en la liberación de ATP en los leucocitos de sangre periférica. En el caso de la degradación de ATP estudiada en los pacientes asmáticos se observó que los leucocitos obtenidos de pacientes con crisis leve o moderada tienen actividad similar a las ectonucleotidasas que los leucocitos de sujetos sanos, mientras que los pacientes con crisis asmática grave, la actividad fue menor. De las ectonucleotidasas estudiadas, solamente E-NPP1 mostró una reducción de la expresión a nivel de proteína y de RNA mensajero en los pacientes con crisis asmática grave. Estos resultados sugieren que la liberación de nucleótidos inducida por ATP y su degradación constituye un mecanismo potencial llevando a la amplificación de la señalización de ATP, tanto en procesos fisiológicos como en el asma grave.

Prólogo

En el presente trabajo, tesis Doctoral titulada “Liberación de ATP en leucocitos sanguíneos de humano y su metabolismo en pacientes asmáticos” se abarcan dos aspectos de regulación de la señalización purinérgica dentro del sistema inmune: la liberación y la degradación de ATP, debido a esto se ha decidido separar en dos secciones. Cada una de estas cuenta con una discusión acorde, por lo que el grueso de esta tesis está compuesto por diferentes partes.

En la primera parte se presenta una introducción al tema donde se puede entender el contexto general del sistema inmune, la reacción inflamatoria y la importancia del ATP como molécula de señalización de daño. Seguido de esto, encontraremos generalidades de la señalización purinérgica para reconocer la importancia de la estrategia experimental empleada.

El objetivo del primer capítulo concentra su atención en un tema de orientación fisiológica del sistema inmune: la liberación de ATP u otros nucleótidos en las células del sistema inmune, en este capítulo centraremos el proceso de liberación a través de un mecanismo novedoso (mediante de la activación de los receptores purinérgicos) en un modelo de células mononucleares y polimorfonucleares circulantes. Este capítulo realza el papel que tiene el ATP en el inicio y mantenimiento del proceso inflamatorio, la señalización purinérgica a través de receptores purinérgicos P2X y P2Y y la liberación de ATP mediante hemicanales de conexinas, canales de panexinas o exocitosis en el sistema inmune.

El segundo capítulo tiene una orientación patológica: la degradación de ATP en una enfermedad inflamatoria como el asma. Dentro de este se estudia la relevancia que tiene la regulación fina de los niveles de ATP en el medio extracelular en las reacciones de hipersensibilidad y su asociación con la gravedad de las crisis asmáticas. Como parte del grueso del capítulo se hace un desglose de las enzimas encargadas de la degradación del ATP a través de las ectonucleotidasas.

Finalmente se presenta un área de discusión global donde se hace frente a los hallazgos observados y su contextualización en la parte fisiopatológica del sistema inmune y el mantenimiento de la homeostasis global, en este se puede hacer frente a los resultados obtenidos con el proceso de salud-enfermedad y generar perspectivas de investigación hacia futuro en el campo de la inmunomodulación.

----- Introducción -----

El sistema inmunitario como elemento clave de la homeostasis

El sistema inmunitario es el encargado de defender al organismo de las amenazas del medio; estas pueden provenir del espacio interno como del externo y pueden ser tan variadas como lo son parásitos, bacterias o virus. Este sistema es reconocido como uno de los sistemas con mayor habilidad para detectar amenazas y en respuesta a ellas es altamente adaptable, siendo capaz de controlar y eliminar los patógenos. Para poder realizar este proceso de manera exitosa el sistema inmunitario se establece como una red conformada por células, órganos, tejidos, moléculas y vías interconectadas con sistemas de retroalimentación positiva y negativa, cuya principal función es el mantenimiento de la homeostasis del sistema en el contexto del organismo[1].

De acuerdo a la duración e intensidad de la respuesta se ha descrito clásicamente que el sistema inmunitario está dividido en dos tipos: inmunidad innata e inmunidad adaptativa[2, 3]. La respuesta inmune innata es identificada como la primera línea de defensa del organismo, está compuesta por las barreras epiteliales y las proteínas antimicrobianas que secretan, los fagocitos como los neutrófilos y los macrófagos así como las células que inducen la lisis celular como las células NK; adicional a este componente celular se incluyen algunas proteínas en sangre como el complemento y las citocinas [4, 5]. El segundo tipo de inmunidad, la adaptativa está subdividida a su vez en inmunidad celular y humoral, la primera se encuentra compuesta por linfocitos T citotóxicos, linfocitos T helpers o auxiliares y los linfocitos T reguladores [6]; mientras que la humoral está compuesta por linfocitos B, células plasmáticas y anticuerpos [3].

En conjunto, ambos tipos de inmunidad permiten desarrollar una respuesta inmune adecuada y esto depende de interacciones finamente coreografiadas entre diferentes tipos de células y moléculas [1].

Uno de los mecanismos que presenta con mayor frecuencia el sistema inmune en respuesta a la presencia de agentes extraños es la reacción inflamatoria; esta corresponde al proceso desatado por la interacción con patógenos o la detección de daño tisular y está caracterizado por el reclutamiento de leucocitos y la extravasación de diferentes proteínas plasmáticas en el sitio de infección. Durante este proceso encontramos la activación de los leucocitos y de las proteínas del sistema para eliminar el agente que causa el daño celular,

mientras que el proceso final incluye la eliminación de los desencadenantes y mediadores inmunitarios para iniciar el proceso de reparación tisular[7].

Eliminación de amenazas por el sistema inmunitario

Respuesta inmune innata

De manera general las barreras epiteliales tienen la capacidad de eliminar la mayor parte de los agentes externos como los son los microorganismos, por ejemplo, en el caso de la mucosa del aparato respiratorio tanto el movimiento ciliar como la secreción de moco y la respuesta refleja de tos, parte de la respuesta inmune innata, eliminan la mayor parte de los agentes patógenos [8, 9]. Sin embargo, cuando esta barrera presenta daño comienza una cascada de eventos que permiten eliminar la causa que genera la disrupción de la barrera y así como la reparación de la misma.

La primera respuesta inmune montada posterior a la invasión de agentes patógenos ocurre en cuestión de minutos y es desencadenada principalmente a través de las células del sistema inmune residente en los tejidos –macrófagos y células dendríticas- que poseen receptores celulares de superficie para patrones moleculares conservados en los agentes patógenos –PAMPs por sus siglas en inglés- [10-12]. Tanto las células dendríticas como macrófagos comienzan el proceso de reconocimiento y fagocitosis para eliminar la amenaza; adicional a este proceso comienzan la secreción de moléculas con actividad antimicrobiana, citocinas, quimiocinas y factores vasoactivos que permiten el reclutamiento de otras células y moléculas al sitio de contacto [10-12].

La siguiente línea de defensa de sistema inmunitario innato –atraída por las quimiocinas- incluye principalmente a los neutrófilos circulantes (células reconocidas por la expresión de CD66), estos reconocen PAMPs y a través de mecanismos de fagocitosis y secreción de sustancias antimicrobianas permiten el control y destrucción de las amenazas [13]. Sin embargo, la respuesta inmune innata es inespecífica y en dado de que el desencadenante no sea controlado se requiere la entrada del sistema inmunitario adaptativo para resolver la misma.

Respuesta inmune adaptativa

Las células dendríticas activadas por los agentes patógenos migrarán hacia los ganglios linfáticos donde comenzará el proceso de activación de linfocitos T. La respuesta funcional

de los linfocitos T es desencadenada por el reconocimiento del complejo mayor de histocompatibilidad o MHC en la superficie de las células presentadoras de antígenos por el receptor de células T o TCR y CD3 [14, 15]. Esta estimulación requiere de citocinas que servirán como señales de activación de los linfocitos así como de adhesión estable entre las células presentadoras de antígenos y los linfocitos T vírgenes a través de moléculas coactivadoras como CD4 o CD8 produciendo linfocitos T cooperadores o linfocitos T citotóxicos, respectivamente [6].

Este tipo de interacciones llevará a la maduración de linfocitos CD4+ hacia linfocitos auxiliares (o Th) tipo 1 y 2, encargados de mediar la respuesta inmune a través de mediadores solubles. Los linfocitos Th1 aumentan inmunidad mediada por células y respuestas inflamatorias con activación de macrófagos, activación y diferenciación de linfocitos T y la secreción de citocinas proinflamatorias como IFN γ y TNF- α ; por otra parte los linfocitos Th2 aumentan inmunidad humoral y la producción de anticuerpos a través de la secreción de IL-4 e IL-5 [6]. [12].

Como parte de la respuesta adaptativa, los linfocitos B (CD19+) reconocen los antígenos a través de inmunoglobulinas de superficie y posterior a esto, se diferencian hacia células plasmáticas encargadas la liberación de anticuerpos requeridos para la opsonización, fagocitosis, lisis celular así como el impedimento de acción de los patógenos, incluyendo sus metabolitos, como las toxinas [3, 16].

Estos procesos en conjunto permiten la resolución de la amenaza, la eliminación de los antígenos que desencadenan la respuesta inflamatoria y permiten regresar al estado de homeostasis previo[7].

Alergia, hipersensibilidad e inflamación crónica.

Las mismas reacciones del sistema inmune que protegen contra infecciones también pueden infligir daño no solamente a los agentes patógenos sino también a agentes inocuos, células y tejidos del huésped; este tipo de respuestas inmunitarias anómalas desencadenan un grupo importante de patologías dentro del espectro de la enfermedad humana.

De manera fisiológica la respuesta inmune emplea diversas estrategias para disminuir el daño al desactivar respuestas y evitar reacciones en contra de antígenos propios, estos

mecanismos incluyen tolerancia inmunológica [17] y la retroalimentación negativa de la inflamación[7], entre otras. Estos mecanismos son puntos de control y equilibrio que en algunas ocasiones pueden funcionar de manera errónea y que llevan a reacciones inmunitarias que pueden ser más perjudiciales que protectoras.

Algunos trastornos inmunitarios se originan por perturbaciones en el proceso de tolerancia inmunológica, estos también son conocidos como enfermedades autoinmunitarias; dentro de estas podemos encontrar a diabetes mellitus Tipo I, la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide [18]; otros son causados por respuestas innatas o adaptativas demasiado vigorosas en contra de antígenos que plantean poca amenaza o ninguna, bien conocidos como hipersensibilidades, dentro de las que encontramos a la dermatitis atópica o el asma[19]; finalmente encontramos un último grupo consecuencia de fallas en los mecanismos para desactivar respuestas inmunes innatas o adaptativas y que originan procesos inflamatorios crónicos [20].

Debido a que el sistema inmune participa en procesos clave en el mantenimiento de la homeostasis, las moléculas que son reconocidas por el sistema inmune como señales de daño o de presencia de patógenos son detectadas rápidamente; considerando que estas moléculas o pueden inducir un estado patológico su presencia en el medio extracelular deben ser finamente regulada.

- **Reconocimiento de patrones moleculares asociados a daño o DAMP**

Para desencadenar las respuestas inmunitarias las células del sistema inmune son capaces de reconocer moléculas de patógenos a través de receptores, sin embargo, adicional a esto se ha descrito que las células del sistema inmune pueden reconocer moléculas asociadas a la ruptura de barreras físicas, la lisis celular y la toxicidad celular [21]

El sistema inmune sensor el daño o el estrés celular es detectando a un grupo de moléculas en el medio extracelular que deberían encontrarse intracelularmente, a este grupo de sustancias se les conoce como patrones moleculares asociados a daño o DAMPs por sus siglas en inglés [21, 22]. Dentro de estas moléculas podemos encontrar a la proteína nuclear HMGB1, la F-actina, las proteínas de choque térmico y algunos metabolitos purinérgicos como el ácido úrico y el ATP [21, 22].

Trifosfato de Adenosina o ATP

El trifosfato de adenosina o ATP es una molécula producida en la mitocondria en la cadena de electrones y es reconocida como la moneda energética celular [23]. Es una molécula eminentemente intracelular y participa en un sinnúmero de procesos celulares incluidos los procesos de la señalización, la regulación del tráfico vesicular, reacciones anabólicas y catabólicas, entre otros procesos. Adicional a esto, de manera relevante se ha descrito que el ATP puede localizarse en el medio extracelular y de manera relevante en la señalización autócrina y parácrina de muchos subtipos celulares, incluyendo neuronas [24], células epiteliales pancreáticas [25] y epiteliales de la vía aérea [8], entre otras.

El ATP en el medio extracelular puede ser liberado al medio externo a través de diversos mecanismos: lisis celular, exocitosis o mecanismos conductivos. En el espacio extracelular actúa a través de receptores transmembranales purinérgicos P2 –P2X y P2Y- donde activa cascadas de señalización que modifican la actividad celular contexto dependiente [26, 27]. Debido a que el ATP es una molécula asociada a daño, es hidrolizada rápidamente hacia ADP y AMP a través de proteínas de membrana conocidas como ectonucleotidasas [28, 29]. Posteriormente, el AMP es metabolizado hacia adenosina por la enzima 5'-nucleotidasa, que puede activar receptores a adenosina o P1, o ser recapturada por el transportador equilibrador de nucleósidos o ENT. Finalmente, la adenosina puede ser degradada a inosina por la enzima adenosin deaminasa, que es recapturada por la célula[28].

Recientemente se ha descrito que el ATP puede actuar como un patrón molecular asociado a daño y se ha reportado como una molécula clave en la fisiopatología del sistema inmune, incluyendo la inmunidad innata, así como en procesos iniciales de la reacción inflamatoria como la quimiotaxis, en la diferenciación de células del sistema inmunitario como las células T reguladoras, en el proceso de apoptosis de linfocitos T, entre otros [30, 31].

A pesar de esto, hace falta conocer los procesos de liberación del ATP en procesos fisiológicos y su degradación para limitar la respuesta inmune. Tomando en consideración esto, creemos que el estudio de su liberación, acción y degradación en el medio extracelular por células del sistema inmunitario ayudará a entender el papel del ATP en los procesos fisiopatológicos de un espectro amplio de enfermedades, incluyendo el asma.

Objetivo General

Determinar el proceso de regulación de la señalización purinérgica: liberación de ATP en leucocitos sanguíneos de sujetos sanos así como la determinación de su metabolismo en leucocitos obtenidos de pacientes asmáticos.

Objetivos Particulares

- 1.-Analizar el papel que tiene la señalización del ATP a través de los receptores P2Y y P2X sobre la liberación de ATP u otros nucleótidos en leucocitos sanguíneos de sujetos sanos.
- 2.- Analizar la expresión de las ectonucleotidasas en leucocitos sanguíneos de pacientes con crisis asmática de diferentes niveles de gravedad.

----- Primer capítulo -----

“El ATP libera ATP u otros nucleótidos a través de receptores purinérgicos P2 en leucocitos de sangre periférica”

Marco Teórico

Generalidades de la acción del ATP en el sistema inmune.

El ATP, central dentro de los procesos energéticos intracelulares, es una molécula de señalización extracelular que participa en la homeostasis del sistema inmune. Evidencia reciente ha posicionado al ATP como regulador central dentro de múltiples procesos inmunológicos, como la quimiotaxis [32, 33], el desencadenamiento de la inflamación [30, 34], liberación de citocinas[35], la regulación de la diferenciación de células T[36], entre otros procesos.

Receptores Purinérgicos

Para efectuar su acción el ATP requiere la activación de familias de receptores membranales purinérgicos conocidos como P2X y P2Y. Los P2X son receptores canal catiónicos inespecíficos permeables a Ca^{2+} , Na^+ y K^+ mientras que los P2Y son receptores metabotrópicos que efectúan su acción a través de la activación de proteínas G y formación de segundos mensajeros. Para poder entender los mecanismos asociados a la señalización de estos receptores en la respuesta inmune normal a continuación se realiza una descripción de los mismos [29, 37, 38].

Receptores P2Y

Los receptores P2Y pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G o GPCR. Estas proteínas son de la clase A por su similitud en la secuencia primaria al receptor a rodopsina; dentro de esta clase, los receptores P2Y pertenecen a la rama delta debido al tipo de ligando por los que son activados, responden a nucleótidos a base de purinas mayoritariamente y a pirimidinas en un menor grado [39].

Poseen las características de los GPCR típicos que incluyen siete dominios transmembranales conectados por 3 asas extracelulares y 3 intracelulares, el dominio N terminal se encuentra de manera extracelular, el C terminal se encuentra al interior de la célula. A la fecha se han reconocido 8 receptores purinérgicos en humanos (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ and P2Y₁₄) mientras que los receptores P2Y₃ y P2Y₈ solamente están descritas para aves y anfibios, respectivamente [26, 40, 41] .

La familia de los receptores P2Y presentan una alta variabilidad en los aminoácidos que los conforman, por ejemplo a pesar de que P2Y₁ y P2Y₁₁ poseen perfiles farmacológicos parecidos solamente presentan un 19% de homología entre su estructura proteica primaria. Adicional a esto los receptores P2Y₁₀ y P2Y₉ son considerados receptores huérfanos, debido a que no se conoce el ligando endógeno, mientras que P2Y₅ es conocido actualmente como el receptor a leucotrieno B₄ [26, 40, 41]

Al igual que otros GPCR la señalización de la familia de los P2Y es a través de proteínas G, principalmente Gq/11, mientras que P2Y₁₂, P2Y₁₃ and P2Y₁₄ actúan a través de proteínas Gi/o. Su activación lleva al encendido de diversas cascadas que incluyen a fosfolipasa C β, fosfolipasa D, fosfolipasa A₂, adenilato ciclasa y MAPK/MEK cinasa [41]. A pesar de que se les conoce de manera clásica como los receptores purinérgicos existen receptores que en la nomenclatura son descritos como pirimidérgicos, sin embargo, para fines de este trabajo posterior a su descripción inicial todos se reconocerán como receptores purinérgicos.

➤ **P2RY₁**

El receptor purinérgico P2Y₁ es una proteína compuesta por 373 aminoácidos y tiene una masa molecular predicha de 42.07 KDa. Esta proteína responde a ADP >> ATP, su activación lleva la activación de la vía de señalización mediada por la proteína Gq/11: fosfolipasa C y la consecuente liberación de Ca²⁺ intracelular. [42, 43]

➤ **P2RY₂**

El receptor purinérgico 2 P2Y₂ es una proteína compuesta por 377 aminoácidos y tiene una masa molecular predicha de 42.27 kDa. El rango de afinidad va desde UTP = ATP >

ATP-gamma-S \gg 2-methylthio-ATP = ADP. Se encuentra acoplado a proteína Gq/11 que activan el sistema de segundos mensajeros fosfatidili inositol/ Ca²⁺. [44, 45]

➤ **P2RY₄**

El receptor pirimidérgico P2Y₄ es una proteína compuesta por 365 aminoácidos y tiene una masa molecular predicha de 40.96 KDa. Este receptor responde a UTP, pero en menor grado a ATP, ADP o UDP. Se encuentra acoplado a proteína G₁₁ que activan el sistema de segundos mensajeros fosfatidili inositol/ Ca²⁺. [46, 47]

➤ **P2RY₆**

El receptor purinérgico P2Y₆ es una proteína compuesta por 377 aminoácidos y tiene una masa molecular predicha de 42.27 KDa. Este receptor responde a UDP y parcialmente a UTP y ADP, pero no responde a ATP. Se encuentra acoplado a proteína Gq/11 que activan el sistema de segundos mensajeros como fosfatidili inositol/ Ca²⁺. [48, 49]

➤ **P2RY₁₁**

El receptor purinérgico P2Y₁₁ es una proteína compuesta por 374 aminoácidos y tiene una masa molecular predicha de 40.34 KDa. Este receptor responde a ATP y ADP, pero no a UTP o UDP así como a ATP-gamma-S. Se encuentra acoplado a proteínas Gq/11 y G_i que activan el sistema de segundos mensajeros como fosfatidili inositol/ Ca²⁺ e inhiben la adenilato ciclasa. [50, 51]

➤ **P2RY₁₂**

El receptor purinérgico es una proteína compuesta por 374 aminoácidos y tiene una masa molecular predicha de 40.34 KDa. Este receptor responde a ADP y a ATP que inhiben a la adenilato ciclasa, no responde a UDP y a UTP. [52, 53]

➤ **P2RY₁₃**

El receptor purinérgico P2Y₁₃ da origen a una proteína compuesta por 374 aminoácidos y tiene una masa molecular predicha de 40.34 KDa. Este receptor responde a ADP y parcialmente a ATP, UDP y UTP. [54, 55]

➤ **P2RY₁₄**

El receptor purinérgico P2Y₁₄ es una proteína compuesta por 338 aminoácidos y tiene una masa molecular predicha de 38.9 KDa.. Este receptor responde a UDP glucosa, pero no a ATP, ADP o UTP. [56, 57]

Receptores P2X

Los receptores P2X son miembros de la familia de canales iónicos activados por ligando, estos receptores presentan apertura en respuesta a ATP. Cada uno de los receptores de manera funcional está conformado por un trímero de subunidades, las cuales corresponden a los receptores P2X₁ al 7[27]. Estas proteínas comparten una estructura en común con dos dominios transmembranales TM1 y TM2, una asa extracelular grande que contiene los sitios de unión al ATP mientras que los dominios N- y C- terminales se encuentran en el espacio intracelular[58, 59]. Los receptores pueden ser trímeros homoméricos -tres subunidades idénticas- o como trímeros heteroméricos -tres subunidades conformadas por subunidades distintas- y requieren de iones divalentes para mantener su estructura terciaria y por tanto, la parte funcional [27, 58].

Al igual que otros canales activados por ligando presentan tres estados de actividad: uno cerrado, uno abierto y uno desensibilizado aún en presencia de agonistas. En ausencia del ATP estos receptores se encuentran en un estado cerrado e inactivo pero sensible al agonista, con una permeabilidad disminuida a cationes como Na⁺, Ca²⁺ y K⁺. La unión de ATP permite pasar del estado inactivo al activo mediante un cambio conformacional que permite la apertura del poro y el cambio de conductancia de cationes inespecíficos [59].

Por lo general la unión prolongada a ATP a los receptores P2X lleva a la desensibilización de los mismos, un estado en el que no hay conductancia de iones a pesar de la presencia del ATP. La disociación del ATP del receptor permite pasar del estado desensibilizado a

un estado resensibilizado con la capacidad recuperada de responder a un nuevo estímulo[27].

A pesar de mantener una estructura proteica similar, los receptores triméricos homoméricos presentan cinéticas de inhibición distintas en presencia de ATP con un patrón electrofisiológico característico. Las cinéticas de inhibición son rápidas con un patrón de apertura y cierre en cuestión de milisegundos en el caso de P2X₁ y P2X₃, mientras que P2X₂ y P2X₄ la inhibición es lenta; en cambio P2X₇ parece no desensibilizarse en ningún momento. En el caso de P2X₅ y P2X₆, no existe funcionalidad del receptor en forma homomérica, por lo que las cinéticas de activación y desactivación dependen del heterómero formado[27, 60].

➤ P2RX₁

El receptor purinérgico P2X canal iónico 1 de compuerta activado por ligando o P2RX₁, también conocido como P2X₁ es una proteína compuesta por 399 aminoácidos y tiene una masa molecular predicha de 44.98 KDa, al igual que otros miembros de la familia de manera funcional se encuentra en forma trimérica tanto de manera homomérica como heteromérica. [61, 62]. En presencia de ATP presenta un patrón electrofisiológico característico que incluye una desensibilización rápida -en cuestión de milisegundos- aún en presencia del ligando (**Figura 1**).

➤ P2RX₂

El receptor purinérgico P2X canal iónico 2 de compuerta activado por ligando o P2RX₂, también conocido como P2X₂ es una proteína compuesta por 471 aminoácidos y tiene una masa molecular predicha de 51.75 KDa. [63, 64] En presencia de ATP presenta un patrón electrofisiológico característico que incluye una desensibilización lenta -en cuestión de segundos- aún en presencia del ligando (**Figura 1**).

➤ P2RX₃

El receptor purinérgico P2X canal iónico 3 de compuerta activado por ligando o P2RX₃, también conocido como P2X₃, es una proteína compuesta por 397 aminoácidos y tiene

una masa molecular predicha de 44.28 KDa [65, 66]. En presencia de ATP presenta un patrón electrofisiológico característico que incluye una desensibilización rápida -en cuestión de milisegundos- aún en presencia del ligando (**Figura 1**).

➤ **P2RX₄**

El receptor purinérgico P2X canal iónico 4 de compuerta activado por ligando o P2RX₄ también conocido como P2X₄ es una proteína está compuesta por 388 aminoácidos y tiene una masa molecular predicha de 43.36 KDa [67, 68]. En presencia de ATP este canal iónico exhibe apertura por ligando posee una alta permeabilidad al Ca²⁺ y presenta un patrón electrofisiológico característico que incluye una desensibilización lenta -en cuestión de segundos- aún en presencia del ligando (**Figura 1**).

➤ **P2RX₅**

El receptor purinérgico P2X canal iónico 5 de compuerta activado por ligando o P2RX₅, también conocido como P2X₅ es una proteína está compuesta por 422 aminoácidos y tiene una masa molecular predicha de 47.2 kDa. A diferencia de otros receptores el trímero homomérico de P2RX₅ en presencia de ATP no se observa apertura de poro, sin embargo, muestra actividad cuando es una subunidad de un heterotr trímero con P2RX₁. [69, 70]

➤ **P2RX₆**

El receptor purinérgico P2X canal iónico 6 de compuerta activado por ligando o P2RX₆, también conocido como P2X₆ es una proteína está compuesta por 441 aminoácidos y tiene una masa molecular predicha de 48.82 KDa, a diferencia de los otros miembros de la familia P2X no forma trímeros homoméricos ni heteroméricos [71, 72]

➤ **P2RX₇**

El Receptor purinérgico P2X canal iónico 7 de compuerta activado por ligando o P2RX₇, también conocido como P2X₇ es una proteína está compuesta por 595 aminoácidos y

tiene una masa molecular predicha de 68.58 KDa [73, 74]. En presencia de ATP presenta un patrón electrofisiológico que incluye una falta de desensibilización, es decir, el poro permanece abierto en presencia del ligando (**Figura 1**).

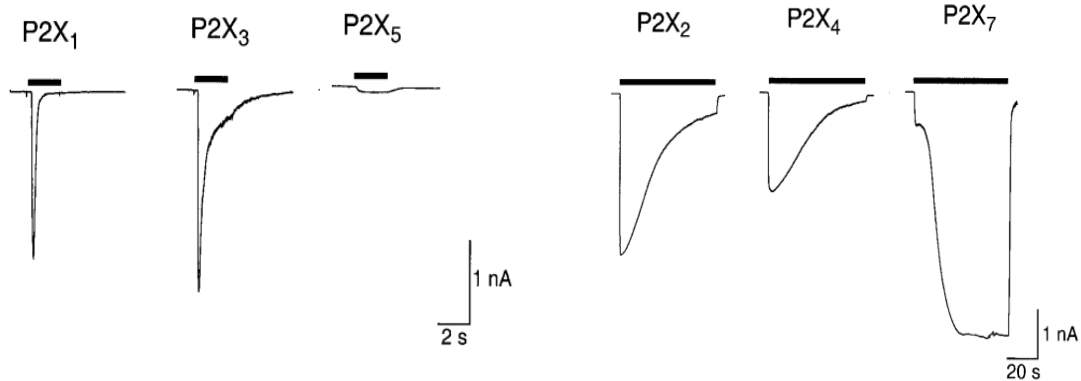


Figura 1.- Patrones de desensibilización de los receptores P2X homoméricos a ATP (tratamiento con 30 μ M para todos, a excepción para P2X₇ que fue tratado con 1 mM) Se observan dos tipos de desensibilización rápida en el caso de P2X₁ y P2X₃ y lenta como en P2X₂ Y P2X₄. Para P2X₇ se observa que no desensibiliza y se mantiene activo mientras hay estímulo purinérgico. Imagen modificada de North, R.A., *Molecular physiology of P2X receptors*. *Physiol Rev*, 2002. 82(4): p. 1013-67

Antecedentes

Señalización purinérgica y sistema inmunitario

El sistema inmunitario puede ser dividido en dos grupos principales: el sistema inmune residente en tejidos y el sistema inmune circulante –en sangre-. El sistema inmune residente en tejidos periféricos está mayormente compuesto por mastocitos, macrófagos y células dendríticas, mientras que el sistema circulante está compuesto por células mononucleares y polimorfonucleares. Las células polimorfonucleares corresponden a los neutrófilos, los basófilos y los eosinófilos; mientras que las mononucleares corresponden a células NK, linfocitos T y B, así como los monocitos –precursores del macrófagos y dendríticas- [1, 75].

Todos los tipos celulares descritos previamente, tanto componentes de la respuesta inmune innata como de la adaptativa, responden a la presencia de ATP en el medio extracelular, siendo este clave dentro de los procesos fisiológicos [37, 38, 76, 77]. Sin embargo, hace falta reconocer los papeles que tiene la señalización purinérgica dentro del montaje y modulación de la respuesta inmune inflamatoria.

Células Polimorfonucleares

Las células polimorfonucleares o granulocitos forman parte de la inmunidad innata y tienen dos tipos principales de funciones la inmunomodulación y la defensa antimicrobiana. A causa de los extendidos teñido con Giemsa podemos dividirlos en neutrófilos, representando el mayor porcentaje, así como los basófilos y los eosinófilos [78].

➤ Regulación de la función de los neutrófilos por ATP

Se ha descrito que los neutrófilos expresan los receptores purinérgicos P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁ y P2Y₁₄, P2X₁, P2X₄, P2X₅ y P2X₇, que han sido descritos de manera consistente en este subtipo celular, sin embargo en relación a la expresión del receptor P2X₂, P2X₃ y P2X₆ los resultados aún no son concluyentes [79-82]. A pesar de que el mRNA y proteína de casi todos los receptores purinérgicos se encuentra expresado en los neutrófilos, el mRNA y

proteína de P2Y₂ se encuentra expresado en mayor proporción [83], por lo que mucho del efecto funcional del ATP sobre neutrófilos ha sido asociado a este receptor.

Una de las principales características de los neutrófilos es su alta capacidad de migración hacia los sitios donde las señales quimiotácticas han sido secretadas durante el proceso inflamatorio. Adicional a la presencia de quimiocinas, péptidos pequeños y citocinas, se ha descrito que el ATP puede participar de manera importante en este proceso. Se ha reportado en neutrófilos – provenientes de línea celular de H60 derivada ratón, o los obtenidos en sangre humana- que el ATP a través del receptor P2Y₂ induce el rearrreglo del citoesqueleto –polimerización de actina- así como la formación de filopodios o lamelopodios, estructuras transitorias necesarias para la migración celular y el proceso de extravasación. Adicional a esto, se ha descrito de manera funcional en un modelo *in vitro* de migración celular que los neutrófilos provenientes de ratones knockout para P2Y₂ no migran de manera adecuada aún con el estímulo de un quimiotáctico clásico como la N-formilmetionina, debido a una falta de orientación celular. Sin embargo, parece ser que es la adenosina, un producto del catabolismo del ATP, la responsable de la velocidad de migración.

Adicional a los experimentos *in vitro* se ha descrito que P2Y₂ es clave para la migración de los neutrófilos *in vivo*, en un modelo de daño tisular en un ratón knockout para este receptor se ha observado que los neutrófilos no infiltran el hígado de manera adecuada cuando P2Y₂ está ausente [84].

Otra función clave de los neutrófilos es la fagocitosis y la liberación de sustancias con capacidad de daño. Se ha descrito que el ATP a través de P2Y₂ induce la exocitosis de los gránulos citoplasmáticos en neutrófilos humanos, esto medido por la liberación de elastasa al medio extracelular[85]. Además, se ha reportado que el tratamiento con ATP incrementa el proceso de fagocitosis mediado por IgG (fagocitosis de partículas de levadura) e induce un incremento del estallido respiratorio, así como la degranulación medida por aumento de mieloperoxidasa en el medio extracelular [86].

Dentro del proceso de estallido respiratorio se ha observado que el ATP induce también la formación de uno de los radicales libres más importantes, el superóxido, tanto en neutrófilos obtenidos de rata como de humano siendo este aumento de especies reactivas de oxígeno mediado por P2X₇[82]. A pesar de este reporte, se ha descrito P2Y₂ y el receptor a FMLP (un péptido asociado a proteínas bacterianas) pueden actuar de

manera sinérgica, induciendo un aumento de producción de radical superóxido en neutrófilos humanos, lo que podría permitir una mejor respuesta de estallido respiratorio en presencia de patrones moleculares asociados a patógenos [87].

Adicional a esto se ha descrito que en presencia de lipopolisacárido LPS (una molécula asociada a la pared celular bacteriana), el ATP a través del receptor P2Y₂ potencia la secreción de IL-8 en neutrófilos, una potente quimiocina; sumado a esto se ha descrito que la inhibición de ENTPDasa 1, enzima encargada de degradar los nucleótidos en el medio, incrementa la secreción de IL-8 en neutrófilos humanos estimulados por LPS, lo que sugiere que incrementa la concentración total de ATP en el medio extracelular y por tanto el efecto sobre los neutrófilos y en los tejidos circundantes. Dentro de esta línea se ha descrito que la disminución de la expresión de P2Y₂ de manera experimental inhibe liberación de IL-8, lo que refuerza la idea de que este receptor es clave para la secreción de esta quimiocina [88].

Finalmente, se ha descrito que el ATP participa en la retroalimentación negativa del proceso inflamatorio, se ha propuesto que el ATP a través de P2Y₁₁ inhibe la apoptosis de los neutrófilos de ratón, lo que permitiría la supervivencia de estos, mientras no se haya resuelto el daño.

➤ **Regulación de la función de los eosinófilos por ATP**

Se ha descrito la presencia del mRNA para P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₄, P2X₁, P2X₄, y P2X₇ en eosinófilos obtenidos de sangre humana [89, 90]. A pesar de esto, la mayor parte de la acción del ATP se ha descrito en relación a P2Y₂, por lo que muchos de los reportes están relacionados a este receptor purinérgico [91].

Se ha reportado que el ATP participa en la quimiotaxis de los eosinófilos en un modelo de asma, donde el tratamiento con apirasa disminuye la infiltración de los eosinófilos hacia la vía aérea [92]. Este proceso parece ser dependiente de la activación de P2Y₂, donde el ATP induce la migración de estas células [32], tanto que el knockout de P2Y₂ los eosinófilos no migran en un modelo de asma inducido por sensibilización a ovoalbúmina [91]. Adicional a esto el ATP se ha involucrado en la producción de radicales libres, la proteína CD11b y la producción de citocinas como IL-8, probablemente mediada por P2X₁, P2X₇ y P2Y₆ [91].

La estimulación de los receptores P2 por ATP induce la degranulación de los eosinófilos humanos, mediado por liberación de la proteína catiónica eosinófila –presente en los gránulos citoplasmáticos- probablemente mediada por receptor P2Y₂ [93]

➤ **Regulación de la función de los basófilos por ATP**

Se ha propuesto que la degranulación y la liberación de histamina en basófilos humanos es desencadenada por UTP y UDP, sugiriendo que este proceso está mediado por los receptores P2Y₂, P2Y₄ o P2Y₆. En un modelo de knockout de ENPP3 –enzima encargada de degradar el ATP extracelular-, donde los niveles de ATP se encuentran elevados en plasma se ha descrito inflamación crónica y se encuentra relacionada con la acción de los basófilos [94].

Células Mononucleares

Las células mononucleares forman parte tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa y tienen diferentes funciones dependiendo del subtipo celular que van desde la fagocitosis, presentación de antígenos, inducción de la muerte celular, la inmunomodulación y la liberación de anticuerpos. Dentro de estos encontramos a los macrófagos, células dendríticas, células NK, mastocitos así como linfocitos T y B.

➤ **Monocitos.**

Los monocitos forma parte de los leucocitos circulantes, sin embargo, de manera fisiológica abandonan la circulación y se diferencian en macrófagos o células dendríticas en los tejidos expuestos con el medio externo, como los alveolos o el intestino [75, 95].

➤ **Macrófagos**

Regulación de la función macrófagos por ATP

Se ha descrito la presencia de casi todos los receptores P2X y P2Y en los macrófagos (P2Y₁₂, P2X₂, P2X₃, and P2X₆ están ausentes), se ha reportado que sólo presentan una

respuesta funcional los receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2X₄ y P2X₇ [96-98]. A pesar de esto se ha definido que los receptores P2X₇ y P2Y₂ presentan un papel central dentro de la fisiología del macrófago, independientemente de su localización histológica.

Con respecto a la secreción de citocinas por los macrófagos se han descrito diferentes tipos de acciones del ATP dependiendo del contexto inmunológico en el que se encuentre. Se ha reportado que la acción sola del ATP suprime la liberación de IL-12 y TNF- α en macrófagos de ratón [99], lo que sugiere la transición hacia un estado antiinflamatorio.

Sin embargo, existen más trabajos que han reportado el papel del ATP en conjunto con LPS -en un contexto más cercano al fisiológico-, donde se ha descrito la inducción de un estado proinflamatorio o exacerbando el mismo. Se ha reportado en los macrófagos de ratón que el co-tratamiento de ATP con LPS induce un aumento de la liberación de óxido nítrico y las moléculas TNF- α e IL-1 β , relevantes dentro del estado inflamatorio, siendo la secreción significativamente mayor a la observado solamente con el tratamiento con LPS [100], lo que sugiere que esta acción es sinérgica.

Uno de los mecanismos descritos involucrados en el desencadenamiento el estado inflamatorio de los macrófagos es a través de la activación del inflamosoma. Se ha descrito que en los macrófagos el contratamiento de LPS y ATP que la activación del receptor P2X₇ induce la disminución de los niveles de potasio y permitiendo la activación del inflamosoma; siendo esta activación requerida para la secreción de IL1 β e IL-18 [101]. Por lo tanto se sugiere que exponer a los macrófagos/monocitos con PAMPs con LPS es suficiente para estimular la síntesis de pro-IL-1 β , pero la secreción de esta requiere una segunda señal que es proveída por ATP a través de P2X₇ [101].

En relación a la fagocitosis, se ha descrito que en macrófagos murinos hay un aumento de la fagocitosis en presencia de ATP, ADP y UTP, mientras este proceso se inhibe con suramina, un antagonista de la señalización de P2Y [102].

➤ **Células dendríticas**

Regulación de la función de las células dendríticas por ATP

Se ha reportado que las células dendríticas humanas expresan el mRNA para los receptores ionotrópicos P2X₁, P2X₄, P2X₅ y P2X₇, así como los metabotrópicos P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁ y P2Y₁₄ [103-106]. A pesar de que se ha descrito que las células

dendríticas expresan un amplio espectro de los receptores purinérgicos, el receptor P2X₇ se encuentra más expresado que los demás receptores; por esto, muchos de los efectos descritos por acción de ATP son asociados a la activación de este receptor, sin embargo la información experimental en este sentido es limitada [105].

Se ha descrito que la activación de P2Y₁₁ por ATP induce la maduración de células dendríticas (1,2) medido a través del marcador CD83, en un proceso que actúa de manera sinérgica con TNF- α para realizar este proceso [107, 108]. En el caso de la secreción de citocinas se ha descrito que en células dendríticas humanas el tratamiento con ATP, a través del receptor ionotrópico P2X₇, induce la secreción de TNF- α e IL-1 β , dos citocinas proinflamatorias importantes en el desarrollo de la respuesta inmune. Además de la activación del receptor P2X₇, también se ha descrito que la activación del receptor P2Y₁₁ a través de ATP induce la liberación de IL-12, una citocina proinflamatoria [105].

Sin embargo, la secreción de citocinas por ATP depende del estado de maduración de las células dendríticas; en el caso de las células dendríticas maduras se ha observado que el tratamiento con ATP inhibe la secreción de IL-12 y otras citocinas proinflamatorias, pero induce la liberación de IL-10 y de IL-1 α [108]. Además a esto, independientemente del estado de diferenciación de las células dendríticas se ha descrito que el tratamiento con ATP induce la expresión de moléculas reconocidas como marcadores de maduración dendrítica y requeridas para la presentación de antígenos como CD54, CD80, CD83 y CD86, en dendríticas maduras e inmaduras, reduciendo la actividad endocítica de las células dendríticas y aumenta la presentación antigénica -promoviendo la proliferación de linfocitos T vírgenes- [99].

En un contexto más fisiológico se ha descrito que la señalización de ATP sinergiza con LPS para la liberación de IL-10, mientras que en conjunto con TNF- α sinergiza para la liberación de IL-12; sin embargo, el co-tratamiento de ATP y LPS disminuye la producción de IL-12 en dendríticas derivadas de monocitos humanos sanguíneos y eleva los niveles de los RNA mensajeros de IL-12p40 y p35, moléculas relevantes en la diferenciación de las células T CD4⁺ nativas hacia Th1 [109].

En relación a la migración de las células dendríticas se ha reportado en la literatura un efecto dual por ATP: se ha descrito que el tratamiento con ATP a través de P2Y₁₁ inhibe la migración de dendríticas inmaduras a dosis bajas y disminuye la capacidad de migración de las dendríticas maduras humanas o células plasmotocitoides maduras bajo el estímulo quimiotáctico de LPS o CD40 [110]. Por otra parte, se ha descrito que el ATP

induce la migración de dendríticas de ratón generadas a partir de médula ósea, mientras que el tratamiento con apirasa –una variante soluble de ENTPD1, enzima encargada de la degradación de ATP- disminuye la migración de estas células hacia el ATP en un modelo *in vitro* [92].

➤ Linfocitos T y B

Regulación de la función de los linfocitos por ATP

Se ha descrito la presencia del mRNA de todos los receptores P2Y y P2X tanto en linfocitos T y B humanos [111-113]; sin embargo, se ha reportado que el receptor P2X₇ se encuentra expresado en mayor medida en comparación a los demás receptores P2, por lo que muchas de las acciones del ATP sobre los linfocitos se han asociado a la activación de este receptor.

Se ha descrito que la señalización autócrina de ATP induce la proliferación de los linfocitos T a través de la estimulación de los receptores P2X₁, P2X₄ Y P2X₇ [114]. Se ha reportado que el mecanismo es mediante un incremento de la expresión de IL-2 en linfocitos T, una citocina requerida para la activación y proliferación de linfocitos T y B [114].

La señalización purinérgica forma parte del proceso normal de la activación de los linfocitos T. Se ha descrito que la activación del receptor de células T o TCR induce la liberación ATP en células Jurkat y linfocitos T CD4⁺ de humano [115]; además, la activación de TCR induce la expresión de ENTPD1 en linfocitos Treg de ratón a través de FoxP3 [116]. En conjunto, estos dos procesos actúan como mecanismos de regulación de la activación de los linfocitos. Asimismo, se ha descrito que en presencia de ATP los linfocitos T escinden dos proteínas membranales: CD62L (L-selectina) y CD23, proceso dependiente de P2X₇ [117]. El CD23 es un receptor de baja afinidad de IgE expresado en leucocitos, con capacidad de actuar induciendo el crecimiento de los precursores de linfocitos B. Esta proteína participa en la diferenciación de linfocitos T y B y la secreción de citocinas de los monocitos [118].

Una de las acciones críticas del ATP en los linfocitos es la inducción de la apoptosis de los mismos y en este proceso se ha sugerido una asociación con los niveles de P2X₇. Las células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ poseen mayor cantidad de estos receptores y son más sensibles a la muerte celular [119]; por otra parte, los linfocitos T citotóxicos se ha

descrito que son los menos sensibles a apoptosis por ATP y se ha sugerido que esta falta de sensibilidad es secundaria a una expresión disminuida de P2X₇ [119].

El ATP participa en el proceso de diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes. Se ha observado que el tratamiento con ATP induce la diferenciación de estos linfocitos en Th17 en la lámina propia del intestino, con la consecuente expresión de IL-6, IL-23p19 y TGF- β , moléculas del espectro proinflamatorio [36]. En contra parte, se ha descrito que el antagonismo de P2X₇ induce diferenciación de linfocitos T vírgenes CD4⁺ hacia Treg CD4⁺ CD25⁺ posterior a la estimulación del TCR [120].

En células T CD8⁺ se ha reportado que los niveles intracelulares de ATP se elevan al ser activadas y adicional a esto, liberan ATP. En el caso de los linfocitos B el tratamiento con ATP induce un aumento de las concentraciones de Ca²⁺ intracelular y a su vez, se incrementan los niveles de c-fos y c-myc, factores de transcripción involucrados en la activación de estas células [121].

En relación a los receptores P2Y existen pocos reportes de la función y expresión de estos receptores en linfocitos, en estos sólo se ha reportado que en células T la UDP-glucosa inhibe la elevación de AMPc causado vía P2Y₁₄, sin ahondar la relevancia biológica de este proceso [122].

➤ Células NK

Regulación de la función de las células NK por ATP

Se ha reportado que las células NK de humano expresan los mRNAs de P2X₁, P2X₄₋₇ y de todos los receptores P2Y [123-126]. Se ha descrito que el ATP regula la actividad citotóxica de las células NK a través de P2Y₁₁; mientras que en células tratadas con ATP aumenta la quimiotaxis, sin embargo, existen reportes de que el ATP inhibe este fenómeno en respuesta a otras quimiocinas como CXCL1 [127].

➤ Células Cebadas

Regulación de la función de las células cebadas por ATP

En células cebadas se ha descrito el mRNA para los receptores P2X₁, P2X₄ y P2X₇, así como la presencia de P2Y₁, P2Y₂, P2Y₁₁, P2Y₁₂, y P2Y₁₃ [128-130]. Se ha descrito que el ATP induce la degranulación de las células cebadas y que aumenta la respuesta en caso de otros estímulos, esto mediado por la liberación de histamina; sin embargo, este proceso parece no involucrar a los receptores P2. Se ha reportado que el ATP puede inducir la secreción de citocinas IL-4, IL-6, IL-13 y TNF- α , así como la inducción de la apoptosis a través de P2X₇ en células cebadas de ratón. [128].

Liberación de ATP al medio extracelular

La presencia de ATP en el medio extracelular es relevante para la fisiopatología de muchos tejidos y sistemas, por lo que su mecanismo de liberación debe ser altamente regulado. Además, los mecanismos de liberación incluyen procesos variados y estos dependerán del tipo celular que esté realizando. Dentro de estos mecanismos se han descrito la liberación por exocitosis, la liberación por canales y hemicanales, entre otros; sin embargo, la mayor parte de la literatura hace reporte de estos en tejidos derivados del sistema nervioso. En el caso de las células del sistema inmune se han descrito varias vías de liberación de ATP al medio extracelular, entre las que encontramos la lisis celular, la exocitosis y liberación a través de hemicanales de conexinas o canales de panexinas, por su relevancia en la fisiología del sistema inmunitario se enumerarán a continuación.

Daño y muerte celular

Quizá uno de los métodos más reconocidos de la elevación de ATP extracelular es durante los procesos de necrosis o lisis celular. Las células en estado fisiológico pueden llegar a presentar concentraciones de ATP tan elevadas que pueden estar presentes en rangos milimolares, por lo que el daño tisular con exposición del líquido intracelular eleva de manera considerable esta molécula en el medio extracelular. Éste es uno de los mecanismos más importantes en los que el ATP es reconocido como patrón molecular asociado a daño por las células del sistema inmune [21, 131].

Exocitosis

La elevación de ATP en el medio extracelular no sólo es consecuencia del daño celular, sino que se ha descrito diversos mecanismos fisiológicos donde ocurre la liberación de este nucleótido. El primer caso y el reconocido clásicamente es el ATP liberado por exocitosis, esto descrito en su papel como neurotransmisor [132]. Tanto las neuronas del sistema nervioso central [24] y del sistema periférico responden a ATP, donde se ha asociado a la respuesta a esta molécula a través de receptores purinérgicos tipo P2X o P2Y; estos receptores “detectan” los niveles elevados de esta molécula en el medio extracelular e inducen la generación de estímulos de tipo excitatorio o inhibitorio. Para realizar la acción como neurotransmisor se ha descrito que el ATP es almacenado en vesículas sinápticas de los axones, dendritas y terminales nerviosas tanto de astrocitos [133, 134] y neuronas [24, 135] que es liberado hacia el espacio sináptico empleando un mecanismo similar al de otros neurotransmisores.

Sin embargo, el proceso de exocitosis no sólo está asociado a la liberación de neurotransmisores, sino que es un proceso de excreción/liberación de moléculas al medio extracelular de muchos subtipos celulares como en el caso las células endócrinas. En el caso del sistema inmune la exocitosis forma parte de los mecanismos de liberación de enzimas y moléculas de señalización al medio extracelular. Así mismo se ha descrito que este mecanismo es empleado para la liberación de ATP en células del sistema inmune, en el caso de la microglía [136] así como en los monocitos y los macrófagos de bazo [137]. Sin embargo no sólo estas células poseen vesículas con la capacidad de sufrir exocitosis dentro de sus procesos fisiológicos, sino que las células NK y las células cebadas poseen esta estructura histológica [75], por lo que la liberación de ATP a través de lisosomas secretores se ha sugerido en otras células del sistema inmune y adicional a aquellas que dentro de sus procesos fisiológicos llevan a cabo exocitosis –polimorfonucleares- sin embargo, aún hace falta información del papel de este mecanismo en los diferentes subtipos celulares del sistema inmunitario.

Hemicanales de conexinas

Un segundo mecanismo de liberación de manera fisiológica de ATP que se ha descrito en células del sistema inmune es a través de hemicanales de conexina. Las conexinas son proteínas transmembranales que forman parte de las uniones características de las células

de tipo epitelial o de los miocardiocitos [138-142]. Para realizar este tipo de uniones los monómeros de conexinas se agrupan en unidades oligoméricas de 6 elementos, formando una estructura conocida como hemicanal, debido a que solo está presente en una célula, por lo que la unión de dos hemicanales de células adyacentes, forman el canal de conexinas o conexón [138-142]. Estos canales son permeables a moléculas de distintos tamaños, iones, segundos mensajeros y moléculas de hasta 1kDa, en el caso de humanos existen 21 miembros de la familia de conexinas [138].

Además de la comunicación intercelular se ha descrito que independientemente de la formación de los conexones, los hemicanales de conexinas pueden presentar apertura hacia el medio extracelular funcionando como medios conductivos para la salida de diversas sustancias, como el ATP. Sin embargo, no son canales constitutivos, sino que su acción es inducible, por lo que se ha reportado la formación y apertura de estas estructuras como dependiente de condiciones internas y externas de la células, como la presencia de calcio en el medio intracelular [143], dependencia de fosforilaciones [144, 145], cambios mecánicos así como cambios en el voltaje [146] y del pH [147].

En el caso del sistema nervioso se ha descrito que las células de la glía presentan liberación de ATP empleando hemicanales de conexinas. Los astrocitos -células que presentan elevados niveles de conexinas 43- pueden presentar liberación de ATP a través de hemicanales de conexinas en condiciones patológicas. En modelos de ratón se ha reportado que la disminución de las concentraciones de calcio extracelular induce la apertura de los hemicanales de conexinas liberando ATP y glutamato en este subtipo celular [148]. Por otra parte, en el caso de las células de Schwann se ha descrito la liberación de ATP a través de hemicanales de conexina 32, por lo que parece ser un mecanismo de liberación de ATP conservado en las células de la glía [149].

En relación a las células del sistema inmune se ha descrito que presentan niveles elevados de conexinas, sobre todo conexina 43, en diferentes subtipos celulares como lo son macrófagos, neutrófilos, dendríticas, linfocitos T, linfocitos T reguladores, linfocitos B, entre otras [140]. Además se ha observado la elevación de conexina 43 en estos subtipos celulares en el estado inflamatorio. Sin embargo, la apertura de hemicanales de conexinas hasta el momento sólo se ha descrito en células polimorfonucleares y monocitos [150].

En el caso de los neutrófilos se ha observado que la activación del receptor para N-formilmetionina, un activador por excelencia de la respuesta inmune y del estado inflamatorio, induce la liberación de ATP a través de hemicanales de conexinas en el

extremo apical de los neutrófilos activados, mientras que su inhibición a través de ácido 18- α glicirretínico, bloqueador de canales de conexinas, disminuye las concentraciones de este nucleótido en el medio extracelular [150].

Por otra parte se ha reportado que los monocitos presentan liberación de ATP a través de hemicanales de conexinas en un modelo de aterosclerosis, donde la liberación de este nucleótido permite la adhesión de estas células al endotelio vascular, quien también presenta liberación de ATP a través de la formación de este hemicanal de conexina 43 [151]. Sin embargo, debido a que muchos otros subtipos celulares presentan niveles elevados de conexinas, hace falta información de los mecanismos involucrados.

Canales de panexinas

Un último mecanismo descrito para la liberación de ATP por las células del sistema inmune es a través de canales de panexinas. Estas proteínas, de reciente descubrimiento tienen una homología estructural a las conexinas, sin embargo, no presentan homología en la secuencia primaria de proteínas sin embargo, forman parte del sistema de conexión directo de las células con el medio exterior [76, 140]. Estos canales están formados por subunidades de proteínas conocidas como panexinas, que se agrupan en forma multimérica -6 unidades- formando en una célula el canal. En el caso de mamíferos se han descrito tres tipos de panexinas: panexina 1, panexina 2 y panexina 3, sin embargo, sólo panexina 1 es capaz de formar homómeros [152-154].

En el caso del sistema nervioso se ha descrito la presencia de la apertura de este canal y la liberación de ATP en neuronas sin embargo su activación es de manera indirecta. Se ha reportado que la activación de los receptores P2X7 a través de ATP permite un primer ingreso de cationes y un cambio conformacional en este receptor que permite la asociación física de los receptores P2X7 con canales de panexinas, esta asociación permite su apertura y consiguiente difusión de ATP al espacio sináptico [155-157].

Las panexinas están presentes en macrófagos, linfocitos B, linfocitos T, neutrófilos y células dendríticas [140]. Sin embargo, la liberación de ATP a través de estos canales sólo se ha descrito en linfocitos T y neutrófilos de ratón; en el primer caso se ha reportado que la activación del receptor de células T (TCR por sus siglas en inglés) induce la liberación de ATP; durante este proceso se ha observado que la inhibición de canales de panexinas con péptidos específicos así como carbenoxolona disminuyen la concentración de este

nucleótido en el medio extracelular [158]. Sin embargo, la apertura de este canal es de método indirecto, mediante la activación de P2X₇, por lo que la inhibición de este receptor disminuye la liberación de ATP.

En el caso de neutrófilos se ha observado que la activación del receptor para N-formilmetionina, un activador por excelencia de la respuesta inmune y del estado inflamatorio, induce la liberación de ATP a través de canales de panexinas, mientras que la disminución de la expresión de este receptor por RNA de interferencia disminuye las concentraciones de este nucleótido en el medio extracelular [83].

ATP y reacción inflamatoria

Debido a que el ATP tiene un papel importante en la homeostasis del sistema inmune los niveles extracelulares de esta molécula son regulados de manera precisa y continua. Las enzimas responsables de la degradación de ATP en metabolitos que no activan los receptores purinérgico, como el AMP se conocen como ectonucleotidasas. Las ectonucleotidasas se dividen en tres familias: las nucleótido trifosfato difosfohidrolasas o ENTPDasas 1-8, las nucleótido pirofosfatasas o ENPPs 1-7, y las fosfatasas alcalinas.

El ATP puede ser liberado al medio extracelular por lisis celular o mediante mecanismos fisiológicos como los son la liberación mediante difusión y la exocitosis, ambas activadas mediante cascadas de señalización [24, 137]. La mayor parte de los estudios en el sistema inmune se han centrado en la liberación del ATP mediante procesos difusivos; se ha descrito que en neutrófilos el tratamiento con formil-metionil-leucin-fenilalanina o FMLP –un polipéptido reconocido con un patrón molecular asociado a patógenos- induce la activación de su receptor y activación de la proteína Gq que induce la liberación de ATP mediado por conexinas [159]. Por otra parte, en linfocitos T se ha descrito que la liberación de ATP puede ser mediada a través de hemicanales conexinas y canales de panexinas cuando se estimula el receptor de células T (TCR) de manera experimental [158].

Para realizar sus efectos el ATP activa cascadas de señalización mediante receptores purinérgicos o P2, estos se subdividen en metabotrópicos P2Y (1,2,4,6,11,13,14) asociados a proteínas G que activan cascadas de señalización o los P2X (1-7) que activan canales catiónicos inespecíficos mediados por ligando [26, 60]. Debido a que el ATP tiene un papel importante en la fisiopatología del sistema inmune los niveles extracelulares de esta

molécula son regulados de manera precisa y continua. Las enzimas responsables de la degradación de ATP en sus respectivos metabolitos como la adenosina y fosfato inorgánico, se conocen como ectonucleotidasas [29, 160]. Estas enzimas así como los receptores purinérgicos se han descrito en células del sistema inmune incluyendo los neutrófilos y los linfocitos T [38].

Problema de investigación

Recientemente se ha descrito que la liberación de ATP puede estar asociada a la activación de receptores purinérgicos. En la literatura se ha reportado que en linfocitos T en cultivo la acción de ATP sobre los receptores P2X₇ puede inducir la liberación de ATP a través de la coactivación de los canales de panexina-1 [158]. Además se ha descrito que los hemicanales de conexina, importantes para la liberación de ATP en células del sistema inmune [150], pueden presentar apertura por elevación de calcio intracelular derivado de la activación de la proteína Gq, sistema activado por los receptores P2Y_{1,2,4,6,11} [26]. Con base en estos antecedentes y a pesar de que se reconoce la importancia de los receptores P2X y P2Y en la fisiopatología del sistema inmune, aún hace falta ahondar en los mecanismos de la liberación de ATP mediado por la activación de receptores purinérgicos.

Importancia

El papel del sistema inmune y la inflamación como elementos clave dentro de una gran cantidad de patologías es indiscutible. A pesar de los esfuerzos en reconocer los procesos asociados a la reacción inflamatoria, la tolerancia inmunológica y las reacciones de hipersensibilidad aún hace falta información sobre los mecanismos de regulación de estos eventos. Realizar estudios donde se obtenga información sobre las moléculas que permiten la interacción entre las células del sistema inmune y los tejidos circundantes, en este caso de los nucleótidos extracelulares así como su liberación y degradación, permite reconocer y disecar con mayor profundidad la fisiología del sistema inmune

Hipótesis

El ATP actúa sobre receptores tipo P2X y P2Y_{1,2,4,6,11} para permitir la liberación de ATP mediante mecanismos de liberación como difusión y de exocitosis en células mononucleares y polimorfonucleares.

Objetivo General

Determinar el proceso de regulación de la señalización purinérgica: liberación de ATP en leucocitos sanguíneos de sujetos sanos así como la determinación de su metabolismo leucocitos obtenidos de pacientes asmáticos.

Objetivos Particulares

1.-Analizar el papel que tiene la señalización del ATP a través de los receptores P2Y y P2X sobre la liberación de ATP u otros nucleótidos en leucocitos sanguíneos de sujetos sanos.

2.- Analizar la expresión de las ectonucleotidasas en leucocitos sanguíneos de pacientes con crisis asmática de diferente gravedad

Objetivos Específicos

1.- Determinar la liberación de ATP mediada por la incubación con ATP en leucocitos obtenidos de muestras sanguíneas de sujetos sanos.

1.1.- Se analizará la producción de fosfatos mediante colorimetría empleando verde de malaquita y molibdato de sodio en células mononucleares y polimorfonucleares en presencia de ATP.

1.2.- Se determinará la producción de fosfatos en la presencia de bloqueadores, antagonistas y agonistas de los receptores purinérgicos empleando el método colorimétrico de verde de malaquita y molibdato de sodio en células mononucleares y polimorfonucleares en presencia de ATP.

2.- Determinar la expresión de los receptores purinérgicos en leucocitos obtenidos de muestras sanguíneas de sujetos sanos.

2.2. Se examinará la expresión de las proteínas para P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁ en células mononucleares y polimorfonucleares mediante citometría de flujo.

3.- Determinar la vía de liberación de ATP en leucocitos obtenidos de muestras sanguíneas de sujetos sanos.

3.1.- Se analizarán la producción de fosfatos en la presencia de inhibidores de hemicanales de conexinas y canales de panexinas en células mononucleares y polimorfonucleares en presencia de ATP.

Material y Métodos

El estudio se realizó en colaboración con el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, por lo cual, se garantiza el acceso a las muestras de los sujetos sanos del banco de sangre. Todos los procedimientos fueron aprobados por la Comisión de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM y del Comité de Ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)

Toma de muestra

Se realizó la toma de muestra de sangre mediante punción venosa de sujetos sanos del banco de sangre del INER.

Purificación de leucocitos por gradientes de densidad

La sangre colectada de pacientes asmáticos y sujetos sanos fue colocada en tubos Falcon de 14 ml (Ref 352057, Corning NY Estados Unidos de América) que contenían Polymorphprep (Acurate, Oslo, Noruega) en una relación 1:1. Estos tubos fueron centrifugados a 1800 rpm durante 35 min a 20°C para separar la fracción blanca de las roja. Las células mononucleares y las polimorfonucleares encontradas en fracciones distintas fueron separadas de manera independiente. Cada una de las fracciones fue colocada en un tubo Falcon de 50 ml que contenía RPMI como medio de recepción. Las células fueron centrifugadas a 1800 rpm durante 10 min a 20°C para eliminar los restos celulares y de Polimorphprep. Para eliminar los eritrocitos contaminantes se incubaron las células en buffer de lisis (apéndice 2) durante 5 min a 4°C. Posteriormente fueron

centrifugadas a 1800 rpm durante 10 min a 20°C y el sobrenadante fue desechado. El botón celular fue resuspendido en solución de trabajo (apéndice 3) y centrifugado en una minicentrífuga durante 1 min, se realizaron dos lavados con solución de trabajo siguiendo el mismo método. El botón se resuspendió en solución de trabajo y se tomó una alícuota para contar al microscopio empleando una cámara de Neubauer. Las células mononucleares y polimorfonucleares fueron reservadas para su posterior uso.

Medición de la producción de fosfatos

La concentración de nucleótidos extracelulares fue medida mediante un método indirecto, la producción de fosfatos mediante la degradación del ATP por las ectonucleotidasas. Este método se realizó en cada uno de estos tipos celulares mediante la cuantificación de fosfato inorgánico (Pi) liberado. Para este fin, en tubos de borosilicato se colocaron 2×10^6 de células (mononucleares y o polimorfonucleares). La reacción fue iniciada por la adición de diversas concentraciones de ATP-Mg²⁺ (500 μM) y la actividad fue evaluada a diferentes tiempos de incubación (0, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 min) posterior a la adición de ATP-Mg²⁺. Para detener la reacción de cada tiempo, la muestra fue puesta en hielo durante 10 min, para inmediatamente después cuantificar la liberación del fosfato inorgánico usando un método colorimétrico a 660 nm, acoplado con una mezcla de molibdato de sodio-Elon [4-(metilamino)fenol hemisulfato], y usando H₃PO₄ como estándar. Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado y la actividad específica fue reportada como fosfato liberado (μM). Además se utilizó UTP como agonista de la señalización de P2Y, así como 30 μM de N-etilmaleimida como inhibidor de la señalización de P2Y y 30 μM SKF96365, un bloqueador de canales catiónicos inespecífico, como inhibidor de los canales de P2X. Para determinar el mecanismo de liberación de ATP se empleó 100 μM de carbenoxolona y 50 μM gadolinium, para la inhibición de panexinas y conexinas respectivamente.

Citometría de flujo

Para realizar la diferenciación de células circulantes del sistema inmune se empleó el sistema CD, usualmente empleado como marcadores celulares en la inmunofenotipificación. Para linfocitos T en general se emplearon marcadores de superficie CD3+, para las células T ayudadoras o Th el doble marcaje CD3+ CD4+, para los linfocitos T citotóxicos, el marcaje CD3+ CD8+; en el caso de monocitos no hay

macrófagos en sangre empleamos CD14+ y para células B, empleamos el marcador CD19+. En el caso de los neutrófilos, que representan el 90% de los polimorfonucleares empleamos el marcador CD66+.

Detección de receptores P2Y en células mononucleares.

5x10⁵ células mononucleares fueron incubadas con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD14 y anti-CD19 (Números de catálogo. 300430, 317408, 344722, 325620, and 302216, respectivamente, Biolegend, San Diego, CA, Estados Unidos) diluidos en PBS con 0.2% de albúmina sérica de bovino y 0.1% de azida de sodio durante 30 min a 4°C y lavadas en solución de PBS con BSA 0.2%. Posterior a ello se emplearon dos tipos de protocolos:

1) Para la detección de los receptores P2Y₁, P2Y₄ o P2Y₁₁ se incubaron las células fijadas con los anticuerpos en contra de estos receptores durante 1 h at 4°C en la oscuridad.

2) En el segundo caso, empleado para la detección de P2Y₂ y P2Y₆, las células fueron fijadas en paraformaldehído al 4% durante 10 minutos con buffer de permeabilización (Número de catálogo. 00-8333, eBioscience, San Diego, CA, Estados Unidos) y se incubaron las células con los anticuerpos en contra de estos receptores durante 1 h at 4°C en oscuridad.

Posterior a la incubación con el anticuerpo primario en contra de los receptores, las células fueron lavadas con PBS-BSA (en el caso de la detección de anti-P2Y₂ and P2Y₆) o buffer de permeabilización (anti-P2Y₂ and P2Y₆) y se procedió a la incubación con el anticuerpo IgG anticonejo hecho en burro acoplado a ficoeritrina (catalogue No. 12-4739, BD eBiosciences, San Diego, CA, Estados Unidos) durante 30 minutos a 4°C. Finalmente las células fueron lavadas dos veces y fijadas con paraformaldehído al 1% hasta que se realizó el análisis; para el cual cincuenta mil células fueron colectadas en un citómetro de flujo (cytometer FAScanto, Becton&Dickinson, Flankin Lakes, NJ, USA) y los datos obtenidos fueron analizados empleando Flow Jo software (version 887, TriStar, Ashlan, OR, Estados Unidos) para determinar la expresión de los receptores.

Anticuerpo	Número de catálogo y marca	Especie de origen
anti-P2Y ₁	APR-021, Alomone	Conejo
anti-P2Y ₂	APR-010, Alomone	Conejo
anti-P2Y ₄	Ab140857 Abcam	Conejo
anti-P2Y ₆	Ab101800, Abcam	Conejo

anti-P2Y ₁₁	APR-015, Alomone	Conejo
------------------------	------------------	--------

Detección de receptores P2Y en células polimorfonucleares.

5x10⁵ células polimorfonucleares fueron incubadas con anticuerpos anti-CD66+ (Número de catálogo. 305104, Biolegend, California Estados Unidos) lavadas con PBA 2% BSA y a continuación se incubaron los anticuerpos en contra de los receptores, como se describió anteriormente. El análisis de la citometría se realizó de la misma manera al de las células mononucleares.

Análisis estadístico

La concentración de fosfatos inorgánicos producidos fueron comparados entre los grupos en cada ocasión que se realizó los experimentos a través de una prueba de análisis de varianza seguido de una prueba de Dunnet. Una prueba de t de Student no pareada y una t pareada fue empleada en otros experimentos. Los datos fueron expresados en el texto y las ilustraciones como el promedio ± el error estándar, la significancia estadística está indicada en cada imagen.

Eliminación de residuos biológicos

Todo el material químico-biológico e infeccioso fue desechado de acuerdo a los lineamientos de la Facultad de Medicina y del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. En base a la Ley General de Salud, el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de la Investigación para la Salud, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos, el Reglamento de Seguridad y Coordinación en Materia de Investigación para la Salud en la UNAM, el Reglamento Interior de la Facultad de Medicina y las Normas Oficiales Mexicanas aplicables en materia de Bioseguridad.

Financiamiento

El proyecto cuenta con financiamiento por PAPIIT, UNAM (IN200613) y CONACYT (219859).

Resultados

En este reporte analizamos la liberación de ATP mediante la activación de los receptores purinérgicos en leucocitos obtenidos de muestras sanguíneas de sujetos sanos. Para cumplir los objetivos de este estudio empleamos células mononucleares y polimorfonucleares, las cuales fueron sometidas a la determinación de fosfatos mediante curvas enzimáticas y su comportamiento con la incubación con agonistas y antagonistas de receptores purinérgicos. Para determinar los receptores involucrados en la producción de fosfatos se realizó la detección de los receptores P2Y en células mononucleares y polimorfonucleares. Adicional a esto las células fueron incubadas con antagonistas de las vías de liberación de ATP vía difusiva.

Para determinar la liberación de ATP empleamos el método de verde de malaquita/molibdato de sodio en células mononucleares y polimorfonucleares en el que se determina la cantidad de fosfatos generados por el metabolismo del ATP a través de las ectonucleotidasas mediante un método colorimétrico. Cuando se le adicionaron a las células concentraciones crecientes de ATP (125, 250 y 500 μM) observamos que la producción de fosfatos se eleva de manera proporcional a la concentración de ATP incubado (**Figura 1 panel A**). Estos resultados demuestran la presencia de ectonucleotidasas en células mononucleares y polimorfonucleares, así como la capacidad de estas enzimas de metabolizar el ATP extracelular.

Debido a que se ha reportado que la activación de los receptores purinérgicos induce la liberación de ATP analizamos si esta molécula activa los receptores purinérgicos e induce la liberación de ATP u otros nucleótidos. Para determinar este efecto se analizó la actividad de los receptores P2X y P2Y en estas células mononucleares y polimorfonucleares sobre la formación de fosfatos extracelulares. Para esto se emplearon moléculas que inhiben la función de los receptores P2X y P2Y, -SKF- bloqueador no selectivo de canales catiónicos- que inhibe la acción de estos y N-etilmaleimida que desacopla la señalización de P2Y. Al adicionar estas moléculas se observó que la producción de fosfatos en cotratamiento con ATP se ve disminuida con la presencia de N-etilmaleimida, sin embargo, esto no se observa en el caso de SKF (**Figura 1 panel B**). Esto indica que los receptores P2Y están involucrados en el proceso de liberación de ATP al medio extracelular en presencia de ATP exógeno.

Debido a que los primeros experimentos se realizaron mezclas de células mononucleares y polimorfonucleares se emplearon estos bloqueadores realizando la separación en

mononucleares y polimorfonucleares. En este caso las cinéticas enzimáticas de producción de fosfatos describen que el comportamiento del bloqueo de los receptores P2X no modifica la producción de fosfatos extracelulares, mientras que la inhibición de la señalización de P2Y lo modifica, disminuyéndola de manera **significativa (Figura 1 panel C y D)**. Estos resultados que la activación de los receptores P2Y es responsables de la elevación de ATP en el medio, independientemente del subtipo celular estudiado.

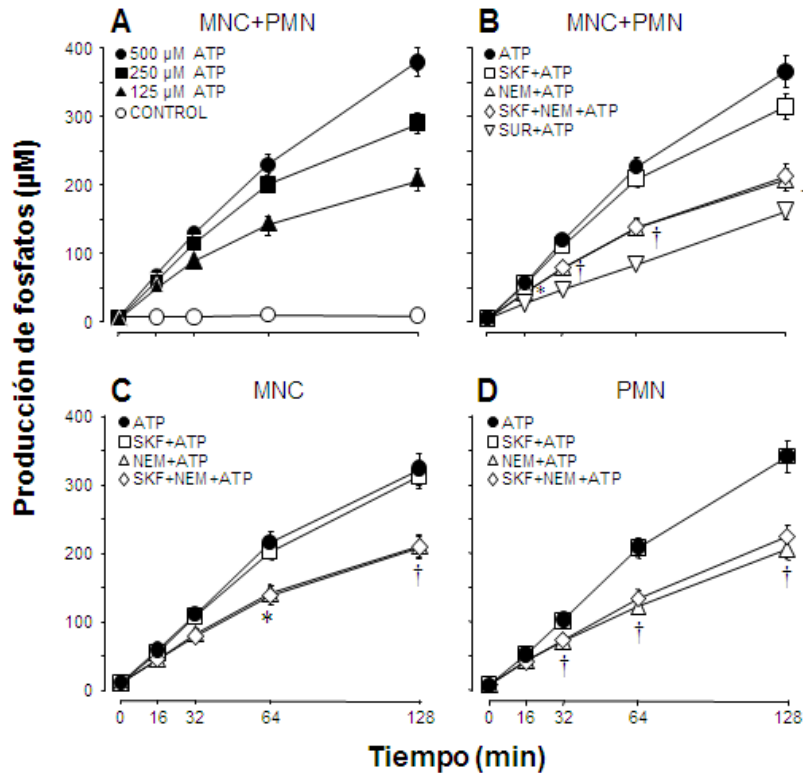


Figura 1.- Actividad de las ectonucleotidasas en leucocitos medida por la capacidad de producir fosfato inorgánico a partir de ATP exógeno. En panel A se muestra la formación de fosfato en células mononucleares (MNC) y polimorfonucleares (PMN) dependiente de tiempo y de la concentración de ATP; el grupo control (círculos abiertos n=5) corresponde a células a las cuales no se les administró ATP. Los paneles B, C y D muestran que el bloqueo de los receptores P2X por SKF9665 (SKF) no modifica la producción de fosfatos inorgánicos posterior al tratamiento con ATP 500 µM; adicional a esto, se observa el desacoplamiento de la señalización de los receptores P2Y empleando N-etilmaleimida (NEM) reduce de manera significativa la producción de fosfatos, mientras que el antagonismo de la mayor parte de los receptores P2Y con 100mM de suramina (SUR) también disminuye de manera significativa la producción de fosfatos tanto en mezclas de PMN y MNC, así como en cada uno de los tipos de manera independiente (panel b). Los datos observados corresponden promedio± Error estándar de 12-12 (panel A) o 7-0 experimentos (panel B, C y D). † p<0.01, * p<0.05.

Para determinar la posibilidad que el ATP estuviera induciendo la liberación de más ATP, utilizamos un análogo de ATP no hidrolizable, el ATPyS. Encontramos que 125 µM de ATP era capaz de inducir la producción de fosfatos de las células mononucleares y

polimorfonucleares y este efecto fue reducido notablemente por la preincubación con N-etilmaleimida, desacoplador de la señalización de los receptores P2Y (**Figura 2**). Por lo tanto, los fosfatos del medio extracelular provienen del metabolismo del ATP endógeno liberado a través de la activación de los receptores P2Y por el ATP γ S.

Para poder analizar cuáles son los receptores purinérgicos P2Y involucrados en la liberación de ATP u otro nucleótidos al medio extracelular realizamos un abordaje farmacológico. Empleamos el análogo no hidrolizable ATP γ S que induce solamente la activación de los receptores P2Y₁, P2Y₂ y P2Y₁₁; en este caso observamos que se presenta una elevación de las concentraciones de fosfatos extracelulares, que sustenta la idea de que estos receptores puedan estar involucrados en la liberación de ATP, en conjunto con P2Y₄ y P2Y₆, observados con UTP (**Figura 2**).

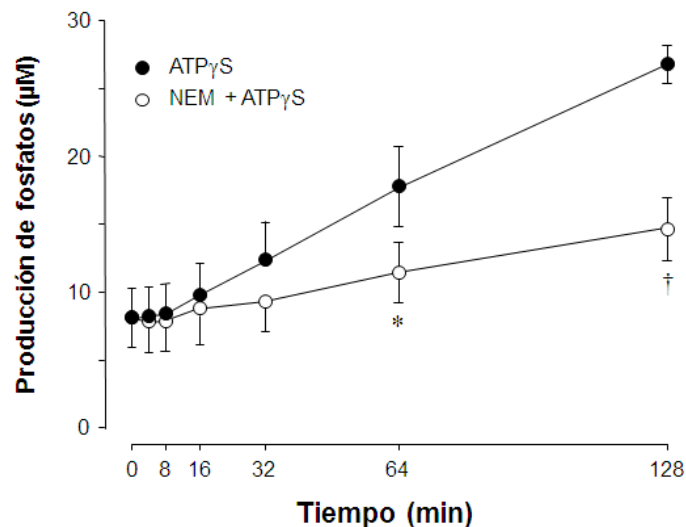


Figura 2.- Producción de fosfato inorgánico en células mononucleares y polimorfonucleares con ATP γ S y N-etilmaleimida (NEM) de la señalización de P2Y. El tratamiento con ATP γ S (125 μ M), agonista de los receptores P2Y, induce un aumento en la producción de fosfatos de manera temporal. La producción de fosfatos se disminuye notablemente después del tratamiento con N-etilmaleimida (NEM, 30 μ M), desacoplante de la señalización de los receptores P2Y. Debido a que el ATP γ S es un nucleótido no hidrolizable, el origen de los fosfatos producidos debe ser del ATP endógeno (u otros nucleótidos) liberados posterior a la activación del receptor P2Y₁₁. Los valores representan el promedio de las mediciones \pm error estándar (n = 4 experimentos por grupo) *p<0.05 and †p<0.01..

Con el fin de aportar más evidencias de que la activación de los receptores purinérgicos P2Y sobre la liberación de ATP se empleó UTP, un agonista no selectivo que activa los receptores P2Y₂, P2Y₄ y parcialmente a los receptores P2Y₆. En estos experimentos se observó que la exposición a UTP eleva las concentraciones de fosfatos producidos (**Figura 3 panel A**) y que estos disminuyen empleando el desacoplador de la señalización de P2Y

(Figura 3 panel B). Estos resultados refuerzan las evidencias y refuerza que los receptores purinérgicos P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₆ inducen la liberación de ATP u otros nucleótidos de las células PMN y MNC.

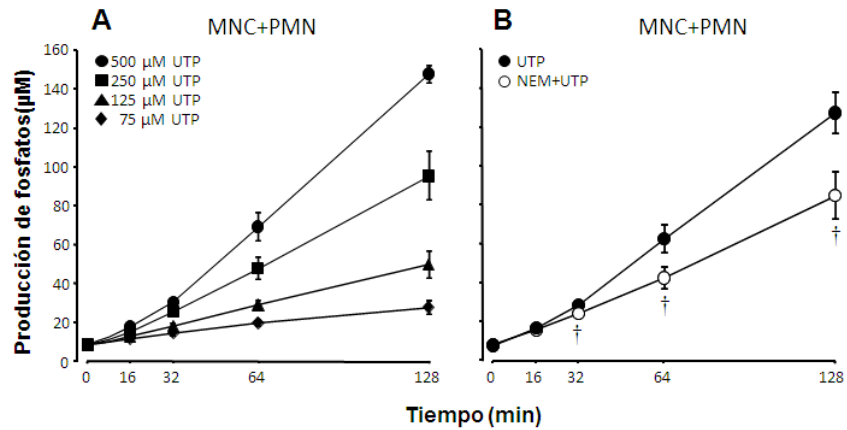


Figura 3.- Producción de fosfato inorgánico en presencia de UTP en mezclas de células mononucleares (MNC) y polimorfonucleares (PMN). El UTP es metabolizado por las ectonucleotidasas membranales. El panel A muestra la producción de fosfato inorgánico de manera temporal y dependiente de las concentraciones de UTP. El panel B muestra que el desacoplamiento de la señalización de los receptores P2Y por N-etilmaleimida 30 (NEM) reduce la producción de fosfatos de manera significativa. Los valores representan el promedio de las mediciones \pm error estándar (n = 5-6 experimentos por grupo). †p<0.01.

Para determinar cuáles son los receptores P2Y que pueden estar involucrados en la elevación de los fosfatos extracelulares empleamos la citometría de flujo delimitando la expresión de estos receptores en el subtipo celular tanto de células mononucleares como polimorfonucleares. Para poder analizar el porcentaje primero separamos las células por tamaño y granularidad en dos grupos, las células mononucleares y polimorfonucleares. Al realizar el “gating” de cada una de estas poblaciones por inmunofenotipificación analizamos mediante histogramas el máximo porcentaje de células positivas, que nos permite realizar comparaciones entre muestras con diferente cantidad de células (Figuras 4 y 5, tabla 1

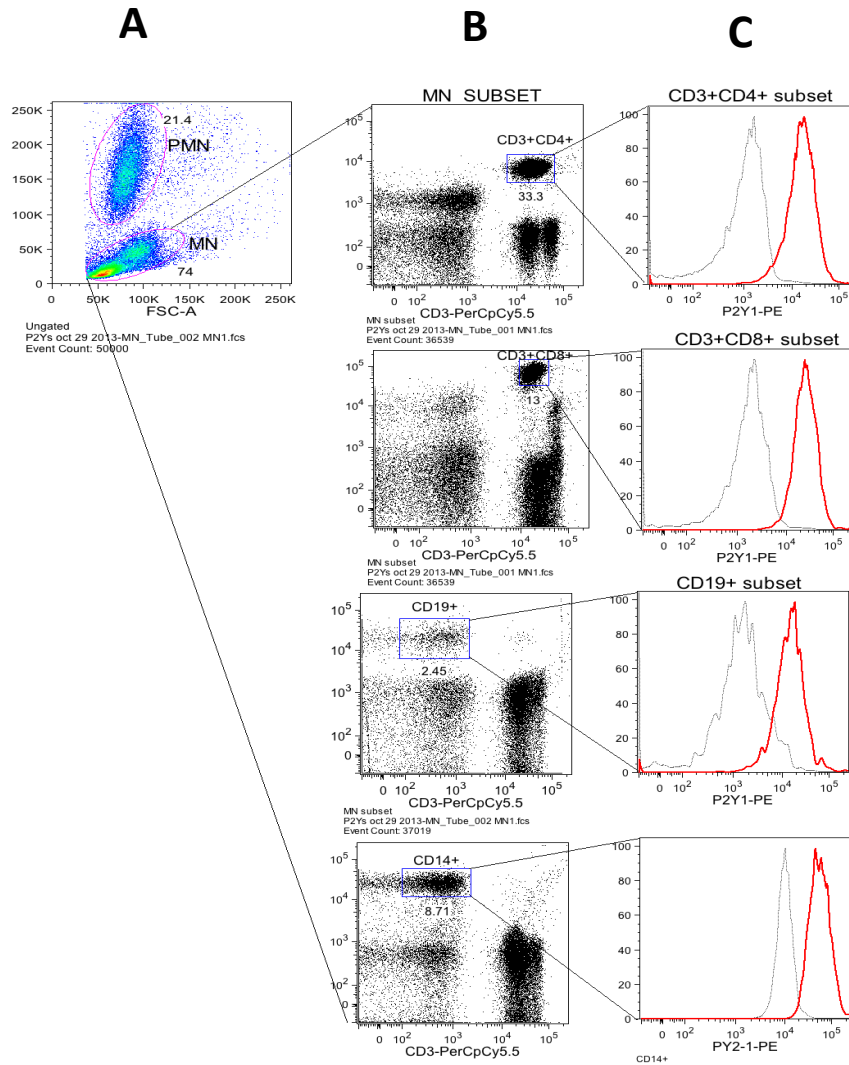
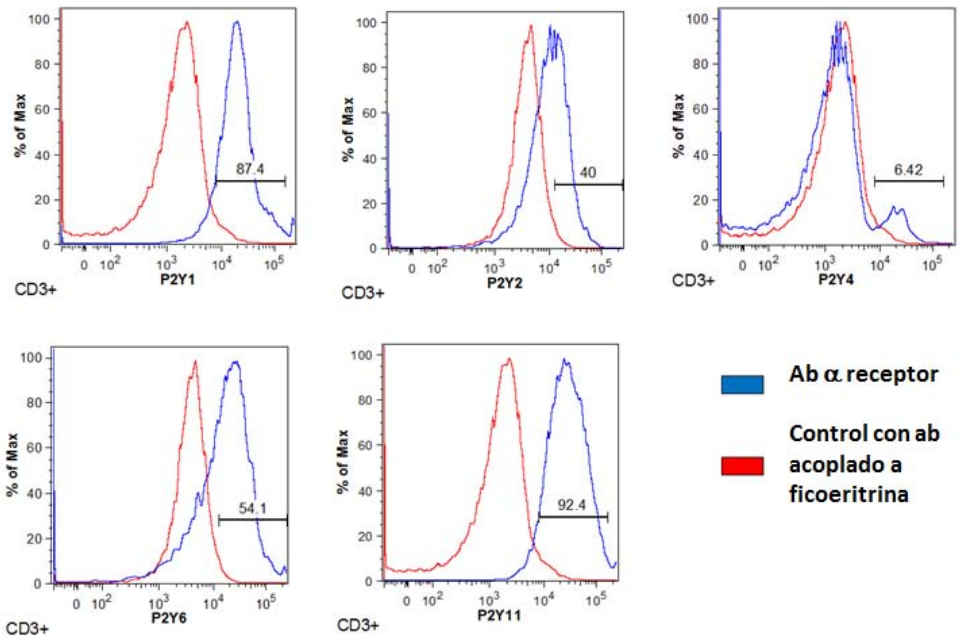
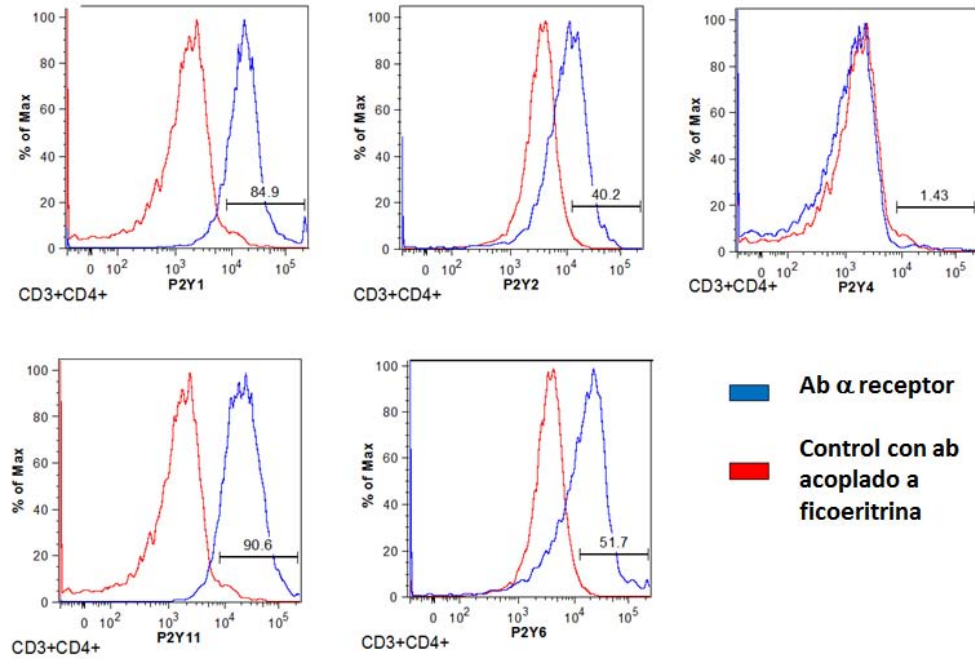


Figura 4.-: Imagen representativa del análisis de la expresión de los receptores P2Y por citometría de flujo. En la columna “A” podemos observar la separación de los leucocitos por tamaño y granularidad en dos poblaciones: polimorfonucleares (PMN) y mononucleares (MN). En la columna “B” podemos observar una imagen representativa del “gating” en células mononucleares donde se han separado de acuerdo a la inmunofenotipificación; para linfocitos T en general se emplearon marcadores de superficie CD3+, para las células T ayudadoras o Th el doble marcaje CD3+ CD4+, para los linfocitos T citotóxicos, el marcaje CD3+ CD8+; en el caso de monocitos empleamos CD14+ y para células B, empleamos el marcador CD19+. En la columna “C” podemos observar como ejemplo la detección de los receptores P2Y₁ en los distintos subtipos celulares empleando histogramas. La línea de color gris representa la población de células que fueron incubadas sólo con el anticuerpo acoplado a ficoeritrina; mientras que las de color rojo representan la población que fueron incubadas con ambos anticuerpos.

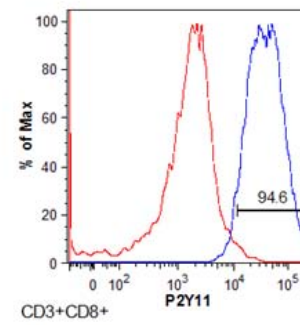
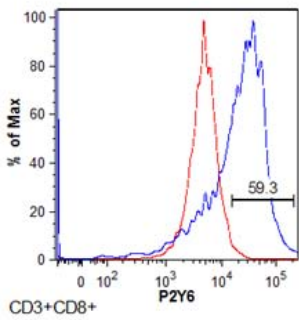
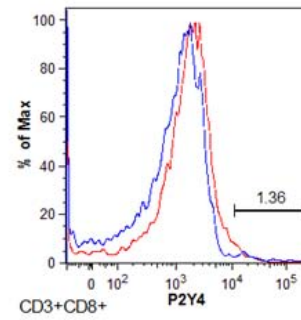
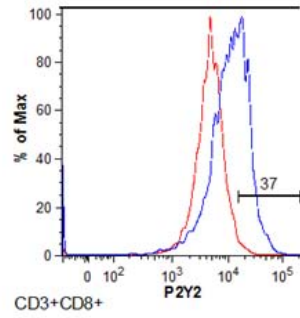
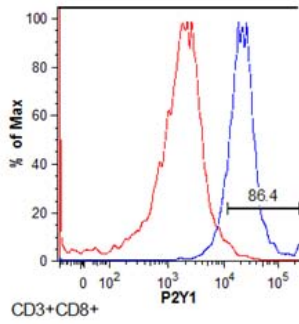
Células CD3+



Células CD3+ CD4+

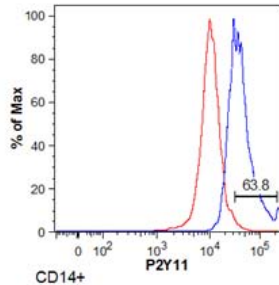
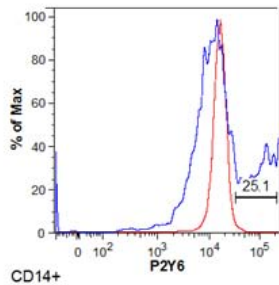
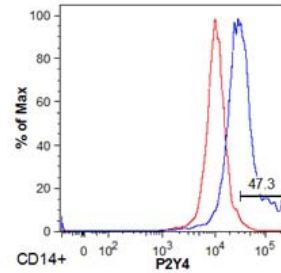
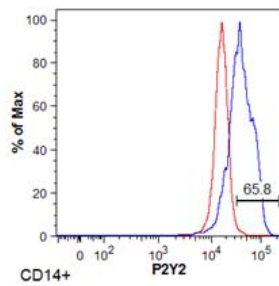
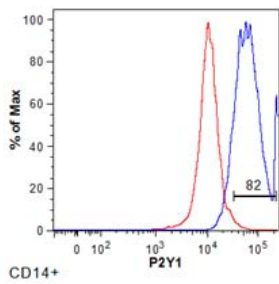


Células CD3+ CD8+



■ Ab α receptor
 ■ Control con ab acoplado a ficoeritrina

Células CD14+



■ Ab α receptor
 ■ Control con ab acoplado a ficoeritrina

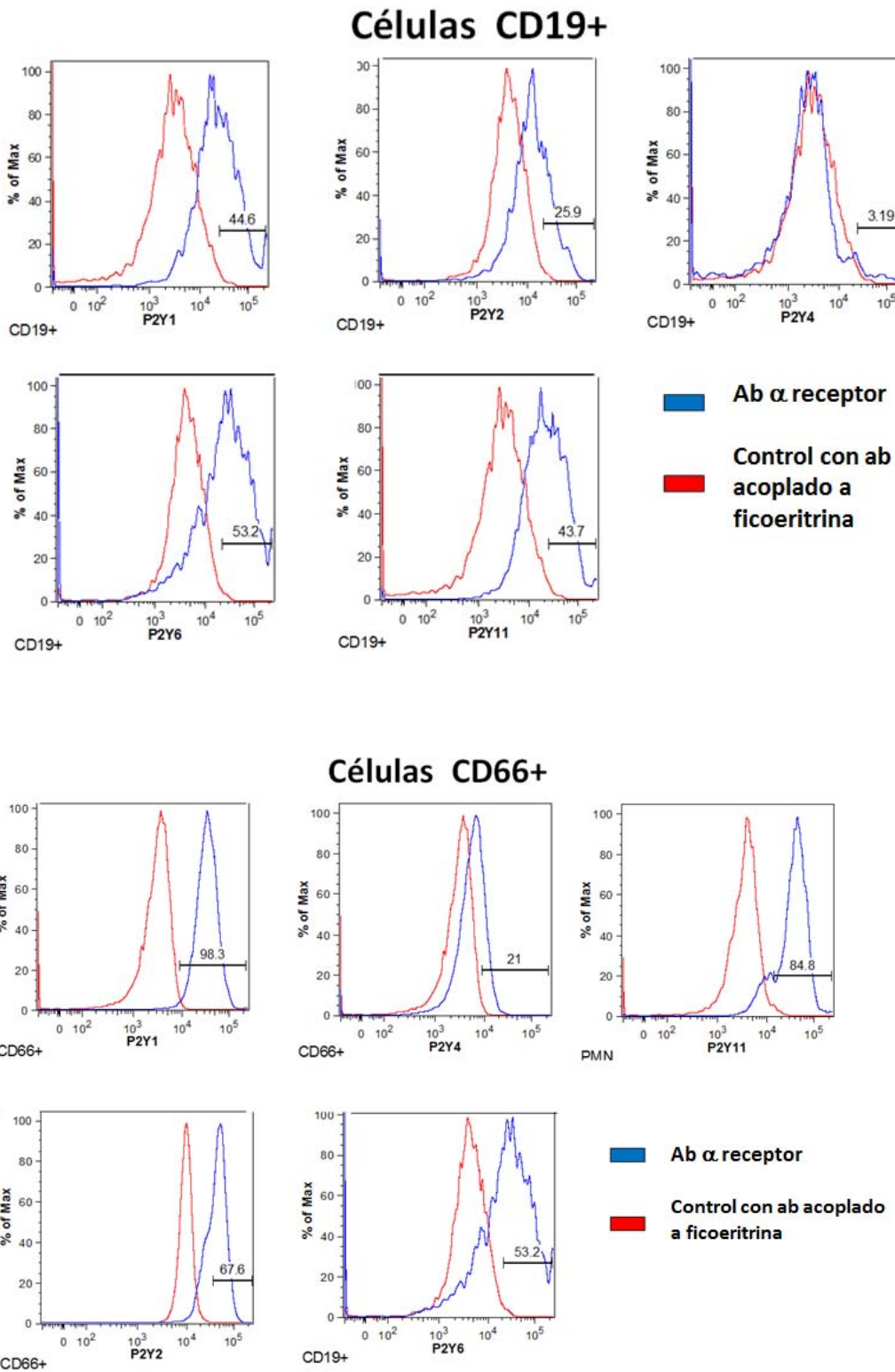


Figura 5- Ejemplo del análisis citométrico de la expresión de los receptores P2Y en los leucocitos. Se presentan los histogramas representativos para la detección de los receptores P2Y1, 2, 4, 6 y 11 en linfocitos T (CD3+), linfocitos Th (CD3+, CD4+), linfocitos T citotóxicos (CD3+, CD8+), linfocitos B (CD19+), monocitos (CD14+) y neutrófilos (CD66+). El eje

de las X representa la fluorescencia asociada a la detección de los receptores P2Y, mientras que el eje de las Y representa el porcentaje máximo de conteo de células. El histograma de línea continua roja representa a las células que carecen del anticuerpo primario, mientras que el de línea azul representa las células positivas a cada uno de los receptores. La barra lateral representa el porcentaje de células que se encuentran por fuera del 1% de la cola derecha del control.

Muestra		CD3+ % células positivas	CD3+CD4+ % células positivas	CD3+CD8+ % células positivas	CD14+ % células positivas	CD19+ % células positivas	CD66+ % células positivas
P2Y1	1	88	88.4	93.7	82	47.6	98.7
	2	87.4	85	86.4	86.7	44.6	98.3
	3	91.6	93.3	96	91.8	78.7	97.3
	4	83.6	91.3	82.1	80.1	48.7	99.8
	5	68.5	no	no	59.9	no	95.7
	6	67	no	no	41.4	no	85.7
P2Y2	1	35.6	42.7	22.3	65.8	37.9	67
	2	40	40.2	37	50	25.9	67.6
	3	83.4	87.3	85.6	78.5	83	88.6
	4	72.7	78.9	66.1	88.2	64.3	89.3
	5	81.6	no	no	93.6	no	97.7
P2Y4	1	4.51	6.97	2.51	47.3	4.9	60.2
	2	6.42	1.43	1.36	12.5	3.19	21
	3	1.62	2.63	1.4	7.16	1.87	40.7
	4	1.9	2.41	1.95	12.4	3.23	82.2
	5	7.55	15.4	0.74	7.31	0.78	84.6
	6	15.3	28	1.79	10.4	1.45	84.6
P2Y6	1	51.5	50.9	53.5	25.1	53	40.7
	2	54.1	51.7	59.3	48.5	53.2	80
	3	65.7	65.2	71.6	47.5	66.6	82
	4	41.9	40.3	43.6	35	48.1	80.6
	5	41.7	45.6	61.4	75	55.3	99
	6	50.3	51.5	66.8	57.8	50.1	99
P2Y11	1	99.8	98.5	99.8	63.8	89.8	97.2
	2	84.8	90.6	84.9	56.8	56.6	84.8
	3	96.3	99.8	95.8	80	64.6	96.8
	4	92.4	85	94.6	55.3	43.7	84.1

Tabla 1.- Datos obtenidos por citometría de flujo que representan el porcentaje de células positivas para cada uno de los receptores P2Y en los diferentes tipos de leucocitos sanguíneos.

En este caso observamos que los receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₁₁ se expresan de manera ubicua en todos los subtipos celulares analizados, mientras que en el caso de los neutrófilos se observa una expresión elevada de P2Y₄ en comparación a los linfocitos T, B y monocitos. Estos resultados nos indican que los receptores involucrados en la señalización purinérgica se expresan en las células mononucleares de manera ubicua, con excepción de P2Y₄, mientras que en el caso de las polimorfonucleares hay que considerar que se expresa también el P2Y₄ (**Figura 6**).

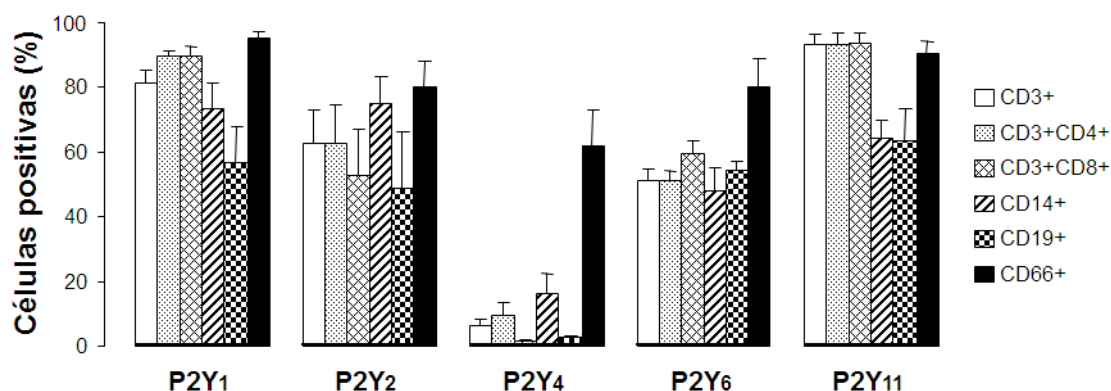


Figura 6.- Porcentaje de células positivas al inmunomarcaje para los receptores P2Y por citometría de flujo. Casi todos los receptores P2Y, especialmente P2Y₁ y P2Y₁₁ fueron identificados en la mayoría (>50% de las células) de los linfocitos T auxiliares (CD3+, CD4+), T citotóxicas (CD3+, CD8+), monocitos (CD14+), linfocitos B (CD19+), neutrófilos (CD66+), con excepción del receptor P2Y₄ que fue mayormente expresado en los neutrófilos. Las barras representan el promedio de las mediciones \pm error estándar (n=4 a 6 experimentos).

Para comprobar si la elevación de las concentraciones de fosfatos tiene como mecanismo la liberación de ATP u otros nucleótidos, empleamos moléculas con capacidad de inhibir la acción de canales de panexinas y hemicanales de conexinas, involucradas en la liberación de ATP en células del sistema inmune. En este caso observamos que la inhibición de los canales de panexinas, empleando carbenoxolona, no modifica la producción de fosfatos extracelulares en presencia del tratamiento con ATP; en el caso de gadolinium, que inhibe la actividad de los hemicanales de conexina, observamos una disminución estadísticamente significativa (**Figura 7**). Estos resultados sugieren que la elevación de la concentración extracelular de fosfatos, en parte, se encuentra mediada por la liberación de ATP u otros nucleótidos mediante hemicanales de conexinas.

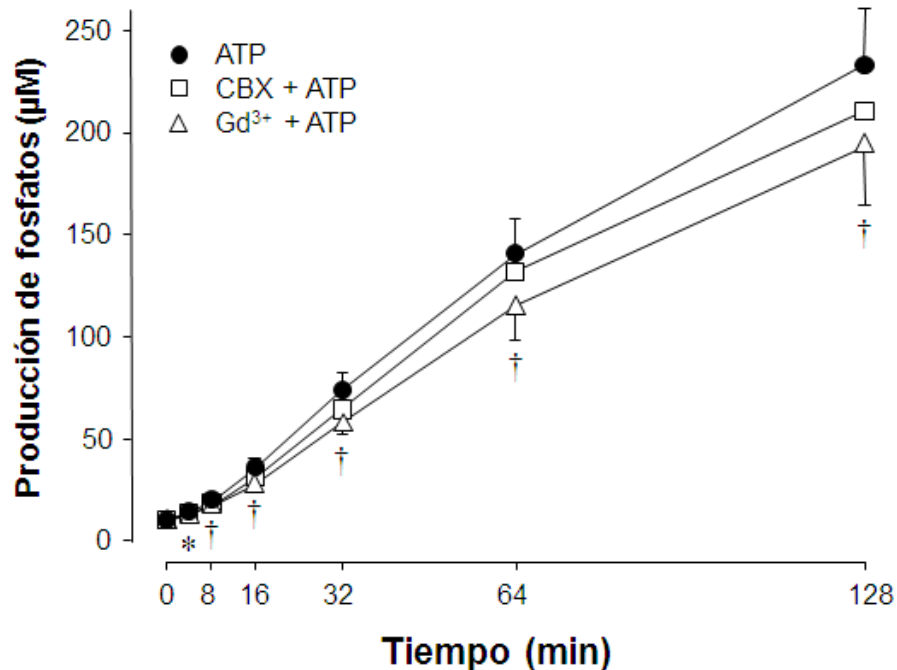


Figura 7.- Producción de fosfatos al tratamiento con 500µM de ATP e inhibidores de los hemicanales de conexinas y panexinas en una mezcla de células mononucleares y polimorfonucleares. El pretratamiento con el inhibidor de los hemicanales de conexinas gadolinium (Gd^{3+} , 50 µM) reduce la producción de fosfatos derivados del tratamiento con ATP. La preincubación con el inhibidor no específico de panexinas, carbenoxolona (CBX, 100 µM) no modifica la producción de fosfatos.. Los valores representan el promedio \pm Error estándar. † $p < 0.01$, * $p < 0.05$ comparados con el grupo control (n=7). Significancia obtenida empleando una ANOVA de mediciones repetidas seguida de una prueba de Dunnett para cada uno de los tiempos muestreados

A pesar de que a concentraciones de 500 µM no se observó cambio en la liberación de ATP a través de los receptores P2X, se examinó si estos presentaban apertura del poro a diferentes concentraciones de ATP mediante la medición de la actividad electrofisiológica de monocitos en cultivo. En este caso observamos en los registros dos tipos de cinética de activación e inactivación, uno rápido (**Figura 7 Patrón A**) y un segundo que no se inactiva hasta que se elimina el ATP del medio de contacto (**Figura 7 Patrón B**). Estos datos se agruparon por porcentaje de células que presentaban el patrón como se observa en la gráfica de la figura 6, donde se observa que a diferentes concentraciones de ATP se presenta un mayor porcentaje de uno u otro comportamiento. A las concentraciones establecidas para el abordaje experimental -500 µM- se observa una cinética de inactivación rápida, mientras que a 5 mM, la concentración más elevada empleada, no se observa inactivación, independientemente del tiempo, hasta que se elimina el ATP del medio. Estos resultados muestran que a la concentración de 500 µM de ATP el receptor P2X₁ sí presenta activación, aunque este no participe en la liberación de ATP.

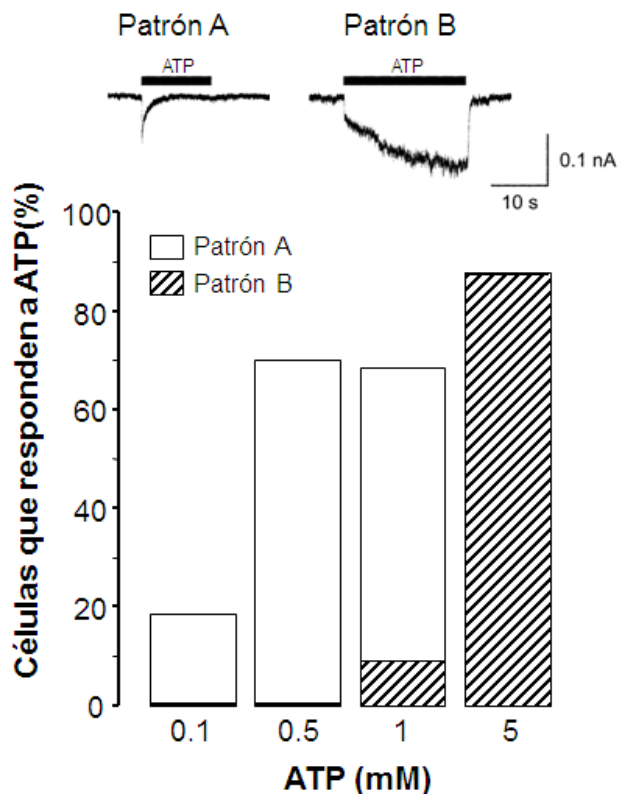


Figura 8.- Respuesta electrofisiológica al estímulo por ATP en monocitos humanos. Ejemplo de los registros típicos obtenidos de patch clamp mostrando dos patrones de corrientes entrantes secundarias a la activación de los receptores P2X. En el patrón A, el tratamiento con ATP produce una corriente entrante que rápidamente se inactiva, lo que sugiere una activación del receptor P2X₁. En el patrón B, el ATP induce una corriente entrante que aumenta con el tiempo, sugerente de la activación del receptor P2X₇. Las barras representan el porcentaje de monocitos tratados que responden a uno u otro patrón correspondiente a cada una de las concentraciones de ATP de 0.1, 0.5, 1 y 5 mM. El número de registros fue de 11, 10, 22, and 8 y se registraron un total de 26 monocitos.

Tomando en consideración los resultados anteriores decidimos corroborar la activación de los receptores P2X en las concentraciones 500 μ M empleando el inhibidor no selectivo SKF. En estos resultados observamos que los monocitos presentan una corriente entrante transitoria con el patrón de inactivación rápido previamente descrito, sin embargo, en la preincubación con el inhibidor SKF y su eliminación del medio observamos que las corrientes se seguían presentando (**Figura 8 panel A**). Por otra parte en la coincubación del inhibidor con ATP se abolían completamente (**Figura 8 panel B**). Estos resultados en concordancia con lo previamente presentado sugieren que los receptores P2X, sobre todo P2X₁, se encuentran activos en presencia de las concentraciones de ATP empleadas, sin embargo, no participan en la liberación de ATP u otros nucleótidos en células mononucleares y polimorfonucleares.

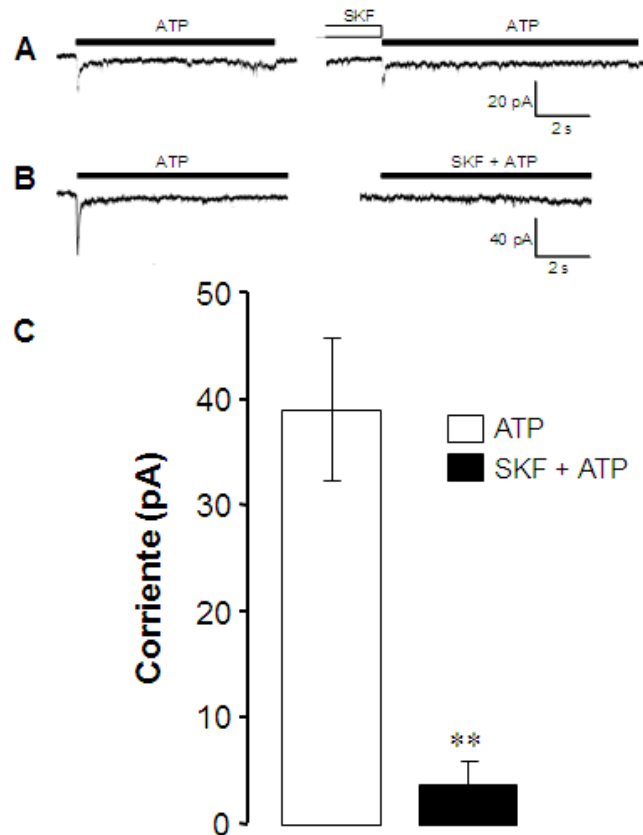


Figura 8.- Inhibición de la corriente transitoria inducida por ATP empleando SKF 96365 (SKF) en monocitos humanos.

En la Figura B se observa un registro típico observado en el tratamiento con 500 μ M de ATP, en este se produce una corriente transitoria sugestiva de la activación de P2X₁, este fenómeno es inhibida por el cotratamiento con SKF –un bloqueador catiónico no específico- ejemplificado en el panel C que donde se observa una diferencia altamente significativa (*p<0.001, n = 6–7). El efecto de SKF no fue observado cuando primero fue la preincubado y lavado, con la administración de ATP, como se observa en el panel A.

Debido a que la estrategia experimental –medición de metabolitos del ATP- incluye un metabolito secundario, la adenosina y con el fin de aportar más evidencias de que la activación de los receptores purinérgicos P2 es la responsable de la elevación de la concentración de ATP u otros nucleótidos extracelulares, se analizó la participación de los receptores de adenosina. Para esto se emplearon como antagonistas de los receptores a adenosina las moléculas 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX) que es antagonista de los receptores A₁, MRS 1191 antagonista de los receptores A₃, SCH-58261 (SCH), conocido antagonista de los receptores A_{2A} y el antagonista de los receptores A_{2B}, MRS 1754. En este caso observamos que la mezcla de células mononucleares y polimorfonucleares responde a ATP con la elevación de la concentración de fosfatos y su acumulación con el tiempo, sin embargo la inhibición de la señalización a través de los receptores P1 independientemente del subtipo no presentó una modificación de la

cinética lo que muestra que los receptores P1 no están involucrados en la liberación de ATP u otros nucleótidos (**Figura 9**).

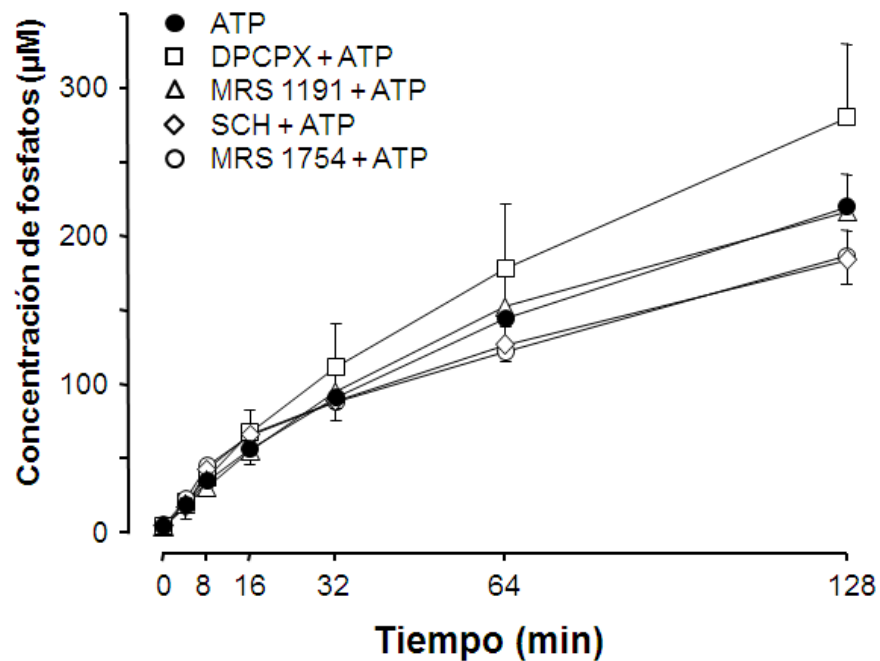


Figura 9.- Producción de fosfatos en presencia de antagonistas de los receptores de adenosina en cotratamiento con ATP en una mezcla de células polimorfonucleares y mononucleares. Para determinar la producción de fosfatos se empleó como tratamiento con 500 μM ATP como control (círculos cerrados, $n = 8$). La preincubación con 100 nM 8-ciclopentil-1,3-dipropylxantina (DPCPX, antagonista de los receptores A1, $n = 7$), 100 nM SCH-58261 (SCH, antagonista de los receptores A2A, $n = 3$), o 10 μM MRS 1754 (antagonista de los receptores A2B, $n = 4$) no modifican la formación de fosfato inorgánico. Los valores representan el promedio de las mediciones \pm Error estándar. La significancia fue determinada mediante una prueba de ANOVA entre grupos, en el caso de los diferentes tiempos se empleó una prueba t de Student.

Debido a que P2Y₁ es uno de los receptores más expresados en las células mononucleares y polimorfonucleares (**Figura 6**) se analizó la participación de este receptor en la liberación de ATP u otros nucleótidos empleando el antagonista MRS2500 (**Figura 10**). En este experimento se observó que no hay modificación de los niveles de fosfatos a las diferentes concentraciones del antagonista (10, 32 y 100nM) en comparación al control solo con ATP 500 μM . Por lo tanto, el receptor P2Y₁ no se encuentra participando en la liberación de ATP en células PMN y MNC tratadas con ATP.

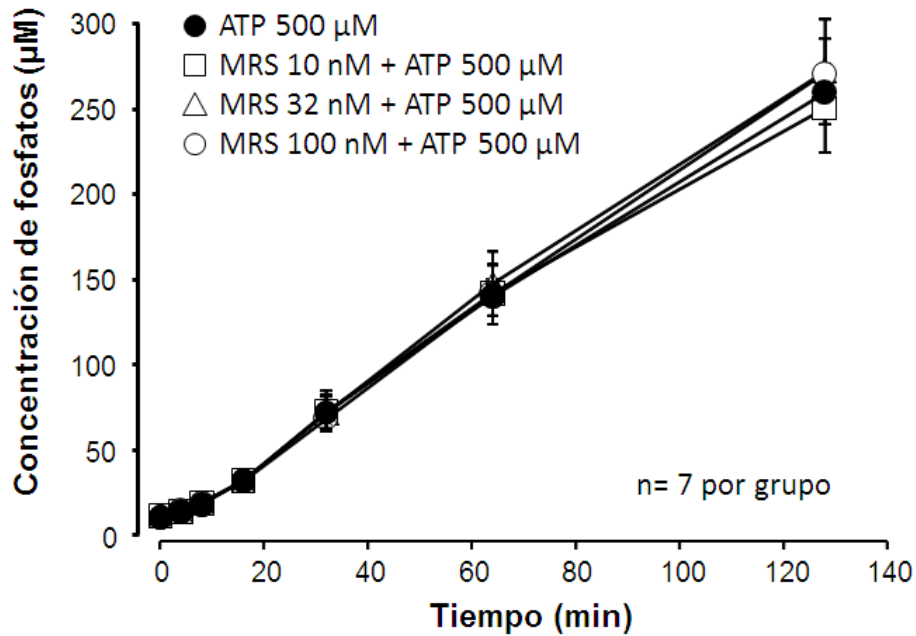


Figura 10.- Producción de fosfatos en presencia de antagonistas de los receptores de P2Y₁ en cotratamiento con ATP en una mezcla de células polimorfonucleares y mononucleares. El cotratamiento de ATP con MRS2500, un antagonista selectivo de P2Y₁, a diferentes dosis (10, 32, 100nM) no modifican la producción de fosfatos, por lo que la falta del efecto por MRS 2500 corrobora que estos receptores no están involucrados en el fenómeno.

Para poder analizar la liberación de ATP u otros nucleótidos empleamos una aproximación indirecta –medición de fosfatos- debido a la vida media corta de los nucleótidos en el medio extracelular y a la presencia de ectonucleotidasas que podrían estar degradándolos. Para poder determinar el mecanismo involucrado en la producción de fosfatos se empleó un inhibidor no selectivo de las ectonucleotidasas –ARL-67156- que inhibe a ENTPDasa 1, ENTPDasa 3, y ENPP1. Los resultados presentados sugieren que hay una disminución de las concentraciones de fosfatos en el medio extracelular a la concentración de 320 µM (**Figura 11**). Esto sugiere que no solo ENTPDasa 1, ENTPDasa 3, y ENPP1 están degradando el ATP, sino que es probable que otras ectonucleotidasas estén metabolizando el ATP de manera activa.

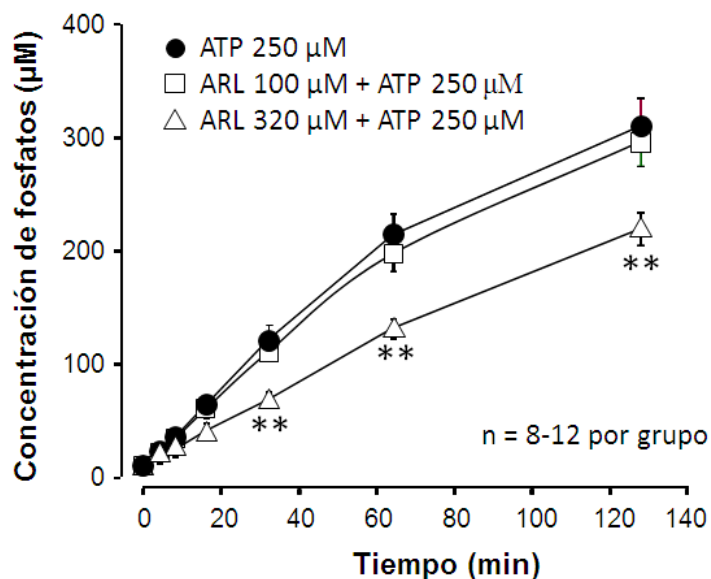


Figura 11.- Producción de fosfatos en presencia de ARL67156, inhibidor de las ectonucleotidasas, en una mezcla de células mononucleares (MNC) y polimorfonucleares (PMN). El tratamiento con ATP (250 µM) induce la producción de fosfato inorgánico tiempo dependiente, indicando la hidrólisis del ATP por las ectonucleotidasas de membrana. El cotratamiento con ARL-67156 (ARL) causan solo una reducción parcial (alrededor del 30% con la concentración de ARL de 320 µM. **p<0.01.

Debido a que se ha reportado que el ATP puede inducir la muerte celular en células mononucleares y polimorfonucleares, y considerando la consecuente elevación de los niveles de ATP extracelular analizamos la viabilidad celular en las condiciones experimentales empleadas. Para determinar si la concentración de ATP empleada es tóxica para las células mononucleares y polimorfonucleares se determinó la viabilidad celular empleando azul de tripano en una cinética de mortalidad (**Figura 12**). En esta observamos que la viabilidad celular se mantiene de manera constante a los 64 y a los 128 minutos, en el grupo control, hecho que mantiene también el grupo tratado con ATP independientemente del segmento temporal analizado. Estos resultados sugieren que los niveles de ATP empleados no inducen la muerte celular en estas células, por lo que las concentraciones de ATP liberadas en el medio extracelular podrían ser debidas a la liberación por mecanismos fisiológicos como exocitosis así como empleando canales de conexinas o panexinas más que a la muerte celular

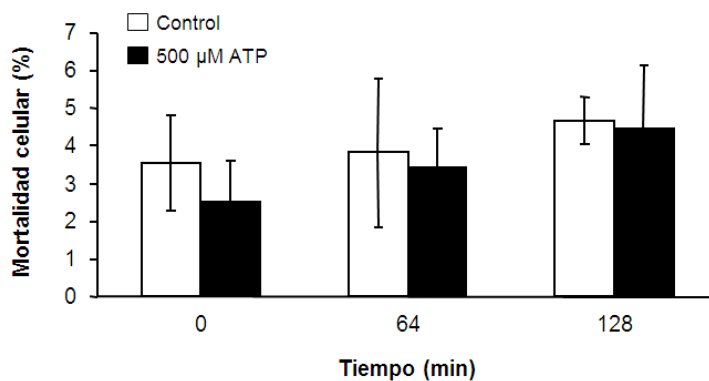


Figura 12.-Mortalidad celular en presencia de ATP. La adición de 500 μ M de ATP no causa un aumento considerable de la muerte celular, expresado por la tinción con azul tripano, comparado con los controles sin presencia de ATP (n=4 por grupo). El análisis estadístico se realizó mediante una t de Student. Las gráficas representan el promedio de las mediciones \pm error estándar.

Discusión

La señalización purinérgica, mediada por ATP, es clave en los procesos inflamatorios, la tolerancia inmunológica y la diferenciación de las células T. A pesar del papel central que tiene esta molécula dentro de la homeostasis del sistema inmune, hace falta información acerca de los mecanismos que inducen la liberación de ATP desde las células inmunitarias. Este trabajo presenta evidencias de que el ATP induce la activación de receptores purinérgicos P2Y y la posterior liberación de ATP u otros nucleótidos mediante hemicanales de conexinas.

En la literatura se ha descrito que la elevación de los niveles de ATP extracelular puede ser mediada por lisis celular, exocitosis o mediante transporte difusivo mediado principalmente por conexinas y panexinas [150, 158]; proteínas que forman hemicanales y canales, respectivamente, permeables a una gran cantidad de solutos, incluido el ATP intracelular. En el caso del proceso de exocitosis se ha descrito en las neuronas y células gliales, donde se ha reportado que el ATP se encuentra en vesículas sinápticas y actúa como neurotransmisor. En el caso del sistema inmune se ha reportado la liberación mediante transporte difusivo empleando conexinas y panexinas en neutrófilos y linfocitos T respectivamente [150, 158], sin embargo, los neutrófilos y los linfocitos T solo representan una parte del abanico de células del sistema inmune que incluyen a los linfocito T diferenciados, linfocitos B, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, y basófilos, entre otros [38]. Este trabajo aporta que la liberación de ATP u otros

nucleótidos, se realiza mediante la activación de receptores P2Y, tanto células polimorfonucleares como mononucleares; sin embargo hace falta disecar si este proceso ocurre empleando los mismos mecanismos en cada uno de los subtipos celulares.

Se ha reportado que en condiciones experimentales los neutrófilos liberan ATP mediante hemicanales de conexinas [150], sin embargo, la característica funcional de las células polimorfonucleares es la degranulación, un proceso de exocitosis. Además se ha reconocido que el ATP puede ser transportado al interior de las vesículas por intercambiadores como VNUT [24] (Transportador vesicular de nucleótidos, por sus siglas en inglés), descrito en células del sistema inmune como los macrófagos [137]. Tomando en cuenta estos datos, no podemos descartar que la liberación de ATP en células polimorfonucleares pueda ser mediada solamente por transporte difusivo a través de conexinas, sino que puede llevarse a cabo por exocitosis en ciertos contextos, por ejemplo, procesos infecciosos. Además, la activación de los receptores P2Y (1, 2, 4, 6 y 11) elevan las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} por lo que pueden favorecer la exocitosis de ATP u otros nucleótidos.

La liberación de ATP u otros nucleótidos mediante hemicanales de conexinas y canales de panexinas ha sido descrita en varios subtipos celulares incluyendo las células del sistema inmune como neutrófilos y linfocitos T [150, 158]. Estos hemicanales en condiciones fisiológicas se encuentran cerrados, y pueden presentar apertura por incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, despolarizaciones membranales fuertes y estimulación mecánica. En el caso de los neutrófilos se ha descrito que la elevación del Ca^{2+} intracelular permite la apertura de los hemicanales de conexinas descrito en la activación del receptor a FMLP, un receptor metabotrópico donde el proceso de activación activa a proteínas Gq, que induce la liberación de Ca^{2+} y por lo tanto, la apertura de los canales de conexinas [150] Este mecanismo general de activación puede estar asociado a la señalización purinérgica, debido a que los receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁, presentes en las células mononucleares y polimorfonucleares tienen como elemento río abajo en la cascada de señalización la activación de Gq y la liberación de calcio intracelular [77], esto puede explicar, en parte, la liberación mediada por conexinas en los resultados presentados.

En la literatura se ha descrito que a pesar de ser reconocido como un agonista de la señalización de P2Y, el ATPγS sólo induce la activación selectiva de los receptores P2Y₁, P2Y₂ y P2Y₁₁ [159, 161], por lo que los resultados observados con este agonista deben ser

circunscritos a la activación de estos receptores; sin embargo, el tratamiento con MRS2500 elimina del espectro a P2Y₁.

En la estrategia empleada para determinar los receptores involucrados en la liberación de ATP, el tratamiento con UTP indujo también la formación de fosfatos, lo que sugiere que los receptores P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₆ podrían participar en la liberación del ATP u otros nucleótidos. A pesar de que farmacológicamente se sugiere que los receptores P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁ pueden estar involucrados en este proceso, biológicamente se ha descrito que P2Y₂ juega un papel central dentro de la fisiología de neutrófilos, eosinófilos, así como en macrófagos y células dendríticas [77], por lo que resultaría relevante determinar experimentalmente si este receptor es el principal involucrado de manera clave dentro de la liberación de ATP en estos subtipos celulares.

Se ha descrito que algunos de los efectos descritos para el ATP en linfocitos T y neutrófilos pueden estar mediados por la señalización de adenosina, metabolito de degradación del ATP y que activa a los receptores purinérgicos P1 [77] sin embargo se sigue observando la producción de fosfatos al adicionar el UTP (ni el UTP ni la uridina activan los receptores a adenosina) así como al realizar tratamiento con los antagonistas a los receptores de adenosina por lo que los resultados presentados aquí no sustentan la participación de los receptores purinérgicos P1.

A pesar de que se ha descrito la liberación de ATP en linfocitos T mediante la activación de P2X₇ y la activación de canales de panexinas, estos procesos se han asociado a la activación del TCR o receptor de células T [158]. La activación del TCR incluye el encendido de cascadas de señalización que incluyen MAPK y la translocación nuclear de los factores de transcripción NFAT y NFκB [14, 15] entre otros, un mecanismo que no involucra la activación de las proteínas Gq. Esto sugiere que la liberación de ATP en este subtipo celular puede tener más de un mecanismo.

De manera experimental se ha descrito que la activación de los receptores P2X₇ por ATP induce la apertura de canales de panexinas y la liberación de ATP al medio extracelular en linfocitos, sin embargo, tomando en cuenta los resultados obtenidos podemos sugerir que los resultados no apuntan a la liberación mediada por la activación de P2X₇-panexinas, debido a que ni el antagonista de los receptores P2X₇ ni el de panexinas (carbenoxolona) modifican la formación de fosfatos extracelulares a 500 μM de ATP utilizados. Por lo que se sugiere que los receptores P2X puedan no estar participando en la liberación de ATP en nuestras condiciones experimentales.

En conclusión, el ATP puede ser liberado por las mismas células del sistema inmune en respuesta a estimulación fisiológica o patológica. Esto desencadena los sistemas de retroalimentación positiva o negativa que son reguladores esenciales de la respuesta inmune. La intercomunicación entre las señales parácrinas y autócrinas así como la activación de receptores purinérgicos hacen posible que las células del sistema inmune adapten sus respuestas a los retos extracelulares generados por el contexto celular en los diferentes tejidos. En este caso, la rápida liberación de ATP puede desencadenar un sistema de retroalimentación de la señalización purinérgica que amplifica estímulos débiles que las células reciben durante la activación y que permiten el montaje de la respuesta inmune acorde al proceso que se esté llevando a cabo.

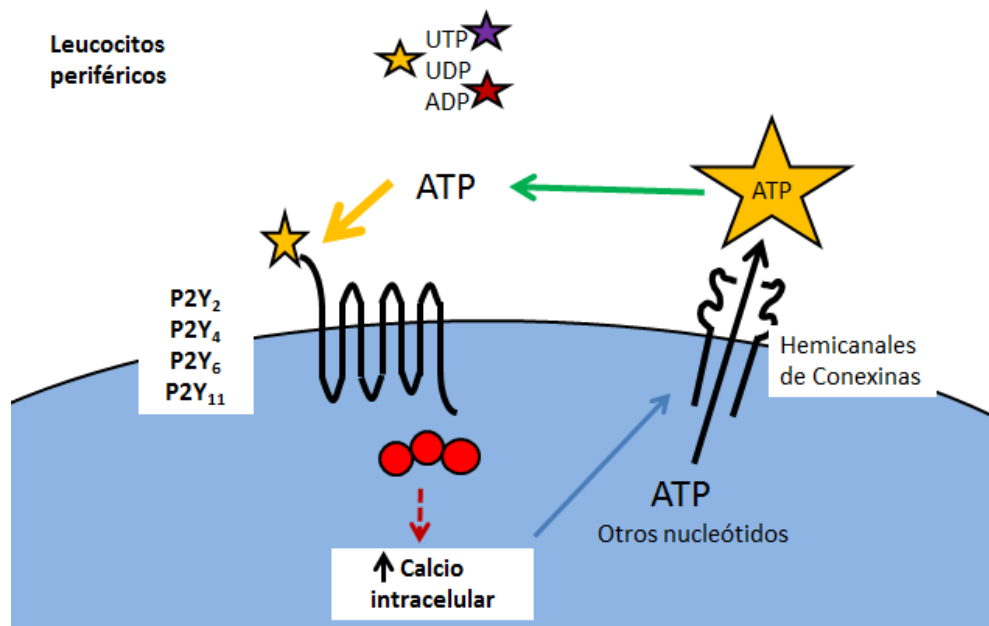


Figura 13.- Liberación de ATP inducida por ATP en leucocitos sanguíneos. El ATP u otros nucleótidos actúan sobre los receptores membranales P2Y₂, 4, 6 u 11 que activan cascadas de señalización asociadas a proteína Gq. La activación de esta vía de señalización induce la apertura de hemicanales de conexinas y la consecuente liberación de ATP u otros nucleótidos al espacio extracelular.

Conclusiones

- Los receptores P2Y_{2, 4, 6} Y 11 participan en el proceso de liberación de ATP mediada por ATP en células mononucleares y polimorfonucleares de sujetos sanos.
- La liberación de ATP mediada por la activación de los receptores P2Y es dependiente de hemicanales de conexinas en leucocitos sanguíneos circulantes.
- Los receptores P1 no participan en la liberación de ATP inducida por ATP en células mononucleares y polimorfonucleares de sujetos sanos.
- Los receptores P2X no participan en la liberación de ATP en leucocitos sanguíneos de sujetos sanos.

----- Segundo Capítulo -----

“Disminución de la expresión de la ENPP1 en leucocitos de sujetos con crisis grave de asma”

Marco Teórico

El Asma

De acuerdo a la OMS, el asma es “una enfermedad crónica que se caracteriza por ataques recurrentes de disnea y sibilancias, que varían en severidad y frecuencia de una persona a otra”[162], considerando esta descripción, la Clasificación Internacional de Enfermedades reporta que es una patología crónica de las vías respiratorias inferiores con identificándola con la clasificación J45 [163].

La Iniciativa Global para el Asma o GINA (por sus siglas en inglés), describe que esta enfermedad presenta un grupo de características clínicas incluyendo la hiperreactividad bronquial y la hipersecreción de moco a nivel de vías aéreas bajas [164]. De manera general se puede decir que el asma es un trastorno de la vía aérea conductiva caracterizada por la inflamación crónica o persistente. Sin embargo, los episodios agudos o crisis asmática se reconocen como una contracción exacerbada del músculo de la vía cuyo desencadenamiento espontáneo es demasiado sensible a un rango de estímulos endógenos y exógenos [20].

Durante la inflamación del asma, se involucran muchos subtipos celulares incluyendo eosinófilos y neutrófilos, linfocitos T CD4+ y células cebadas, siendo la infiltración eosinófila la característica más relevante. Sin embargo, la presentación clínica tan variada del asma depende de la interacción entre la respuesta inflamatoria aguda y crónica, el ambiente, agentes patógenos y la propia idiosincrasia del paciente [165-171].

Epidemiología

Prevalencia a nivel mundial

El asma es una patología que para el 2013 afectaba a unas 235 millones de personas a nivel mundial de acuerdo a la OMS [162]. A nivel mundial es la enfermedad crónica más frecuente en niños [162]. Cuando se realiza el análisis del número total de casos, los

países con mayor prevalencia fueron: Australia, Costa Rica y Nueva Zelanda (26.5 a 27.1%), mientras que los de menor prevalencia de esta enfermedad en niños fueron: Albania, Austria, Bélgica, Estonia, Alemania, India, Irán, Latvia, Polonia y Georgia (1.4 a 4.2%). En adolescentes, los países con baja prevalencia fueron: Albania, Estonia, Etiopía, Indonesia, Irán, Polonia, Rusia, Corea del Sur y Uzbekistán (1.6 a 3.0%), y con alta prevalencia: Australia, Nueva Zelanda, Omán, Perú, Singapur y Reino Unido (20.7 a 28.2%) [172, 173].

Prevalencia en México

En México no se ha estimado la prevalencia del asma en la población general del país o en grupos definidos de edad y sexo; sin embargo, se tienen resultados obtenidos por estudios independientes donde se describe a la ciudad de México con una prevalencia de aproximadamente 5%, por otra parte Hermosillo, Sonora con un 9.5% de prevalencia, mientras en Mérida, Yucatán es de alrededor del 12% [174].

Incidencia en México

De acuerdo a la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud en México hay aproximadamente 260,000 casos nuevos anuales (Datos 2015) [175]. El asma y el estado asmático, (como es definida dentro de los registros nacionales) se encuentra dentro de las primeras 20 causas de morbilidad nacional, sólo por debajo de las enfermedades infecciosas y la hipertensión arterial y la diabetes mellitus tipo 2 [175]. La incidencia descrita en los últimos cinco años (2010-2014) demuestra una tendencia a la baja **Tabla 1**.

2010	2011	2012	2013	2014	2015
305.36*	290.96*	280.60*	254.04*	254.34*	266.80*

Tabla 1: Incidencia anual del asma por cada 100 mil habitantes*. Datos obtenidos de la Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. [175]

Por grupo etario podemos encontrar que el asma tiene las siguientes características de morbimortalidad: Se encuentra dentro de las primeras 10 causas de morbilidad en la

infancia (1 a 14 años) es la décima causa de morbilidad en menores de 1 año de edad, la séptima de 1 a 4 años, la sexta de 5 a 9 años, la décima de 10 a 14 años. Se encuentra dentro de las primeras 20 causas de morbilidad en los adolescentes y los adultos jóvenes (15 a 24 años) De 15 a 19 años es la onceava causa de morbilidad, la decimotercera de 20 a 24 años. En los adultos maduros se encuentra dentro de las primeras 20 causas de morbilidad. La decimoquinta de 25 a 44, la doceava de 45 a 49 años, la onceava de 50 a 59 años de edad. Manteniendo este patrón en los adultos mayores la duodécima de 60 a 64 años y la decimoquinta de 65 y más (2013) [175] (**Figura 1**).

La incidencia tiene un patrón etario característico, siendo más la presentación de nuevos casos en la infancia (0 a 14 años) disminuyendo su incidencia en los adolescentes y adultos jóvenes (15 a 44 años) y se vuelve a elevar su incidencia en los adultos maduros y adultos mayores (45 años en adelante) [174].

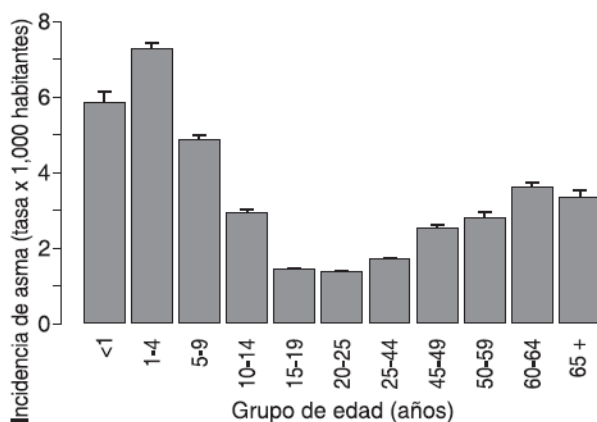


Figura 1.- Distribución de la incidencia por grupo etario. Las barras representan el promedio de (2003-2007) y las barras de error. Modificado de Vargas-Becerra, M.H., Epidemiología del asma. Neumología y Cirugía de Tórax, 2009. Todos los derechos reservados.

Mortalidad

De acuerdo al Sistema Nacional de Información en Salud, el asma es la decimosexta causa de mortalidad en el grupo etario 5 a 14 años y la decimotercera de 1 a 4 años (2008) [176].

Factores de Riesgo

-Genéticos

Se han realizado microarreglos de DNA y CHiPs conteniendo cientos de variantes genéticas, revelando asociaciones entre cientos de casos de asma y controles. Estos estudios han descrito evidencia de la presencia de loci relacionados con el asma o cercanos a genes como CHI3L1 (o YKL40), IL6R y DENND1B en el cromosoma 1. IL1RL1-IL18RL1- en el cromosoma 2, PDE4D y RAD50-IL12 en el cromosoma 5, HLA-DQ en el cromosoma 6, IL33 en el cromosoma 9, SMAD3 en el cromosoma 15, ORMDL3-GSDMB en el cromosoma 17 e IL2RB en el cromosoma 22. La mayor parte de ellos asociados a señalización de citocinas proinflamatorias, como IL1R o SMAD3 [177-179].

Sin embargo, para la mayoría de estos loci no han sido reportados en otros estudios. Una excepción es ORMDL3-GSDMB, que ha sido reportado de manera repetida en los niños asmáticos, pero no en los adultos. Para todo estos loci, los efectos son débiles, lo que representa que solamente una pequeña proporción de heredabilidad en esta patología.

-Ambientales

Los principales factores de riesgo del asma son la exposición a alérgenos como los ácaros del polvo doméstico, la caspa de los animales de compañía, los pólenes o los hongos, la contaminación, el humo del tabaco y los irritantes químicos en el lugar de trabajo [165-167].

Manifestaciones clínicas del asma

Los síntomas característicos del asma son sibilancias, disnea y tos, los cuales varían tanto en su aparición espontánea como con su resolución al tratamiento. En el caso de las exacerbaciones, o crisis asmáticas, se presenta disnea y empleo de los músculos accesorios de la respiración, además de signos físicos típicos como sibilancias en el tórax durante la inspiración y, en mayor medida, durante la espiración. De igual manera, en algunos sujetos, se tiene como manifestación inicial tos predominantemente no productiva. En estos sujetos, la observación directa con una broncoscopia indica que puede haber estenosis, enrojecimiento y edema de las vías respiratorias[180, 181].

Histopatología de la vía aérea del asmático

También hay cambios estructurales en las vías respiratorias (descritos como remodelación), un signo característico es el engrosamiento de la membrana basal por almacenamiento de colágeno en la región subyacente al epitelio bronquial. El epitelio se desprende con facilidad y la adhesión a la pared de las vías respiratorias es menor, con mayor número de células epiteliales en la capa interna [166]. La propia pared de la vía respiratoria puede mostrar engrosamiento y edema, sobre todo en el asma con desenlace letal. Otro signo frecuente en este último caso es la obstrucción de las vías respiratorias por un tapón de moco compuesto de glucoproteínas del moco secretado por las células caliciformes y proteínas plasmáticas provenientes de los vasos bronquiales. Asimismo, se observa vasodilatación e incremento del número de vasos sanguíneos [166]. El resumen de los efectos se observa en la **Tabla 2 y Figura 2**.

Características histopatológicas de las muestras bronquiales de sujetos con asma

Inflamación	+++
Músculo liso de la vía aérea	+++
Membrana basal	++
Fibrosis	+ (subepitelial)
Disrupción alveolar	-
Vasos sanguíneos	++
Células cebadas	++ (activadas)
Células dendríticas	++
Eosinófilos	++
Neutrófilos	Normal
Linfocitos	Tipo Th2
Epitelio**	Perdido
Células caliciformes	++

Tabla 2.- Resumen de la histopatología observada en el paciente asmático. Modificada de Barnes, P.J., Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Nat Rev Immunol, 2008. 8(3): p. 183-92. Todos los derechos reservados.

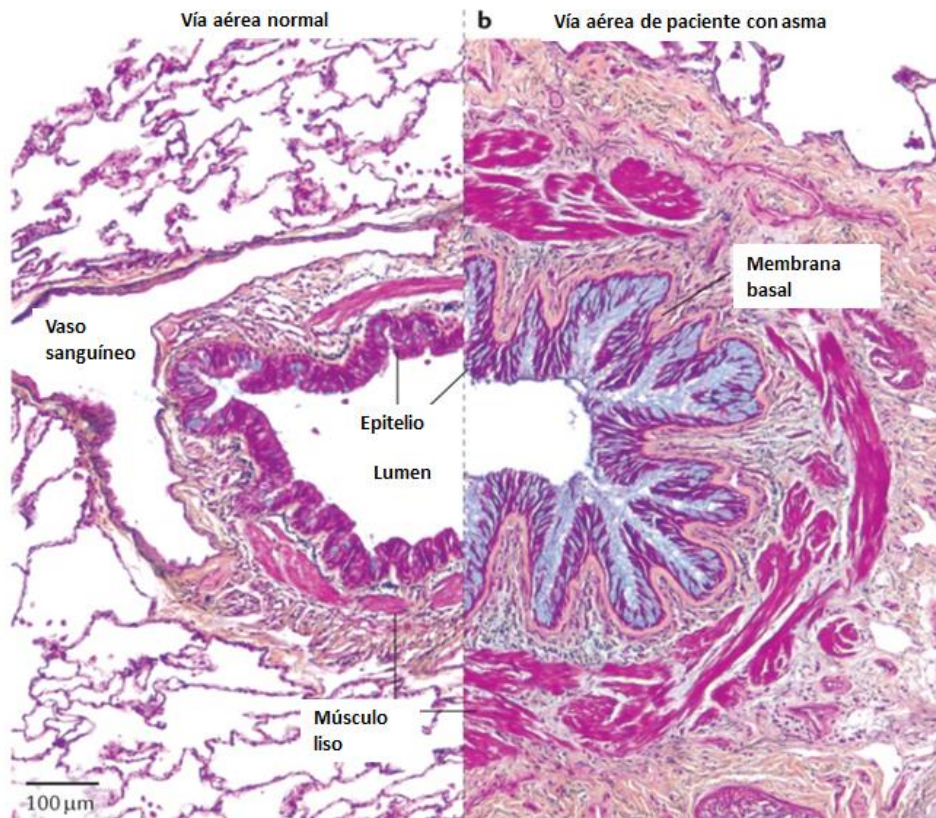


Figura 2.- Microfotografía que representa los cambios histopatológicos en la vía aérea a nivel de bronquios en sujeto sano(a) en comparación al paciente asmático crónico (b). Se observa la hiperplasia de las células caliciformes, la disminución de la luz del bronquio, el engrosamiento del músculo liso, el aumento de la membrana basal, entre otros. Modificada de Fahy, J.V., *Type 2 inflammation in asthma--present in most, absent in many*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(1): p. 57-65. Todos los derechos reservados.

Fisiopatología

Hiperreactividad de las vías respiratorias

La hiperreactividad de las vías aéreas es la anomalía funcional característica del asma y se refiere a la respuesta broncoconstrictora excesiva a múltiples elementos inhalados desencadenantes que deberían ser inocuos [20]. En el asma los anticuerpos IgE se mantienen adheridos a las células cebadas que están presentes en el intersticio en asociación con los bronquiolos, en presencia de antígenos causan la liberación de histamina, leucotrienos, factor quimiotáctico eosinofílico y bradicinina, que en conjunto

producen edema de las paredes de los bronquiolos, eosinofilia, remodelación de la vía aérea secreción de moco hacia la luz de la vía aérea y espasmo del músculo liso de la vía aérea [166, 167].

La limitación del flujo de aire en los pacientes asmáticos se debe sobre todo a la broncoconstricción, pero también contribuyen otros factores como el edema de la pared bronquial, la congestión vascular y la obstrucción de luz por secreción. Esto ocasiona reducción del volumen y en consecuencia, la característica disnea de los pacientes afectados[166].

Inmunología del asma

En general se considera al asma como una enfermedad alérgica Th2 dependiente y mediada por IgE, visión basada en la observación de que los pacientes asmáticos son frecuentemente sensibilizados por alérgenos locales inhalables –como el polvo o el polen-. Los estados asmáticos leve y moderado están caracterizados por la infiltración de las células T CD4+, eosinófilos y células cebadas hacia las vías aéreas [182]. Las células T infiltrantes corresponden a dos grupos: las células Treg y un grupo que presentan las citocinas características de la respuesta Th2 como IL-13, IL-4 e IL-5, que coordinan muchos de los aspectos de la inflamación alérgica, incluyendo la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas y la consecuente liberación de anticuerpos IgE [165-167]. Sin embargo, recientemente se ha descrito que el asma severa está caracterizado por altos niveles de Th1, interferón γ (IFN γ) tanto en humanos como en modelos animales, análisis de lavados broncoalveolares de sujetos con asma grave mostró un porcentaje importante de células T CD4+ IFN γ + y CD4+ IFN γ + IL-17+, en comparación a los leves y moderados. Los niveles de IL-5 e IL-17 son similares entre los graves y los leves-moderados, sin embargo la producción de IL-13 solo está aumentada en los pacientes con asma menos grave [183].

Diagnóstico

El diagnóstico de asma se realiza en diferentes etapas: la primera requiere un abordaje clínico riguroso y una segunda, el empleo de estudios paraclínicos que confirman el diagnóstico.

Historial de síntomas respiratorios variables

En la primera etapa analiza la presencia de signos y síntomas característicos que se han asociado al diagnóstico del asma, entre los que se encuentran las sibilancias, disnea, tos y la opresión torácica. Sin embargo, la sola presencia de estos síntomas no es suficiente para realizar el diagnóstico, sino que se requiere analizar dentro de la historia clínica que estos hayan variado a lo largo del tiempo en intensidad, exacerbaciones en la noche y temprano por la mañana, así como la presencia de desencadenantes como infecciones virales respiratorias, ejercicio, exposición a alérgenos cambios climáticos, o irritantes como humo de cigarro u olores fuertes [164].

Pruebas de función pulmonar

La espirometría simple es un estudio paraclínico que nos permite analizar tanto el volumen pulmonar, su capacidad así como el flujo aéreo; dentro de esta prueba analizamos el FEV₁ o volumen espiratorio forzado al primer segundo, el FVC o capacidad vital forzada y el PEF o el flujo espiratorio máximo, parámetros analizados en los trastornos pulmonares[180].

El empleo de la espirometría durante el diagnóstico del asma o su clasificación de acuerdo a su gravedad nos confirma la limitación del flujo de aire al observar un FEV₁ reducido o al determinar una reducción del cociente FEV₁/FVC menor al 70%. Como parte del proceso diagnóstico se analiza la reversibilidad de la limitación de flujo a través de un incremento >12% y 200 mL en FEV₁ 15 min después de inhalar un agonista β₂ adrenérgico como el salbutamol o un fármaco equivalente [164, 180]. En algunos pacientes, el incremento >12% y 200 mL en FEV₁ posterior a un tratamiento con antiinflamatorios por un lapso de dos a cuatro semanas se considera como diagnóstico de asma. Adicional a estos métodos se emplean de manera análoga en la práctica clínica a través la “prueba de reto bronquial” mediante el empleo de histamina o metacolina, donde se observa la caída del FEV₁ en un porcentaje mayor al 20%, mientras que en los sujetos no asmáticos la reducción no es tan severa[164, 180] **(Figura 3)**.

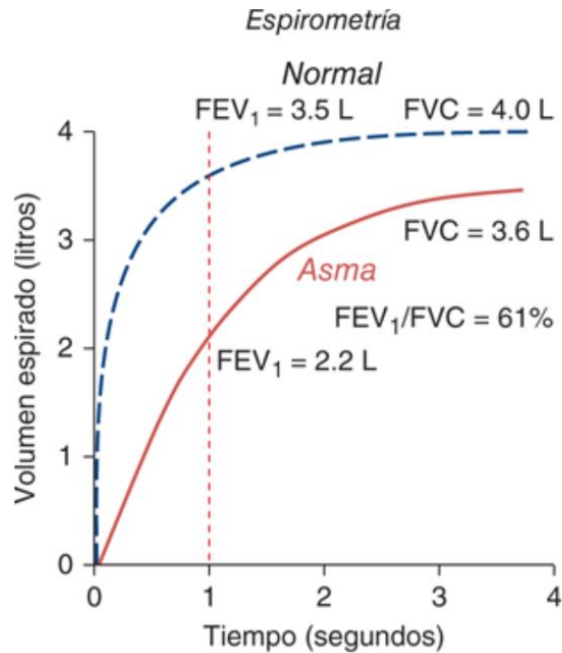


Figura 3.- Espirometría y curva de flujo/volumen en asmáticos en comparación con sujetos sanos. Se observa una disminución del volumen espiratorio forzado al primer segundo (FEV₁), pero la reducción de la capacidad vital forzada (FVC) es menor, por lo que la proporción FEV₁/FVC se reduce (<70%). Imagen obtenida de Fauci AS, et al. Harrison's principles of internal medicine. Vol 1. 17th ed. New York: McGraw Hill; 2008. Todos los derechos reservados.

Ectonucleotidasas

Debido a que el ATP es una molécula asociada a daño, es hidrolizada rápidamente hacia ADP y AMP a través de proteínas de membrana conocidas como ectonucleotidasas, dentro de estas enzimas encontramos a la trifosfato difosfo hidrolasas o ENTPD's así como a las nucleótido pirofosfatasas o ENPP's[28, 29]. Estas enzimas forman parte de familias distintas con características bioquímicas y funcionales distintas **Figura 4.**

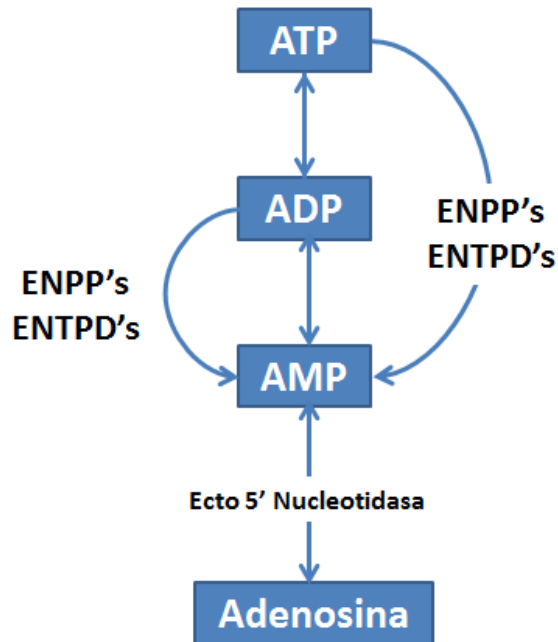


Figura 4.- Diagrama general donde se observa el metabolismo de los nucleótidos extracelulares a través de las ectonucleotidasas, como molécula central se observa el ATP. Las ENTPD's y las ENPP's tienen la capacidad de metabolizar el ATP o ADP hacia AMP, que no activa los receptores purinérgicos. El AMP finalmente es degradado a adenosina a través de la Ecto 5' nucleotidasa.

Trifosfato Difosfohidrolasas

Las ectonucleotidasas son enzimas encargadas de degradar el tri- y difosfonucleótidos hacia monofosfonucleótidos a nivel de los compartimientos intra y extracelular [28, 160, 184]. Hasta el momento se han descrito 8 enzimas (ENTPD1-8) capaces de metabolizar nucleótidos, sin embargo, debido al sitio donde se realiza esta acción se han descrito dos grupos: las ectoenzimas y las endoenzimas. Dentro de las ectoenzimas se encuentran la ENTPD1, ENTPD2, ENTPD3 y la ENTPD8, que se encuentran adosadas a la membrana celular; estas proteínas están compuestas de dos dominios transmembranales unidos a través de un asa extracelular donde se encuentra el dominio catalítico, mientras que los dominios C- y N terminal están intracelularmente. Por el otro lado dentro de las endoenzimas encontramos a la ENTPD4, ENTPD5, ENTPD6, and ENTPD7 que tienen por característica que se encuentran en las membranas de los organelos intracelulares; en estas proteínas el dominio catalítico se observa hacia el espacio de los organelos

membranosos. Dentro de las endoenzimas encontramos a la ENTPD 5 y 6 que presentan solo un dominio transmembranal con un sitio de corte predicho, por tanto estas ENTPD's pueden ser escindidas y liberadas al medio extracelular a través de exocitosis. Independientemente de su localización, todas estas enzimas poseen 5 dominios de apirasa que está involucrada en el ciclo catalítico de degradación de nucleótidos, sin embargo, la afinidad y capacidad de degradación de nucleótidos es diferente en cada una de ellas [28, 160, 184].

- **ENTPD1**

La Ectonucleótido Trifosfato Difosfohidrolasa 1 o ENTPDasa1 es una proteína transmembranal con actividad de nucleótido difosfato hidrolasa y de nucleótido trifosfato hidrolasa., como se le nombrará de ahora en adelante. La proteína se encuentra compuesta por 510 aminoácidos y una masa molecular estimada de 57 kDa, estructuralmente la podemos encontrar en forma de homodímeros. Es capaz de hidrolizar tanto ATP como ADP a la misma tasa [185, 186].

- **ENTPD2**

La Ectonucleótido Trifosfato Difosfohidrolasa 2 o ENTPDasa 2 es una proteína transmembranal con actividad de nucleótido difosfato hidrolasa y de nucleótido trifosfato hidrolasa que requiere de cationes divalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} para su función. La proteína tiene un aproximado de 495 aminoácidos y una masa molecular estimada de 53 kDa. El orden de actividad de ectonucleotidasa con diferentes substratos es $ATP > GTP > CTP = ITP > UTP \gg ADP = UDP$ [187, 188].

- **ENTPD3**

La Ectonucleótido Trifosfato Difosfohidrolasa 3 o ENTPDasa es una proteína transmembranal con actividad de nucleótido difosfato hidrolasa y de nucleótido trifosfato hidrolasa, requiere de cationes divalentes para su acción. La proteína obtenida de la proteína está compuesta por 529 aminoácidos y tiene una masa molecular estimada de 59 kDa. Tiene la capacidad de degradar tanto ATP como ADP, prefiriendo tres veces más el primer metabolito, en comparación al segundo [189, 190].

- **ENTPD4**

La Ectonucleótido Trifosfato Difosfohidrolasa 4 o NTPDasa-4 es una proteína transmembranal con actividad de nucleótido difosfato hidrolasa y de nucleótido trifosfato hidrolasa dependiente de la presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} . La porción de la proteína que tiene el dominio de apirasa se encuentra en la parte intracelular y juega un papel importante en la recuperación de nucleótidos de los lisosomas. La proteína se encuentra compuesta por 616 aminoácidos y tiene una masa molecular estimada de 70 kDa. Hidroliza de manera preferencial a los nucleótidos 5'-difosfatos y tienen una menor capacidad para hidrolizar nucle 5'-trifosfatos. El orden de actividad es $\text{UDP} \gg \text{GDP} = \text{CDP} = \text{TDP}$, mientras que AMP, ADP, ATP and UMP no son biotransformados por ENTP4. [191, 192].

- **ENTPD5**

La Ectonucleótido Trifosfato Difosfohidrolasa 5 es una proteína con actividad de guanosin difosfatasa y uridin difosfatasa dependiente de la presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Sólo posee una isoforma conformada por 428 aminoácidos y tiene una masa molecular estimada de 47.5 kDa. ENTP5 tiene la característica de ser secretada al medio extracelular, por lo que tiene patrones específicos de glicosilación para este proceso [193, 194].

- **ENTPD6**

La Ectonucleótido Trifosfato Difosfohidrolasa 6 es una proteína que tiene la característica de ser secretada. La proteína está conformada por 484 aminoácidos y tiene una masa molecular estimada de 53.24 kDa. Hidroliza de manera preferencias a los nucleótidos 5'-difosfatos y tienen una menor capacidad para hidrolizar nucleósidos y es incapaz de metabolizar los monofosfatos. Por la similaridad del sitio activo se propone que el orden de actividad para los diferentes substratos es $\text{GDP} > \text{IDP} \gg \text{UDP} = \text{CDP} \gg \text{ADP}$. Debido a que ENTP6 tiene la característica de ser secretada al medio extracelular [195, 196].

- **ENTPD7**

La Ectonucleótido Trifosfato Difosfohidrolasa 7 es una proteína membrana de localización vesicular con actividad de nucleótido trifosfato hidrolasa. La proteína presenta 604 aminoácidos y una masa de 68.9 kDa. Presenta actividad enzimática hacia $\text{UTP} > \text{GTP} > \text{CTP}$. Para su acción requiere como cofactores metálicos. Debido al tipo de localización sufre modificaciones postraduccionales como la glicosilación [197, 198].

- **ENTPD8**

La Ectonucleótido Trifosfato Difosfohidrolasa 8 es una proteína transmembranal con actividad de nucleótido difosfato hidrolasa y de nucleótido trifosfato hidrolasa. La proteína presenta 495 aminoácidos y una masa de 53.9 kDa, presenta actividad enzimática hacia ATP, ADP, UTP y UDP, pero no hacia AMP. Para su acción enzimática requiere cofactores metálicos como. [199, 200]

Nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasas

La familia de las ENPP está compuesta por 7 miembros con características de ser ectoenzimas, pero solo los tres miembros (NPP1-3) son relevantes en el contexto de la señalización purinérgica [28, 201]. Estas enzimas son capaces de hidrolizar los enlaces pirofosfato y fosfodiéster en un amplio número de moléculas como nucleótidos, así como ésteres de fosfato de colina y lisofosfolípidos [202-215]. Por sus características estructurales se dividen en dos grupos: I) que posee dos dominios similares somatomedina B, un dominio catalítico central y un dominio parecido a nucleasa en el extremo C terminal [28, 184, 201]; este grupo de enzimas al ser embebidas en la membrana presentan el dominio catalítico en el espacio extracelular; en este grupo podemos encontrar a las enzimas NPP1-3 en cambio, el grupo II posee básicamente el dominio catalítico solamente, al ser localizadas en membrana se observa dirigido hacia el espacio intracelular [201, 210, 212, 214].

- **ENPP1**

La Ectonucleótido Pirofosfatasa fosfodiesterasa1 es una glicoproteína transmembranal de tipo II en forma de homodímero y unida por puentes disulfuro que posee actividad de nucleótido difosfato hidrolasa y de nucleótido trifosfato hidrolasa. La proteína está compuesta de 925 aminoácidos y tiene una masa aproximada de 104 kDa. De manera preferencial hidroliza ATP pero puede hidrolizar otros 5' nucleótidos trifosfatos como GTP, CTP, TTP y UTP, así como los monofosfatos correspondientes con la liberación de pirofosfato y polifosfatos de diadenosina, así como de transformar 3',5'-cAMP hacia AMP [214, 215].

- **ENPP2**

La Ectonucleótido pirofosfatasa 2 es una enzima con actividad de nucleótido fosfodiesterasa debido a que cataliza la ruptura de los enlaces diéster en el 5' de los oligonucleótidos. Además tiene la actividad de fosfolipasa y cataliza la producción de ácido lisofosfatídico en el medio extracelular. Está compuesto de 863 aminoácidos y tiene una masa molecular aproximada de 98 kDa, para efectuar su acción es secretada en forma de preproteína y en el medio extracelular es transformada en su forma activa donde requiere de iones divalentes como zinc y Ca^{2+} para mantener su estructura terciaria. Su substrato mayor es la lisofosfatidilcolina, además puede hidrolizar bis bis-pNPP, pNP-TMP, y en una menor proporción, ATP [212, 213].

- **ENPP3**

La Ectonucleótido pirofosfatasa 3 es una enzima que presenta actividad de nucleótido ATP pirofosfatasa y de ATPasa. Metaboliza una variedad de molecular con enlace fosfodiéster y fosfosulfato incluyendo deoxinucleótidos y NAD. La proteína está compuesta por 875 aminoácidos y tiene una masa aproximada de 100 kDa. Es una glicoproteína transmembranal tipo II –N terminal intracelular- que requiere de iones divalentes como zinc para efectuar su acción catalítica [210, 211].

- **ENPP4**

En el caso de los humanos la presencia de la Ectonucleótido pirofosfatasa 4 NPP4 aún es putativa, el ortólogo en roedores se ha descrito con actividad de hidrolasa de fosfatos de diadenosina hacia AMP, ADP o ATP. La forma predicha tiene 453 aminoácidos y una masa predicha de 51 kDa, por similitud se ha descrito que probablemente requiera al ión zinc como cofactor. NPP4 es una proteína transmembranal de un solo pase tipo I [208, 209].

- **ENPP5**

En el caso de los humanos la presencia de la Ectonucleótido Pirofosfatasa 5 o NPP5 aún es putativa. La forma predicha tiene 477 aminoácidos y una masa predicha de 54.66 kDa, por similitud se ha descrito que probablemente una al ión zinc. Tiene un dominio transmembranal pero se ha sugerido que también puede ser secretada, finalmente y a pesar de pertenecer a la familia de las NPPs carece del dominio de pirofosfatas de nucleótidos así como el de fosfolipasa D [206, 207].

- **ENPP6**

La Ectonucleótido Pirofosfatasa NPP6 es una glicoproteína transmembranal con actividad de fosfodiesterasa de glicerolfosfolípidos como fosfatidilcolina. La proteína está compuesta por 440 aminoácidos y tiene una masa aproximada de 50.24 kDa. El substrato que prefiere es lisoesfingomielina (similaridad), hidroliza lisofosfatidil colina para formar monoacilglicerol y fosforilcolina, y no produce ácido lisofosfatídico mostrando que tiene actividad de lisofosfolipasas C, no tiene actividad sobre fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol o ácido fosfatídico [204, 205].

- **ENPP7**

La Ectonucleótido Pirofosfatasa NPP7 es una glicoproteína transmembranal con actividad de fosfolipasa C y cataliza la conversión de esfingomielina en ceramida. La proteína está compuesta por 458 aminoácidos y tiene una masa aproximada de 51.5 kDa. A pesar de pertenecer a la familia de las NPP no se ha descrito actividad de nucleótido pirofosfatasa [202, 203].

Antecedentes

Señalización purinérgica y asma

El adenosina trifosfato o ATP, molécula central dentro de los procesos energéticos intracelulares, participa en la fisiología de la vía respiratoria. La acción del ATP permite la hidratación de la vía aérea y el movimiento ciliar de las células epiteliales que son necesarios para la limpieza a través de moco [216, 217] la contracción del músculo liso traqueobronquial y broncoespasmo [218, 219], adicionalmente se ha descrito como molécula de señalización clave de daño celular que puede inducir reacción inflamatoria [30, 34]. Para efectuar su acción el ATP requiere la activación de familias de receptores membranales purinérgicos conocidos como P2X y P2Y. Los P2X son receptores canal catiónicos inespecíficos permeables a Ca^{2+} , Na^+ y K^+ . Los P2Y son receptores metabotrópicos que efectúan su acción a través de la activación de proteínas G y formación de segundos mensajeros [27, 220, 221].

Debido a que el ATP tiene un papel importante en la homeostasis de la vía aérea, los niveles extracelulares de esta molécula son regulados de manera precisa y continua. Las enzimas responsables de la degradación de ATP en metabolitos, como el AMP, que no activan a los receptores purinérgicos, se conocen como ectonucleotidasas, de estas enzimas las que presentan en el dominio extracelular el sitio catalítico son las ENTPDasas 1, 2, 3 y 8 así como las ENPP1, 2 y 3 [222].

A pesar de que se ha estudiado el papel que tiene el ATP en la fisiología normal de la vía aérea, hace falta información sobre su regulación en procesos patológicos de la misma. En el caso del asma, se ha asociado al ATP con la fisiopatología de la enfermedad, en la literatura se ha descrito que los niveles de ATP en lavados broncoalveolares aumentan en pacientes asmáticos en comparación a sujetos sanos[223]. Además se ha reportado que las vías aéreas de pacientes asmáticos son 6400 veces más sensibles a la inhalación de ATP que los controles sanos y en el caso de los asmáticos el ATP es 87 y 50 veces más potente que la metacolina e histamina, respectivamente, para producir un 15 % de decremento en el volumen espiratorio forzado al primer segundo [223].

En modelos animales de asma se ha descrito que la eosinofilia y la inflamación en la vía aérea así como la hiperreactividad bronquial característicos del estado asmático desaparecían cuando se hidrolizaba al ATP o se usaba suramina, un antagonista de los receptores purinérgicos[34]. En este contexto, en el grupo de trabajo del Dr. Montaña, reportaron que en cobayos sensibilizados a ovoalbúmina (OA), la respuesta de broncoconstricción inducida por el reto antigénico se incrementaba significativamente cuando eran inhibidas las ectonucleotidasas[218]. Finalmente, se ha reportado que la disminución de la expresión de la ENTPDasa 1, enzima que participa en la biotransformación del ATP en AMP, puede estar asociada al desarrollo de la inflamación de la vía aérea [92]. Estas evidencias apuntan que la acción y degradación del ATP pueden ser parte de mecanismos centrales en la fisiopatología del asma.

Finalmente resultados en el laboratorio han descrito que en el modelo experimental de asma, empleando cobayos tratados con ovoalbúmina, se ha descrito una disminución de la función de las ectonucleotidasas en células polimorfonucleares (PMN) y mononucleares (MNC) obtenidas de sangre.

Problema de investigación

A pesar de que los antecedentes refieren de un papel clave del ATP en el asma, resulta poco viable estudiar directamente la expresión y función de las ectonucleotidasas en la vía aérea del paciente asmático; estas limitaciones han llevado a plantear la necesidad del estudio de tejidos que puedan reflejar las condiciones del paciente y que sean de fácil acceso. El antecedente del laboratorio sobre la disminución de la actividad de las ectonucleotidasas en el modelo de asma nos da la pauta de que es posible estudiar el papel que tienen las ectonucleotidasas en la fisiopatología del asma empleando células sanguíneas.

Por los antecedentes previamente descritos, resulta interesante estudiar la expresión y función de las ectonucleotidasas en células PMN y MNC obtenidas de muestras sanguíneas de pacientes asmáticos así como relacionarlos con el nivel crisis asmática que presentan.

Importancia

Las crisis asmáticas graves producen intervalos de dificultad respiratoria y asfixia, lo cual puede ser desalentador o incluso discapacitante para el paciente; a pesar de que la mortalidad ha disminuido con los años aún representa un problema por el impacto económico y social asociado a esta [165]. Con el tratamiento adecuado y la observación de las recomendaciones terapéuticas, los pacientes con asma pueden mantener una vida productiva y normal. Por lo cual, estudios en pacientes asmáticos permitirán entender mejor la fisiopatología de la enfermedad que en un futuro generarán nuevas estrategias terapéuticas para su control.

Hipótesis

Los pacientes con mayores niveles de gravedad de crisis asmática grave poseen menor función y expresión de las ectonucleotidasas en leucocitos obtenidos de muestras sanguíneas.

Objetivo General

Determinar el proceso de regulación de la señalización purinérgica: liberación de ATP en leucocitos sanguíneos de sujetos sanos así como la determinación de su metabolismo leucocitos obtenidos de pacientes asmáticos.

Objetivos Particulares

- 1.-Analizar el papel que tiene la señalización del ATP a través de los receptores P2Y y P2X sobre la liberación de ATP u otros nucleótidos en leucocitos sanguíneos de sujetos sanos.
- 2.- Analizar la expresión de las ectonucleotidasas en leucocitos sanguíneos de pacientes con crisis asmática de diferente gravedad**

Objetivos Específicos

1.- Analizar la actividad de las ectonucleotidasas en leucocitos obtenidos de muestras sanguíneas de pacientes con crisis asmática leve, moderada y grave..

1.1. Se analizará la actividad de las ectonucleotidasas empleando el método de verde de malaquita/molibdato de sodio en células mononucleares y polimorfonucleares.

2.- Determinar la expresión de las ectonucleotidasas cuyo dominio catalítico se encuentra hacia el espacio extracelular en leucocitos obtenidos de muestras sanguíneas de pacientes con crisis de asma de diferente gravedad.

2.2. Se analizarán la expresión del mRNA para las ENTPDasas 1, 2, 3 y 8 así como ENPP1, 2 y 3 mediante PCR en tiempo real empleando células polimorfonucleares.

2.1. Se analizarán la expresión de las ENTPDasas 1, 2, 3 y 8 así como ENPP1, 2 y 3 mediante inmunofluorescencia en células polimorfonucleares.

3.- Comparar la expresión y función de las ectonucleotidasas con los diferentes diagnósticos de crisis asmática.

4.- Contrastar los resultados obtenidos con sujetos sanos.

Material y métodos

El estudio se realizó en colaboración con el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, por lo cual, se garantiza el acceso a las muestras de los pacientes asmáticos. Todos los procedimientos fueron aprobados por la Comisión de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM y del Comité de Ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Toma de muestra

Se realizó la toma de muestra de sangre de pacientes que presentaron crisis asmática leve, moderada y grave y acudieron a la unidad de urgencias del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, posterior a la firma de consentimiento informado. La definición del estatus del paciente con nivel de crisis asmática se realizará de acuerdo a los lineamientos descritos por GINA (apéndice 1).

Purificación de las células polimorfonucleares y mononucleares

La sangre colectada de pacientes asmáticos y sujetos sanos fue colocada en tubos Falcon de 14 ml (Ref 352057, Corning Nueva York, Estados Unidos) que contenían una solución comercial (Polymorphprep, Acurate, Oslo, Noruega) en una relación 1:1. Estos tubos fueron centrifugados a 1800 rpm durante 35 min a 20°C para separar la fracción blanca de las roja. La fracción que contenía las células mononucleares fue separada, mientras polimorfonucleares fue colocada en un tubo Falcon de 50 ml que contenía RPMI como medio de recepción. Las células fueron centrifugadas a 1800 rpm durante 10 min a 20°C para eliminar los restos celulares y de Polimorphprep. Para eliminar los eritrocitos contaminantes se incubaron las células en buffer de lisis (apréndice 2) durante 5 min a 4°C. Posteriormente fueron centrifugadas a 1800 rpm durante 10 min a 20°C y el sobrenadante fue desechado. El botón celular fue resuspendido en solución de trabajo

(apéndice 3) y centrifugado en una minifuga durante 1 minuto, se realizaron dos lavados con solución de trabajo siguiendo el mismo método. El botón se resuspendió en solución de trabajo y se tomó una alícuota para contar al microscopio empleando una cámara de Neubauer. Las células polimorfonucleares fueron reservadas por su posterior uso.

Medición de la actividad de las ectonucleotidasas

La actividad de las ectonucleotidasas en cada uno de estos tipos celulares fue determinada por la cuantificación de fosfato inorgánico (Pi) liberado. Para este fin, en tubos de borosilicato se colocaron 2×10^6 de células (mononucleares y θ polimorfonucleares). Se les adicionó el medio de reacción en un volumen final de 1 ml de SSF 0.9%, preincubado durante 20 min a 37°C. La reacción fue iniciada por la adición de diversas concentraciones de ATP-Mg²⁺ (125, 250 y 500 μ M) y la actividad fue evaluada a diferentes tiempos de incubación (4, 8, 16, 32, 64 y 128 min) posterior a la adición de ATP-Mg²⁺. Para detener la reacción de cada tiempo, la muestra fue puesta en hielo $\sim 4^\circ\text{C}$ durante 10 min, para inmediatamente después cuantificar la liberación del fosfato inorgánico usando un método colorimétrico a 660 nm, acoplado con una mezcla de molibdato de sodio-Elon [4-(metilamino) fenol hemisulfato], y usando H₃PO₄ como estándar. Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado y la actividad específica fue reportada como fosfato liberado (μ M). Adicional a esto se utilizó ARL 67156 como inhibidor de las ectonucleotidasas [224].

Expresión de ectonucleotidasas mediante PCR en tiempo real

Células polimorfonucleares purificadas se homogenizaron en buffer de lisis. Las muestras se tratan para la obtención de RNA libre de DNA empleando el kit RNAeasy spin. Se sintetizó el cDNA empleando el kit SuperScript VILO cDNA synthesis kit. Las sondas específicas para NTPDasa 1, 2, 3 y 8, NPP1, 2 y 3, GAPDH fueron provistas por Applied Biosystems –Tabla anexa-. Se realizaron curvas de validación y eficiencia. Technologies). Las reacciones de qPCR fueron realizadas en un StepOne Real Time PCR system (Foster City CA, USA). El análisis de los resultados se realizó empleando el método $\Delta\Delta\text{CT}$ y $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$.

Sondas empleadas para PCR en tiempo real

Ectonucleotidase	Catalog number	Assay ID	Dye
ENTPDase 1	4453320	Hs00969559_m1	FAM
ENTPDase 2	4331182	Hs00154301_m1	FAM
ENTPDase 3	4331182	Hs00928977_m1	FAM
ENTPDase 8	4331182	Hs01651150_m1	FAM
ENPP1	4331182	Hs01054040_m1	FAM
ENPP2	4331182	Hs00905117_m1	FAM
ENPP3	4331182	Hs01038393_m1	FAM
GAPDH	4331182	Hs03929097_g1	FAM
Beta actin	4331182	Hs99999903_m1	FAM
18S rRNA	4318839	No disponible	VIC-MGB

Inmunofluorescencia

Las células polimorfonucleares purificadas fueron fijadas en paraformaldehído 4% /PBS durante 10 minutos a 4°C. Posterior a esto fueron lavadas en PBS y en PBS Tween 20 al 0.1% para poder extender en laminillas electrocargadas (Biocare Medical, Concord CA, Estados Unidos) y dejadas secar a temperatura ambiente; las laminillas fueron guardadas a 4°C hasta su empleo. Las laminillas con células PMN fueron lavadas en PBS y montadas en un rack empleando coverplates (Biocare). Posterior a esto se incubaron con solución permeabilizadora (0.05% tween 20 en PBS) durante 10 min a temperatura ambiente y fueron lavados con PBS. Para el bloqueo de sitios inespecíficos de unión de anticuerpos se incubó con una solución de suero de caballo al 10%/2% albumina bovina sérica en 0.05% Tween® 20 en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente y subsecuentemente se realizaron lavados con PBS. Los anticuerpos en contra de los ectonucleotidasas (Tabla) fueron eluidos en diluyente Da Vinci Green (Biocare)) en una proporción 1:50 e incubados toda la noche a 4°C.

Ectonucleotidasa	Características del anticuerpo	Número de catálogo
ENTPDase 1	Monoclonal hecho en ratón	ab30422
ENTPDase 2	Policlonal hecho en conejo	ab102651
ENTPDase 3	Monoclonal hecho en ratón	ab67263

ENTPDase 8	Policlonal hecho en cabra	sc-160609
ENPP1	Policlonal hecho en cabra	ab40003
ENPP2	Monoclonal hecho en ratón	ab77104
ENPP3	Policlonal hecho en conejo	ab118445

Todos los anticuerpos fueron obtenidos de la casa comercial Abcam (Cambridge, UK) con excepción de ENTPD 8 que fue obtenido de Santa Cruz Biotech (Dallas, TX, USA).

Las laminillas fueron lavadas con PBS y ulterior a esto se incubó con un anticuerpo fluorescente en contra de la especie donde se generó el anticuerpo primario anti-entonucleotidasas diluido 1:100 en PBS e incubado a temperatura ambiente durante 20 min, posterior a esto fueron lavadas con PBS.

Proteína	Animal donde fue obtenido el anticuerpo	Anticuerpo secundario empleado
ENTPDase 1 ENTPDase 3 ENPP2	Ratón	Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse (H+L) antibody (A21202, Life Technologies, Carlsbad CA, Estados Unidos)
ENTPDase 8 ENPP1	Cabra	Alexa Fluor 488 donkey anti-goat (H+L) antibody (A11055, Invitrogen, Carlsbad CA, Estados Unidos)
ENTPDase2 ENPP3.	Conejo	Alexa Fluor488 donkey anti-rabbit (H+L) antibody (A11055, Invitrogen, Carlsbad CA, Estados Unidos)

La tinción de los núcleos se realizó con TOTO-3 iodide (Life Technologies, Carlsbad CA, Estados Unidos) durante 10 min a temperatura ambiente y las laminillas fueron lavadas con PBS a continuación. Las células se fijaron con ~~en~~ paraformaldehído 4% /PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente y lavadas con PBS previo a su montaje. Las laminillas fueron montadas con medio de montaje Dako Fluorescence Mounting Medium (Dako, Carpinteira CA, Estados Unidos) y dejadas secar. Las laminillas fueron observadas y fotodocumentadas en un microscopio confocal (LSM 5 Pascal, Carl Zeiss AG, Jena, Alemania). Como controles negativos se emplearon laminillas sin anticuerpo anti-

ectonucleotidasas, para determinar si los resultados de ENPP1 correspondían a una inmunoreacción específica se incubó el anticuerpo anti-NPP1 con el péptido bloqueador del anticuerpo (Ab45822 Abcam, Cambridge Reino Unido) en una proporción 1:2 durante toda la noche a 37°C, posterior a esto, se empleó anticuerpo primario y fue usado como esta previamente descrito.

Análisis estadístico

La comparación de la actividad y expresión de las ectonucleotidasas membranales en los diversos niveles de gravedad de la exacerbación se evaluaron mediante ANOVA seguido de prueba de Dunnet.

Financiamiento

El proyecto cuenta con financiamiento por PAPIIT, UNAM (IN200613) y CONACYT (219859)

Eliminación de residuos biológicos

Todo el material químico-biológico e infeccioso fue desechado de acuerdo a los lineamientos de la Facultad de Medicina y del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. En base a la Ley General de Salud, el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de la Investigación para la Salud, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos, el Reglamento de Seguridad y Coordinación en Materia de Investigación para la Salud en la UNAM, el Reglamento Interior de la Facultad de Medicina y las Normas Oficiales Mexicanas aplicables en materia de Bioseguridad.

Resultados

En este reporte analizamos la función de las ectonucleotidasas en leucocitos obtenidos de muestras sanguíneas de pacientes asmáticos así como relacionarlos con el nivel crisis asmática. Para cumplir los objetivos de este estudio empleamos el siguiente abordaje: realizamos tres tipos de perspectivas: la perspectiva funcional empleando una curva de actividad enzimática, la determinación de la expresión de la proteína mediante inmunofluorescencia y finalmente la expresión del mRNA a través de PCR en tiempo real.

Para determinar la actividad de las ectonucleotidasas empleando el método de verde de malaquita/molibdato de sodio en células mononucleares y polimorfonucleares en el que se determina la cantidad de fosfatos generados mediante un método colorimétrico. Al realizar un análisis de la actividad enzimática de las ectonucleotidasas, independiente del tipo de enzima empleada para la degradación de ATP, observamos que todas las muestras –independientemente de su origen- tenían la capacidad de degradar el ATP, lo que sugiere que las ectonucleotidasas son expresadas en células polimorfonucleares como mononucleares. Adicional a esto, cuando analizamos los datos podemos observar que la capacidad de degradar el ATP y generar fosfato inorgánico se mantiene durante el curso temporal de la cinética (**Figura 1**).

Al analizar los datos separados por niveles de gravedad de crisis asmática y los donadores sanos podemos observar que las cinéticas de formación de fosfato inorgánico son similares entre las células provenientes de donadores sanos con los de la crisis asmática leve y moderada, hecho que no se observa con los datos de la crisis grave. En el caso de la crisis grave podemos observar una disminución en la formación de fosfatos estadísticamente significativo en temporalidad similar, lo que sugiere que en este caso hay una menor actividad enzimática de las ectonucleotidasas en las células polimorfonucleares y mononucleares (**Figura 1**).

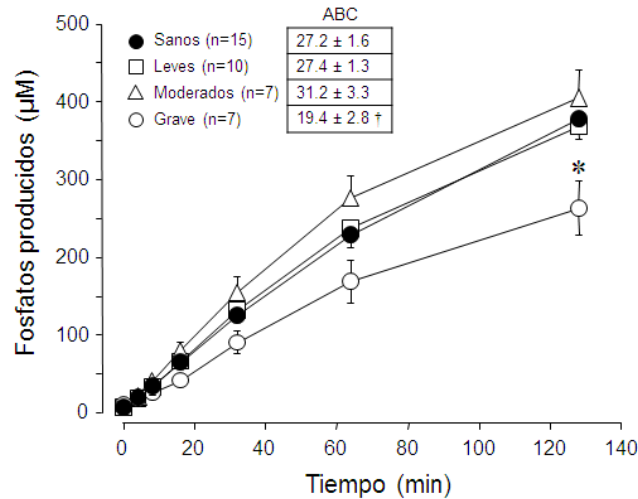


Figura 1.- Medición de la actividad enzimática de las ectonucleotidasas de sujetos sanos y pacientes con diferentes niveles de crisis asmática. La actividad fue determinada mediante la producción de fosfatos en la presencia de ATP 500 μ M empleando células polimorfonucleares y mononucleares. * $p < 0.05$. ABC: área bajo la curva.

Para determinar que la generación de fosfatos fuera mediada a través de la degradación vía ectonucleotidasas se empleó un inhibidor selectivo de la actividad enzimática de estas –ARL 67156-. Esta molécula tiene la capacidad de inhibir la actividad de las ectonucleotidasas que se han descrito con mayor expresión celular: ENTPDasa1, ENTPDasa3 y ENPP1. En este caso las determinaciones de la generación de fosfato inorgánico se realizaron empleando dos concentraciones del inhibidor ARL en cada uno de los tipos de crisis asmática. Al observar las gráficas de las cinéticas enzimáticas observamos que las células, independiente del nivel de gravedad de su crisis asmática, son sensibles a la presencia de ARL debido a que hay una disminución de la formación de fosfato inorgánico a diferentes concentraciones de ARL (**Figura 2**).

Cuando realizamos el análisis separando por tipo de donador observamos que los sujetos sanos no presentan inhibición a una dosis de 100 μ M de ARL, pero sí de 320 μ M lo que sugiere que las enzimas no inhibidas pueden rescatar parcialmente la actividad total de nucleotidasa de las células a pesar de que ENTPDasa1, ENTPDasa3 y ENPP1 se encuentran inhibidas (**Figura 2**). En el caso de las cinéticas obtenidas de leucocitos de pacientes con crisis asmática leve, moderada y grave observamos un porcentaje de inhibición de 22, 23 y 30 %, respectivamente, que independientemente de la concentración de ARL se presenta una inhibición significativa de la actividad enzimática (**Figura 2**). Estos datos sugieren que hay una expresión diferencial de las ectonucleotidasas entre donadores

sanos y pacientes con crisis asmática, independientemente de la gravedad de la crisis asmática, sin embargo, se observa una mayor inhibición en los pacientes asmáticos graves.

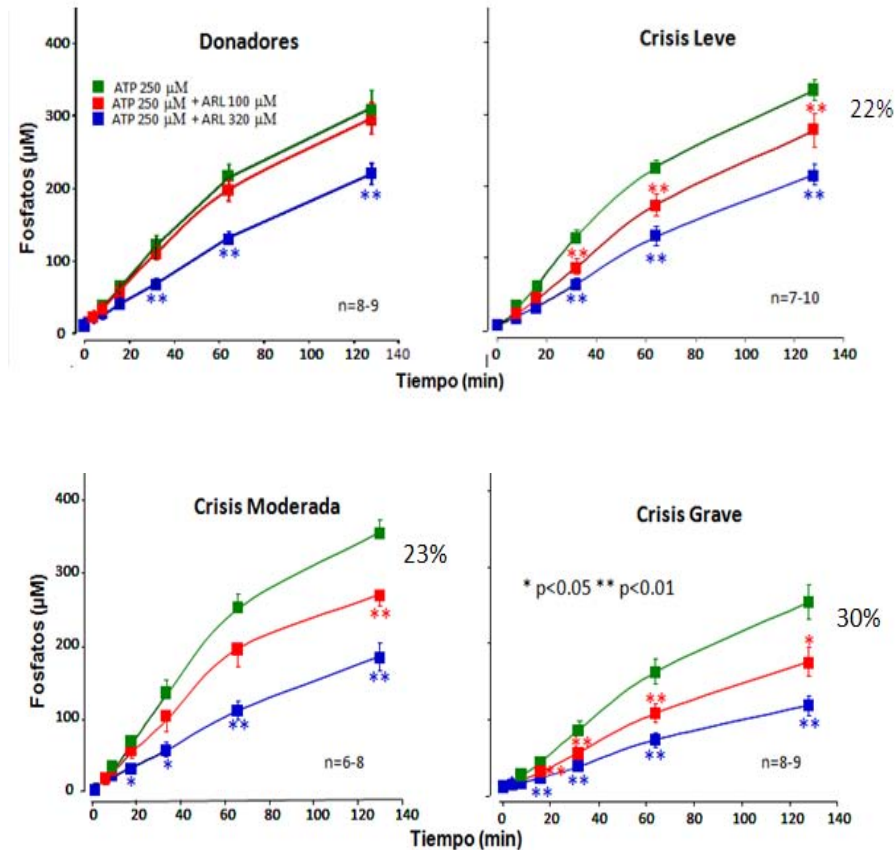


Figura 2.- Medición de la actividad enzimática de las ectonucleotidasas de sujetos sanos y pacientes con crisis asmática leve en cotratamiento con el inhibidor no específico ARL. La actividad fue determinada en leucocitos mediante la producción de fosfatos en la presencia de ATP 250 μM y dosis de 100 y 320 μM de ARL. * p<0.05** p<0.01.

Una vez delimitado que existía una menor actividad de ectonucleotidasa en las células polimorfonucleares y mononucleares en pacientes con crisis grave, se analizó si la disminución de la actividad enzimática era debida a un cambio en la expresión de mRNA para las diferentes ectonucleotidasas. Para esto se analizó mediante PCR en tiempo real la expresión de ENTPDasa1, 2, 3 y 8 así como de ENPP1, 2 y 3.

Podemos observar que las enzimas ENTPDasa 1 y 2 así como las ENPP1, 2 y 3 son expresadas en células polimorfonucleares de donadores sanos así como de pacientes con

crisis asmática, independientemente del nivel de gravedad (**Figura 3, 4 y 5**); hecho que no sucede en el caso de la ENTPDasa 3 y 8, que no se expresan en estas células (**Figura 6**).

Al analizar la expresión de las enzimas podemos observar que en el caso de ENTPDasa 1 y 2 así como ENPP2 la presencia del mRNA para estas enzimas se mantiene constante en los sujetos sanos y en las diferentes crisis asmáticas (**Figura 4 y 5**). Cuando analizamos la expresión de ENPP3 podemos observar que hay una tendencia a la alza en la expresión en la crisis asmática leve, hecho que no se presenta en el caso de las crisis asmáticas moderada y grave (**Figura 4**). Finalmente, cuando observamos la expresión de ENPP1 observamos que su expresión se mantiene cuando comparamos a los donadores sanos y a los de crisis asmática leve y moderada, pero su expresión disminuye significativamente en el caso de las crisis asmáticas graves (**Figura 3**).

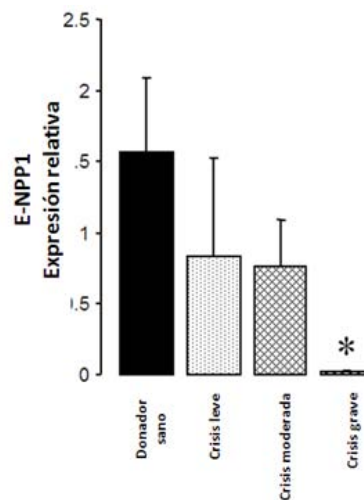


Figura 3.- Expresión del mRNA para ENPP1 en sujetos sanos y pacientes con crisis asmática de diferentes niveles de gravedad en células polimorfonucleares. Las barras representan muestras de pacientes independientes que fueron normalizadas empleando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Las líneas representan la desviación estándar. * $p < 0.01$

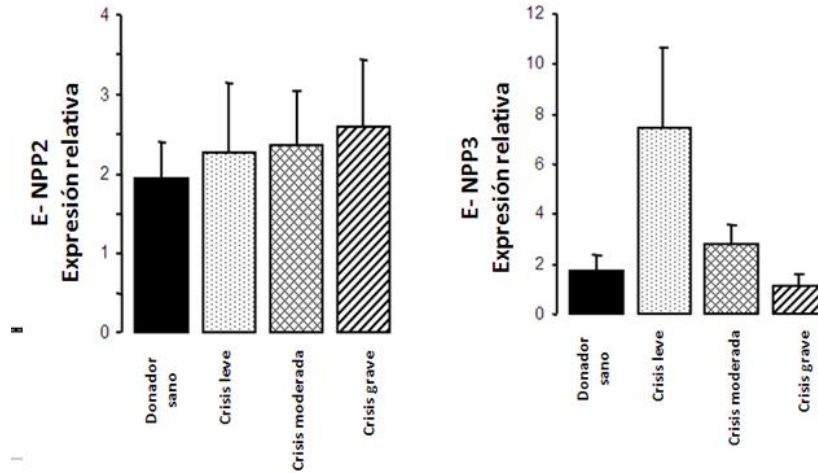


Figura 4.- Expresión del mRNA para ENPP2 y 3 en sujetos sanos y pacientes con crisis asmática de diferentes niveles de gravedad en células polimorfonucleares. Las barras representan muestras de pacientes independientes que fueron normalizadas empleando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Las líneas representan la desviación estándar.

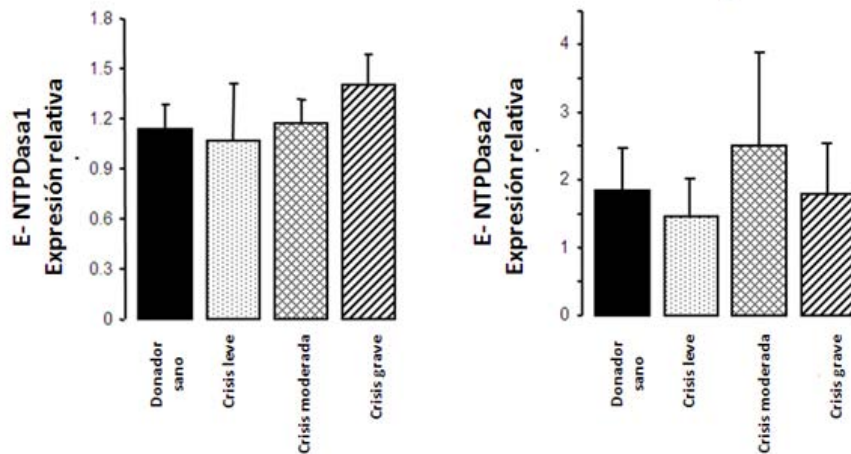


Figura 5.- Expresión del mRNA para ENTPDase 1 y 2 en sujetos sanos y pacientes con crisis asmática de diferentes niveles de gravedad en células polimorfonucleares. Las barras representan muestras de pacientes independientes que fueron normalizadas empleando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Las líneas representan la desviación estándar.

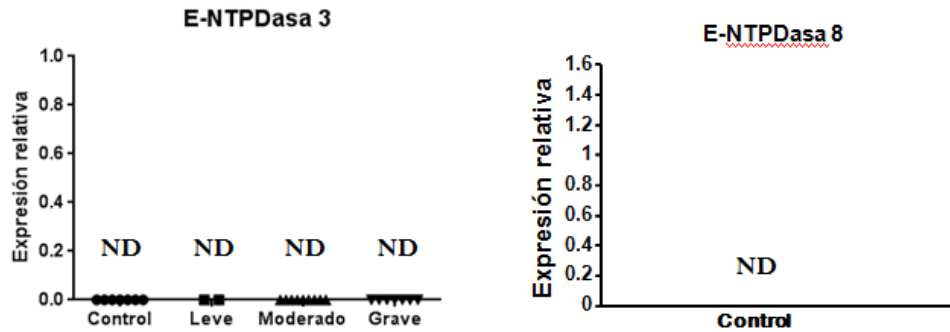


Figura 6.- Expresión del mRNA para ENTPDasa 3 y 8 en sujetos sanos y pacientes con crisis asmática de diferentes niveles de gravedad en células polimorfonucleares--ND= no detectada

Posterior a la determinación de la presencia del mRNA de las ectonucleotidasas mediante PCR en tiempo real, el siguiente punto a analizar fue la presencia de las proteínas mediante inmunofluorescencia en las células polimorfonucleares. Debido a que estas enzimas son membranales esperamos observar la marca en la periferia celular mientras que el núcleo teñido con TOTO-3 iodide se observó multilobulado y central. En la inmunodetección podemos observar que ENTPDasa1 y 2 así como ENPP 2 se expresan en las células polimorfonucleares de donadores sanos y de pacientes con crisis asmática de diferentes niveles de gravedad en proporciones similares (Figura 7, 8 y 10).

En el caso de ENPP1 podemos observar un evidente decremento de la expresión de esta enzima mientras aumenta la gravedad de la crisis asmática, haciéndose casi imperceptible en las muestras de pacientes con crisis asmática grave (Figura 9). Al analizar la expresión de ENPP3 observamos que se en el caso de los donadores la inmunotinción se observa débil, pero cuando analizamos los resultados hay un tendencia de aumento de la expresión de estas enzimas en el caso de la crisis asmática leve, que se mantiene en la crisis moderada, mientras que en el caso de los pacientes con crisis asmática grave el marcaje es similar al de donadores sanos (Figura 11).

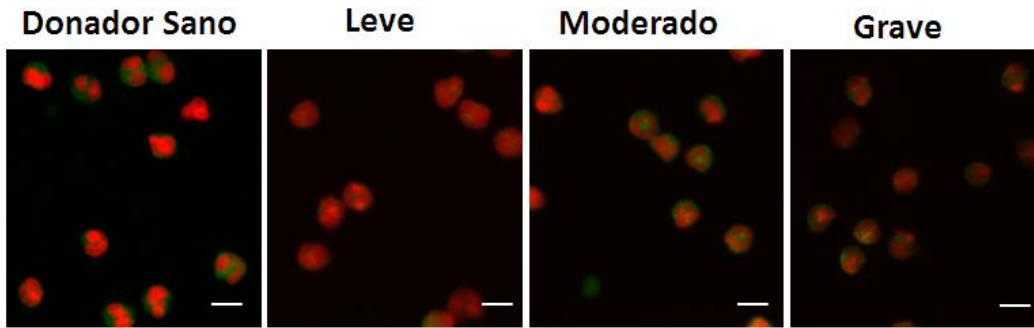


Figura 7.- Inmunofluorescencia para ENTPDasa1 (verde) en células polimorfonucleares de pacientes asmáticos de diferente nivel de gravedad y donadores sanos. Los núcleos se tiñeron con TOTO-3 iodide (rojo). La barra representa 10 µm.

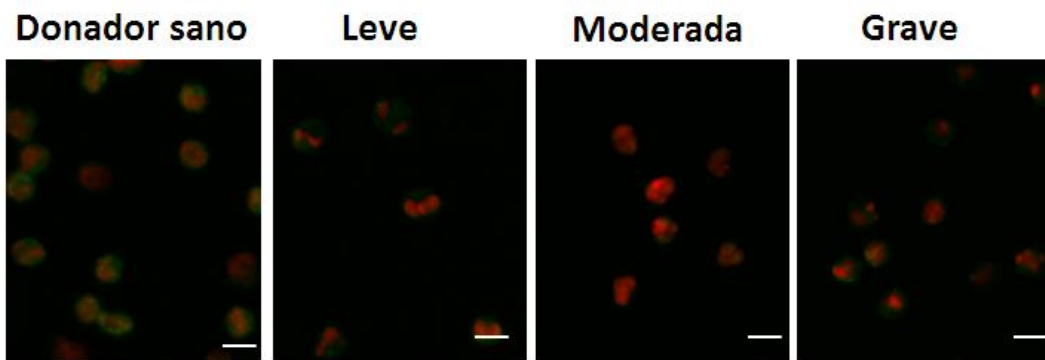


Figura 8.- Inmunofluorescencia para ENTPDasa 2 (verde) en células polimorfonucleares de sujetos sanos y de pacientes con crisis asmática de diferentes niveles de gravedad. Los núcleos se tiñeron con TOTO-3 iodide (rojo). La barra representa 10µm.

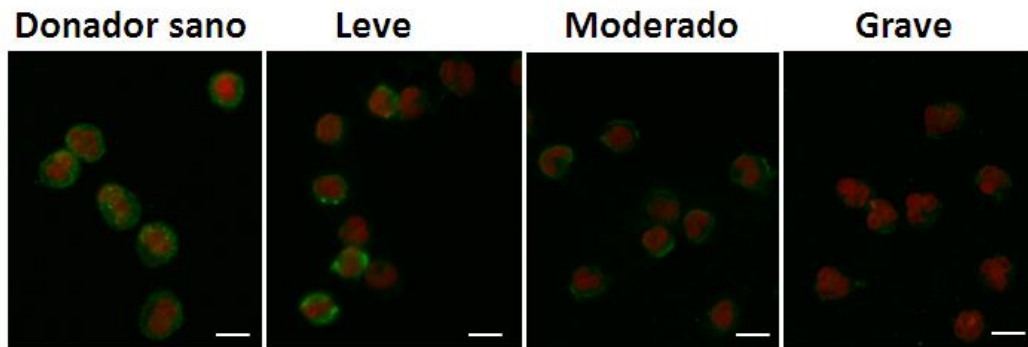


Figura 9.- Inmunofluorescencia para ENPP1 (verde) en células polimorfonucleares de individuos sanos y pacientes con diferentes niveles de gravedad de crisis asmática; los núcleos se tiñeron con TOTO-3 iodide (rojo). La barra representa 10µm.

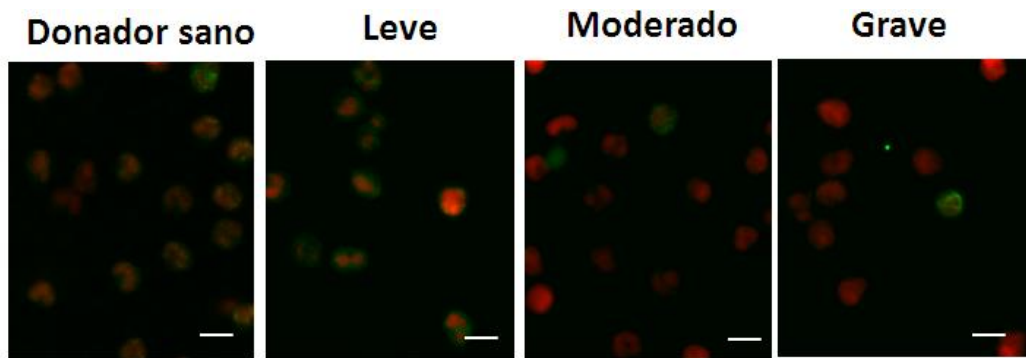


Figura 10.- Inmunolocalización para ENPP2 (verde) en células polimorfonucleares de sujetos sanos y pacientes con diferentes niveles de gravedad de crisis asmática; los núcleos se tiñeron con TOTO-3 iodide (rojo). La barra representa 10 μ m.

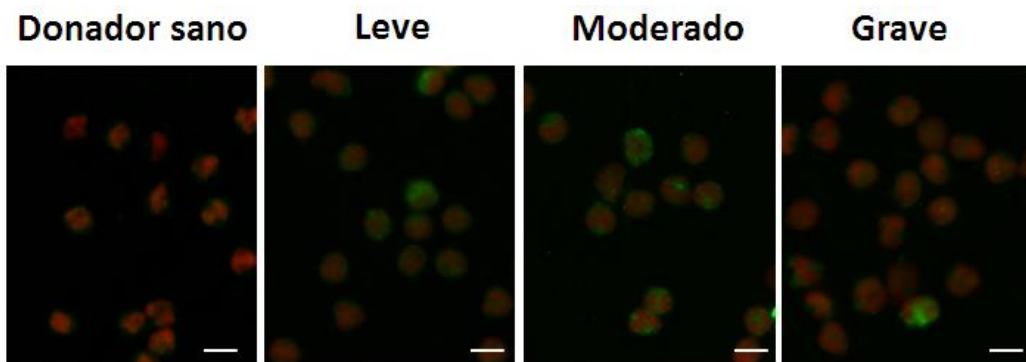


Figura 11.- Inmunofluorescencia para ENPP3 (verde) en células polimorfonucleares de donadores sanos y de pacientes asmáticos con crisis de diferentes niveles de gravedad. Los núcleos se tiñeron con TOTO-3 iodide (rojo). La barra representa 10 μ m.

Discusión

El asma es una patología de las vías aéreas caracterizada por la inflamación crónica; en esta se ha descrito que el ATP y sus metabolitos participan en los procesos de secreción de moco en la vía aérea así como en la hiperreactividad bronquial y broncoespasmo, eventos centrales en la fisiopatología de la enfermedad [217, 218]. Se ha reportado que las células polimorfonucleares pueden tener un rol central dentro de la etiopatogenia de la enfermedad [225-227]; sin embargo, aún no se ha descrito el papel que tienen las ectonucleotidasas –enzimas que degradan el ATP– en la crisis asmática así como en su expresión en PMN, células clave en esta patología.

Las evidencias presentadas en este trabajo sugieren que la actividad de las ectonucleotidasas es menor dependiendo de la crisis asmática; esto secundario a expresión diferencial de las ectonucleotidasas –mRNA y proteínas- dependiendo de la gravedad de la crisis asmática. Los resultados muestran que los leucocitos de los pacientes asmáticos que presentan una crisis grave despliegan una menor actividad de las ectonucleotidasas, hecho observado por la generación de fosfatos en las células obtenidas de pacientes con este nivel de gravedad. En cambio, en el caso de las muestras provenientes de los pacientes que presentan una crisis asmática tipo leve o moderada se observa una actividad similar a los donadores sanos. Los resultados presentados concuerdan con evidencias previamente reportadas, en las cuales se ha descrito la presencia de niveles elevados de ATP en lavados broncoalveolares de pacientes asmáticos [223] y donde se ha asociado los niveles de esta biomolécula a la inflamación y la hiperreactividad bronquial en un modelo de asma [34, 218].

Para determinar si la generación de fosfatos es secundaria a la actividad de las ectonucleotidasas se realizó una cinética de producción de fosfatos empleando ARL 67156, inhibidor de la actividad de la ENTPDasa 1 y 3 así como ENPP1[224]. Los resultados muestran una disminución de la actividad de las ectonucleotidasas en los pacientes con crisis asmática a desde concentraciones de ARL 100 μ M, independientemente de su gravedad, hecho que no se presenta en el caso de los donadores sanos. Además se observa que la disminución de la actividad observada ronda entre el 20, 22 y 30% con 100 μ M de ARL en las muestras de pacientes con crisis leve, moderada o grave respectivamente, situación que no se presenta en el caso de los sujetos sanos. Este resultado sugiere que los pacientes sanos presentan una mayor actividad de otros miembros de la familia de las ectonucleotidasas que permiten mantener la actividad enzimática a pesar de que ENTPDasa 1 y 3, así como ENPP1 se encuentran inhibidas.

Para determinar si los cambios en la actividad enzimática son debidos a diferencias a la expresión de los diferentes miembros de la familia de las ectonucleotidasas entre los pacientes asmáticos y los sujetos sanos, se procedió a realizar la determinación de la expresión de los mRNA de las enzimas mediante PCR en tiempo real. Los datos presentados demuestran que las enzimas ENTPDasa 1 y 2, así como ENPP1, 2 y 3 son expresadas tanto en pacientes asmáticos como en sujetos sanos; sin embargo no se observó la expresión de ENTPDasa 3 y 8 en ningún grupo. En el caso de la ENTPDasa 1 y 2 presentan patrones de expresión similar, independientemente del grupo en el que se encuentren. Sin embargo, para ENPP1 se observó una disminución de la expresión en los

sujetos con crisis asmática grave, hecho que no se observó para ninguna de las demás enzimas o tipos de crisis asmática. Estos resultados sugieren que ENPP1 podría ser central dentro del metabolismo del ATP en el caso de las crisis asmáticas graves; este hallazgo parece soportar los resultados reportados en la literatura, donde la disminución de la expresión de otra ectonucleotidasa, la ENTPDasa 1, puede estar asociada al desarrollo de la inflamación de la vía aérea [92]. Adicional a esto, se observó que hay una tendencia al alza de la expresión de ENPP3 en los pacientes con crisis leve, sin embargo, hacen falta muestras de pacientes con este diagnóstico para corroborar estos datos; este hecho requiere mayor estudio debido a que se ha descrito que en el caso de los ratones knockout para ENPP3 hay un aumento en la concentraciones de células cebadas en la sangre – células involucradas en la crisis asmática- y adicional a esto, un incremento en las concentraciones de ATP en el plasma [94], por lo que no sólo la ENPP1 podría estar involucrada en la fisiopatología del asma, sin embargo hace falta ahondar en este hallazgo.

Una vez identificados los mRNAs de las enzimas expresadas en las células polimorfonucleares se procedió a determinar la presencia de la proteína para estas mediante inmunofluorescencia. Al analizar los datos obtenidos por inmunofluorescencia podemos observar que hay una presencia débil de ENTPDasa 1 y 2, así como de ENPP2, hecho que corrobora con los datos observados en PCR en tiempo real. En el caso de ENPP1 podemos observar que hay una disminución de la expresión de la proteína en el caso de las crisis asmáticas graves, hecho que coincide con lo observado mediante PCR en tiempo real en este tipo de crisis; mientras que en el caso de ENPP3 los resultados apoyan la tendencia observada en PCR en el caso de las crisis asmáticas leves. En ambos casos estos datos sugieren que existe la expresión diferencial de ENPP1 y ENPP3 en las crisis asmáticas leve y grave.

Conclusiones

- Las ectonucleotidasas participan en la degradación de ATP exógeno en leucocitos sanguíneos de sujetos sanos y pacientes asmáticos
- La ectonucleotidasa ENPP1 se expresa en menor concentración en células polimorfonucleares en sujetos con crisis asmática grave.

----- **Discusión Final** -----

ATP como regulador clave de la respuesta proinflamatoria

El ATP es usualmente liberado al medio extracelular al presentarse daño tisular, necrosis, apoptosis y actúa como una molécula señal de daño o DAMP. Este nucleótido es reconocido por las células del sistema inmune a través de los receptores purinérgicos y participa como un regulador clave de múltiples procesos de la respuesta proinflamatoria, incluyendo la quimiotaxis, la degranulación y el estallido respiratorio en el caso de los neutrófilos, así como la citotoxicidad celular y la diferenciación hacia Th17 en el caso de linfocitos T.

Adicional a la exposición del medio intracelular en caso de muerte celular se ha descrito la elevación del ATP en el medio extracelular en asociación a cascadas de señalización; por ejemplo, se ha reportado en la literatura la liberación de ATP en neutrófilos en respuesta a la activación del receptor para FMLP, una molécula asociada a patógenos [83]. Ese trabajo de la literatura sienta las bases para sugerir la existencia de otras vías de señalización involucradas en la liberación de ATP, pudiendo emplear cascadas río abajo compartidas con otras moléculas de señalización. En el trabajo de tesis aquí presentado sustentamos la idea anterior y proponemos que el ATP u otros nucleótidos no solamente son liberados por daño tisular o por exposición a PAMPs, si no que la evidencia aquí mostrada sugiere que adicional a este proceso se presenta liberación mediada por la activación de los receptores purinérgicos P2.

Los resultados aquí presentados se encuentran en concordancia con lo descrito en la literatura, donde se ha descrito que la activación del receptor P2X7 induce la liberación de ATP en los linfocitos T mediado por la coactivación de los canales de panexinas [158]. Sin embargo, los resultados aquí presentados sugieren que este efecto no se produce solamente en activación a los receptores P2X, si no que la aproximación farmacológica empleada sugiere que la liberación de ATP puede ser mediada en parte por los receptores P2Y2. Este resultado adquiere un significado biológico importante debido a que una parte importante de la acción proinflamatoria del ATP en neutrófilos, macrófagos y eosinófilos es mediada por la activación de este receptor.

Los datos aquí mostrados sugieren que en el sistema inmune en presencia de ATP no solo se activan las acciones proinflamatorio, si no que esta molécula forma parte de un sistema

de retroalimentación positiva que induce una liberación de este nucleótido al realizar la activación de sus propios receptores, sobre todo los receptores purinérgicos P2Y. Esto replantea el papel que tiene el ATP dentro de la regulación del sistema inmune, entre los procesos proinflamatorios y antiinflamatorios, y lo reposiciona como un elemento clave en el desencadenamiento de la respuesta proinflamatoria y sus *loops* tanto de retroalimentación positiva y negativa.

Adicional a esto presentamos evidencias que sugieren que el mecanismo de liberación de ATP es mediante conexinas. Dentro de las células del sistema inmune, la conexina 43 participa de manera relevante desde el proceso de hematopoyesis y se ha descrito la liberación de ATP en neutrófilos [150]. Se ha reportado que en ratón heterocigoto para esta proteína -donde se observa una disminución de la expresión de conexina 43- los neutrófilos no realizan los procesos de migración e infiltración de manera adecuada en un modelo de daño pulmonar [228] lo que sugiere que estas células no realizan los eventos proinflamatorios de manera normal. Este hecho resulta relevante, porque la mayor parte de las citocinas y quimiocinas involucradas en estos procesos son liberados por exocitosis, mientras que el ATP requiere a conexinas como su mecanismo de liberación.

En conjunto, los resultados presentados en la primera parte de la tesis así como los reportes de la literatura sugieren que el ATP no sólo desencadena eventos claves dentro de la respuesta inflamatoria, sino que también podría ser una molécula requerida para su mantenimiento, liberando más nucleótidos al medio extracelular mediante la activación de receptores purinérgicos. Adicional a esto, se sugiere que el ATP pueda involucrarse como una molécula de acciones pleiotrópicas dentro del sistema inmune, debido a que también participa como interconexión con otras vías de reconocimiento de moléculas patógenas por ejemplo con LPS o FMLP.

En conclusión los resultados aquí presentados sugieren que la activación de los receptores purinérgicos y la liberación de ATP es un proceso central dentro de la respuesta inmune, desde el proceso de inducción, mantenimiento y amplificación de la respuesta inmune proinflamatoria.

Ectonucleotidasas como enzimas con actividad inmunosupresora

Debido a su papel central dentro de la respuesta proinflamatoria los niveles de ATP deben ser regulados ampliamente. Las células del sistema inmune expresan ectonucleotidasas en

la membrana plasmática, sobre todo ENPP1 y ENTPDasa1, encargadas de biotransformar el ATP hacia AMP, incapaz de desatar cascadas de señalización a través de receptores purinérgicos [29].

Las células del sistema inmune expresan estas enzimas en su membrana celular, sin embargo, debido a la importancia en la inmunomodulación por ATP estas proteínas se expresan de manera diferencial en cada uno de los contextos inmunológicos. Un claro ejemplo de esto ocurre en el caso de la activación de los linfocitos en la respuesta proinflamatoria, donde ocurre la inducción de la expresión de ENTPDasa1 al realizar la activación cruzada del TCR con el MHC de la molécula presentadora de antígeno[229]. Adicional a esto se ha descrito que durante la diferenciación de las células T reguladoras, elementos celulares encargados de la inmunomodulación de manera negativa, se induce la expresión de la ectonucleotidasa ENTPDasa1 [116]; anexo a esto, se ha descrito que se induce la expresión de ENPP3 durante la presentación de antígenos en células cebadas y mastocitos [94]. Ambos resultados sugieren que parte de la acción de estas células puede estar mediada por el metabolismo del ATP. Estos datos apuntan que los niveles de estas ectonucleotidasas son claves para la retroalimentación negativa de la señal inflamatoria, en el proceso de eliminación de los desencadenantes y mediadores inmunitarios.

En este trabajo sugerimos la relevancia las ectonucleotidasas durante un proceso proinflamatorio con impacto en salud pública: el asma. En este caso presentamos evidencia de que en los pacientes con crisis asmática grave se presenta una disminución de la expresión de la ectonucleotidasa ENPP1, lo que apunta que estas enzimas puedan ser relevantes dentro del proceso inflamatorio. Estos resultados sustentan los datos presentados en la literatura, donde se observa que en pacientes asmáticos se presenta una elevación de ATP en los lavados broncoalveolares, por lo que la disminución de estas enzimas podría exacerbar el proceso proinflamatorio en los pacientes asmáticos.

Adicional a la disminución de ENPP1 se observa una tendencia a la disminución en el caso de ENPP3, enzima filogenética y estructuralmente similar a ENPP1 [201], esta disminución en la expresión resulta interesante debido a que ambas enzimas tienen una alta afinidad por ATP sobre otros nucleótidos y lo biotransforman en AMP. Este resultado apoya descripciones en la literatura que asocian a ENPP3 con inflamación crónica, se ha descrito que en el caso de los ratones knockout para ENPP3 hay un aumento en la concentraciones de células cebadas en la sangre – células involucradas en la crisis asmática- y adicional a esto, un incremento en las concentraciones de ATP en el plasma [94]. Posteriormente se observó que en un estímulo intradérmico hay una elevación de las concentraciones de

células eosinófilos, basófilos y neutrófilos, encargados de la inflamación crónica durante eventos de hipersensibilidad y también participan en la fisiopatología del asma. Los resultados presentados en este trabajo y reportados por la literatura sugieren que ENPP3 podría actuar como regulador negativo de los eventos de hipersensibilidad, sin embargo, hace falta un mayor número de muestras para corroborar esta observación en el caso de los pacientes asmáticos.

En conclusión, los resultados aquí mostrados así como las evidencias presentes en la literatura sostienen la idea de que la regulación de la señal proinflamatoria mediada por ectonucleotidasas puede ser clave dentro del proceso de salud-enfermedad humana.

El ATP como blanco terapéutico

Los resultados aquí presentados sugieren un papel central de los nucleótidos extracelulares como el ATP en la retroalimentación positiva de la respuesta proinflamatoria, así como el papel fundamental que tienen las ectonucleotidasas dentro del proceso fisiológico que mantiene a raya los efectos deletéreos del sistema inmune sobre otros tejidos. Ambas vías participan en la interconexión de células, órganos, tejidos, moléculas que conforman el sistema inmune, siendo el ATP clave dentro de los sistemas de retroalimentación positiva y negativa de estos. Ambos resultados adquieren relevancia clínica debido a la importancia de la respuesta inmune dentro de la salud humana.

La inflamación aguda y sobre todo la crónica, está asociada con patología de elevadas tasas de morbilidad que representan a un alto costo económico y social [18]. Entre las enfermedades asociadas a procesos exacerbados de la respuesta inmune encontramos al asma [12], la artritis reumatoidea [230], inflamación crónica intestinal [231] así como anafilaxia durante infección bacteriana viral severa [232], daño por reperfusión en caso de infarto al miocardio [233] y rechazo posterior a trasplante de órganos [234]. Finalmente, estados proinflamatorios crónicos son frecuentes en sujetos obesos [235], pacientes diabéticos [236] y con fertilidad disminuida [237].

A pesar del papel relevante que tiene el ATP como modulador central de la respuesta inmune, se observaron diferencias en la expresión de ENPP1 solamente en las células polimorfonucleares en los sujetos asmáticos con crisis grave. Esto resulta interesante debido a que fisiopatológicamente los sujetos asmáticos graves son distintos a los leves y moderados, lo que ha llevado a comenzar a separar a los sujetos asmáticos en diferentes

endotipos, de acuerdo a su gravedad. En el caso de a de los asmáticos moderados y leves se observan mayoritariamente eosinófilos, en los asmáticos graves la infiltración es mayormente mediada por neutrófilos, que son los encargados del mayor daño celular, [166, 238, 239].

Los neutrófilos son elementos claves del sistema inmune implicados en diversas patologías inflamatorias, sobre todo infiltrados en enfermedad hepática por intoxicación farmacológica, hepatitis viral, entre otras [240], daño al miocardio por reperfusión posterior a la isquemia [241], daño intestinal durante enfermedad de Chron y la colitis ulcerativa [231], en patologías autoinmunes como artritis reumatoide [242] así como en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica [243] y el asma grave [244].

Evidencia experimental ha sugerido que el ATP participa de manera clave en estas patologías, donde la regulación de los niveles de este nucleótido en el medio extracelular es clave dentro del proceso fisiopatológico de procesos inflamatorios asociados a mucosas, sobre todo en el caso de la enfermedad de Chron y el asma grave; sin embargo, adicional a esto, cada vez se presenta más evidencia que la señalización por receptores purinérgicos está asociada con enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso y artritis reumatoide [245]. A pesar de esto, hace falta evidencia experimental que apoye la idea de que el ATP a través de los neutrófilos causa los efectos deletéreos en estas patologías.

Finalmente, debido a la relevancia que tiene el ATP en diversas patologías se ha generado de una molécula derivada de la ENTPDasa1 con fines terapéuticos. Se ha reportado el empleo de esta proteína recombinante como fármaco anticoagulante en un modelo de trombosis, sin los efectos secundarios de los fármacos empleados en la actualidad como antitrombóticos [246]. Este trabajo abre la posibilidad de que las ectonucleotidasas sean empleadas como parte del tratamiento de algunas patologías como enfermedad hepática, asma o artritis reumatoide, donde no solo se impida la reacción inflamatoria, si no que se evite los *loops* de retroalimentación positiva generadores de más daño tisular.

Perspectivas

1. Analizar si el proceso de exocitosis está involucrado en la liberación de ATP mediada por ATP en leucocitos sanguíneos de sujetos sanos.
2. Diseñar la importancia individual de los receptores P2Y₂, 4, 6 y 11 en la liberación de ATP en leucocitos periféricos de sujetos asmáticos.
3. Determinar el papel que tiene el ATP y los receptores purinérgicos en la liberación de ATP en cada uno de los subtipos de leucocitos sanguíneos en sujetos asmáticos.
4. Reclutar pacientes con crisis asmática leve para verificar el aumento de la expresión de ENPP3 en leucocitos sanguíneos con el fin de verificar si esta enzima está involucrada con mecanismos compensatorios.
5. Analizar la expresión de ENPP1 por subtipo histológico de leucocitos sanguíneos, tanto en células polimorfonucleares, con el fin de determinar si hay diferencia entre neutrófilos y eosinófilos.
6. Determinar el papel que tiene la activación de los receptores P2X en la liberación de ATP a concentraciones elevadas de este nucleótido en leucocitos sanguíneos de pacientes asmáticos, debido a su activación a altas concentraciones de ATP.
7. Determinar si la expresión diferencial de ectonucleotidasas entre pacientes asmáticos y sujetos sanos es mediada por un proceso agudo o es un fenómeno intrínseco al paciente asmático.

----- Conclusión General -----

Los resultados aquí presentados sugieren que la activación de los receptores purinérgicos y la liberación de ATP es un proceso central dentro de la respuesta inmune, donde participan desde la inducción, mantenimiento y amplificación de la respuesta inmune; mientras que, por el otro lado, las ectonucleotidasas participan en el proceso de eliminación de esta molécula con el fin regular de manera negativa la reacción inmune. Ambos procesos son claves para la homeostasis del organismo, por lo que un desbalance en este está asociado a la aparición de patologías donde la reacción proinflamatoria es central, así como la exacerbación de las ya presentes.

Conclusiones puntuales

- Los receptores P2Y_{2, 4, 6} Y P_{2Y11} participan en el proceso de liberación de ATP mediada por ATP en células mononucleares y polimorfonucleares de sujetos sanos.
- La liberación de ATP mediada por la activación de los receptores P2Y es dependiente de hemicanales de conexinas en leucocitos sanguíneos circulantes.
- Los receptores P1 no participan en la liberación de ATP inducida por ATP en células mononucleares y polimorfonucleares de sujetos sanos.
- Los receptores P2X no participan en la liberación de ATP en leucocitos sanguíneos de sujetos sanos.
- Las ectonucleotidasas participan en la degradación de ATP exógeno en leucocitos sanguíneos de sujetos sanos y pacientes asmáticos
- La ectonucleotidasa ENPP1 se expresa en menor concentración en células polimorfonucleares en sujetos con crisis asmática grave.

Bibliografía

1. Medzhitov, R., *Inflammation 2010: new adventures of an old flame*. Cell, 2010. **140**(6): p. 771-6.
2. Hoebe, K., E. Janssen, and B. Beutler, *The interface between innate and adaptive immunity*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 971-4.
3. Holgate, S.T., *Innate and adaptive immune responses in asthma*. Nat Med, 2012. **18**(5): p. 673-83.
4. Holtzman, M.J., et al., *The role of airway epithelial cells and innate immune cells in chronic respiratory disease*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(10): p. 686-98.
5. Whitsett, J.A. and T. Alenghat, *Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity*. Nat Immunol, 2015. **16**(1): p. 27-35.
6. Durrant, D.M. and D.W. Metzger, *Emerging roles of T helper subsets in the pathogenesis of asthma*. Immunol Invest, 2010. **39**(4-5): p. 526-49.
7. Serhan, C.N. and J. Savill, *Resolution of inflammation: the beginning programs the end*. Nat Immunol, 2005. **6**(12): p. 1191-7.
8. Button, B., et al., *Mechanosensitive ATP release maintains proper mucus hydration of airways*. Sci Signal, 2013. **6**(279): p. ra46.
9. Davis, C.W. and E. Lazarowski, *Coupling of airway ciliary activity and mucin secretion to mechanical stresses by purinergic signaling*. Respir Physiol Neurobiol, 2008. **163**(1-3): p. 208-13.
10. Lambrecht, B.N. and H. Hammad, *The airway epithelium in asthma*. Nat Med, 2012. **18**(5): p. 684-92.
11. Hammad, H. and B.N. Lambrecht, *Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(3): p. 193-204.
12. Lambrecht, B.N. and H. Hammad, *Asthma: the importance of dysregulated barrier immunity*. Eur J Immunol, 2013. **43**(12): p. 3125-37.
13. Robb, C.T., et al., *Key mechanisms governing resolution of lung inflammation*. Semin Immunopathol, 2016. **38**(4): p. 425-48.
14. Morris, G.P. and P.M. Allen, *How the TCR balances sensitivity and specificity for the recognition of self and pathogens*. Nat Immunol, 2012. **13**(2): p. 121-8.
15. Malissen, B., et al., *Integrative biology of T cell activation*. Nat Immunol, 2014. **15**(9): p. 790-7.
16. Carsetti, R., M.M. Rosado, and H. Wardmann, *Peripheral development of B cells in mouse and man*. Immunol Rev, 2004. **197**: p. 179-91.
17. Duan, W. and M. Croft, *Control of regulatory T cells and airway tolerance by lung macrophages and dendritic cells*. Ann Am Thorac Soc, 2014. **11 Suppl 5**: p. S306-13.
18. Cooper, G.S. and B.C. Stroehla, *The epidemiology of autoimmune diseases*. Autoimmun Rev, 2003. **2**(3): p. 119-25.
19. Fajt, M.L. and S.E. Wenzel, *Asthma phenotypes and the use of biologic medications in asthma and allergic disease: the next steps toward personalized care*. J Allergy Clin Immunol, 2015. **135**(2): p. 299-310; quiz 311.
20. Galli, S.J., M. Tsai, and A.M. Piliponsky, *The development of allergic inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 445-54.
21. Venereau, E., C. Ceriotti, and M.E. Bianchi, *DAMPs from Cell Death to New Life*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 422.
22. Geering, B., et al., *Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils*. Trends Immunol, 2013. **34**(8): p. 398-409.

23. Bonora, M., et al., *ATP synthesis and storage*. Purinergic Signal, 2012. **8**(3): p. 343-57.
24. Ho, T., et al., *Vesicular expression and release of ATP from dopaminergic neurons of the mouse retina and midbrain*. Front Cell Neurosci, 2015. **9**: p. 389.
25. Kowal, J.M., G.G. Yegutkin, and I. Novak, *ATP release, generation and hydrolysis in exocrine pancreatic duct cells*. Purinergic Signal, 2015. **11**(4): p. 533-50.
26. von Kugelgen, I. and K. Hoffmann, *Pharmacology and structure of P2Y receptors*. Neuropharmacology, 2016. **104**: p. 50-61.
27. North, R.A., *Molecular physiology of P2X receptors*. Physiol Rev, 2002. **82**(4): p. 1013-67.
28. Picher, M., *Mechanisms regulating airway nucleotides*. Subcell Biochem, 2011. **55**: p. 17-49.
29. Burnstock, G., et al., *Purinergic signaling in the airways*. Pharmacol Rev, 2012. **64**(4): p. 834-68.
30. la Sala, A., et al., *Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(3): p. 339-43.
31. Idzko, M., D. Ferrari, and H.K. Eltzschig, *Nucleotide signalling during inflammation*. Nature, 2014. **509**(7500): p. 310-7.
32. Alberto, A.V., et al., *Role of P2 Receptors as Modulators of Rat Eosinophil Recruitment in Allergic Inflammation*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0145392.
33. Ben Yebdri, F., et al., *Concomitant activation of P2Y(2) and P2Y(6) receptors on monocytes is required for TLR1/2-induced neutrophil migration by regulating IL-8 secretion*. Eur J Immunol, 2009. **39**(10): p. 2885-94.
34. Idzko, M., et al., *Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells*. Nat Med, 2007. **13**(8): p. 913-9.
35. Idzko, M., et al., *Stimulation of P2 purinergic receptors induces the release of eosinophil cationic protein and interleukin-8 from human eosinophils*. Br J Pharmacol, 2003. **138**(7): p. 1244-50.
36. Atarashi, K., et al., *ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation*. Nature, 2008. **455**(7214): p. 808-12.
37. Di Virgilio, F. and M. Vuerich, *Purinergic signaling in the immune system*. Auton Neurosci, 2015. **191**: p. 117-23.
38. Burnstock, G. and J.M. Boeynaems, *Purinergic signalling and immune cells*. Purinergic Signal, 2014. **10**(4): p. 529-64.
39. Lagerstrom, M.C. and H.B. Schioth, *Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(4): p. 339-57.
40. Jacobson, K.A., et al., *Nucleotides Acting at P2Y Receptors: Connecting Structure and Function*. Mol Pharmacol, 2015. **88**(2): p. 220-30.
41. Erb, L. and G.A. Weisman, *Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways*. Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal, 2012. **1**(6): p. 789-803.
42. *P2RY1 Gen.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5028>, Revisado noviembre del 2015.
43. *P2YR1 Proteína.* <http://www.uniprot.org/uniprot/P47900>, Revisado noviembre del 2015.
44. *P2RY2 Proteína.* <http://www.uniprot.org/uniprot/P41231>, Revisado noviembre del 2015.
45. *P2RY2 Gen.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5029>, Revisado noviembre del 2015.
46. *P2RY4 Proteína.* <http://www.uniprot.org/uniprot/P51582>, Revisado noviembre del 2015.
47. *P2RY4 Gen.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5030>, Revisado noviembre del 2015.
48. *P2RY6 Proteína.* <http://www.uniprot.org/uniprot/Q15077>, Revisado noviembre del 2015.
49. *P2RY6 Gen.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5031>, Revisado noviembre del 2015.
50. *P2RY11 Proteína.* <http://www.uniprot.org/uniprot/Q96G91>, Revisado noviembre del 2015.
51. *P2RY11 Gen.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5032>, Revisado noviembre del 2015.

52. *P2RY12* Gen. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/64805>, Revisado noviembre del 2015.
53. *P2RY12* Proteína. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9H244>, Revisado noviembre del 2015.
54. *P2RY13* Gen. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/53829>, Revisado noviembre del 2015.
55. *P2RY13* Proteína. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9BPV8>, Revisado noviembre del 2015.
56. *P2RY14* Proteína. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q15391>, Revisado noviembre del 2015.
57. *P2RY14* Gen. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9934>, Revisado noviembre del 2015.
58. North, R.A., *P2X receptors*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2016. **371**(1700).
59. Samways, D.S., Z. Li, and T.M. Egan, *Principles and properties of ion flow in P2X receptors*. Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 6.
60. North, R.A. and A. Surprenant, *Pharmacology of cloned P2X receptors*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2000. **40**: p. 563-80.
61. *P2RX1* Proteína. <http://www.uniprot.org/uniprot/P51575>, Revisado noviembre del 2015.
62. *P2RX1* Gen. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5023>, Revisado noviembre del 2015.
63. *P2RX2* Proteína. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9UBL9>, Revisado noviembre del 2015.
64. *P2RX2* Gen. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/22953>, Revisado noviembre del 2015.
65. *P2RX3* Proteína. <http://www.uniprot.org/uniprot/P56373>, Revisado noviembre del 2015
66. *P2RX3* Gen. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5024>, Revisado noviembre del 2015.
67. *P2RX4* Proteína. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q99571>, Revisado noviembre del 2015.
68. *P2RX4* Gen. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5025>, Revisado noviembre del 2015.
69. *P2RX5* Gen. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5026>, Revisado noviembre del 2015.
70. *P2RX5* Proteína. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q93086>, Revisado noviembre del 2015.
71. *P2RX6* Proteína. <http://www.uniprot.org/uniprot/O15547>, Revisado noviembre del 2015.
72. *P2RX6* Gen. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9127>, Revisado noviembre del 2015.
73. *P2RX7* Gen. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5027>, Revisado noviembre del 2015.
74. *P2RX7* Proteína. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q99572>, Revisado noviembre del 2015.
75. Wojciech, P., *Capítulo 10: Tejido Sanguíneo*. Ross: Histología. Texto y Atlas. Correlación con biología molecular y celular. 2015: Lippincott Williams and Wilkins. Wolter Kluwer Health. 300-313.
76. Adamson, S.E. and N. Leitinger, *The role of pannexin1 in the induction and resolution of inflammation*. FEBS Lett, 2014. **588**(8): p. 1416-22.
77. Junger, W.G., *Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(3): p. 201-12.
78. Ruter, A. and U. Gunzer, *Differentiation of granulocytes in Pappenheim stained blood cell smears using standardized cytophotometric analysis*. Blut, 1984. **48**(5): p. 307-20.
79. Zhang, Y., J. Palmblad, and B.B. Fredholm, *Biphasic effect of ATP on neutrophil functions mediated by P2U and adenosine A2A receptors*. Biochem Pharmacol, 1996. **51**(7): p. 957-65.
80. Scrivens, M. and J.M. Dickenson, *Functional expression of the P2Y14 receptor in human neutrophils*. Eur J Pharmacol, 2006. **543**(1-3): p. 166-73.
81. Vaughan, K.R., et al., *Inhibition of neutrophil apoptosis by ATP is mediated by the P2Y11 receptor*. J Immunol, 2007. **179**(12): p. 8544-53.
82. Suh, B.C., et al., *P2X7 nucleotide receptor mediation of membrane pore formation and superoxide generation in human promyelocytes and neutrophils*. J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6754-63.
83. Chen, Y., et al., *Purinergic signaling: a fundamental mechanism in neutrophil activation*. Sci Signal, 2010. **3**(125): p. ra45.

84. Ayata, C.K., et al., *Purinergic P2Y(2) receptors promote neutrophil infiltration and hepatocyte death in mice with acute liver injury*. *Gastroenterology*, 2012. **143**(6): p. 1620-1629 e4.
85. Meshki, J., et al., *Molecular mechanism of nucleotide-induced primary granule release in human neutrophils: role for the P2Y2 receptor*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **286**(2): p. C264-71.
86. Zalavary, S., et al., *Platelets enhance Fc(gamma) receptor-mediated phagocytosis and respiratory burst in neutrophils: the role of purinergic modulation and actin polymerization*. *J Leukoc Biol*, 1996. **60**(1): p. 58-68.
87. Onnheim, K., et al., *A novel receptor cross-talk between the ATP receptor P2Y2 and formyl peptide receptors reactivates desensitized neutrophils to produce superoxide*. *Exp Cell Res*, 2014. **323**(1): p. 209-17.
88. Kukulski, F., et al., *NTPDase1 controls IL-8 production by human neutrophils*. *J Immunol*, 2011. **187**(2): p. 644-53.
89. Mohanty, J.G., et al., *Effects of purine and pyrimidine nucleotides on intracellular Ca²⁺ in human eosinophils: activation of purinergic P2Y receptors*. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. **107**(5): p. 849-55.
90. Ferrari, D., et al., *P2 purinergic receptors of human eosinophils: characterization and coupling to oxygen radical production*. *FEBS Lett*, 2000. **486**(3): p. 217-24.
91. Vanderstocken, G., et al., *P2Y2 receptor regulates VCAM-1 membrane and soluble forms and eosinophil accumulation during lung inflammation*. *J Immunol*, 2010. **185**(6): p. 3702-7.
92. Li, P., et al., *Apyrase protects against allergic airway inflammation by decreasing the chemotactic migration of dendritic cells in mice*. *Int J Mol Med*, 2014. **34**(1): p. 269-75.
93. Kobayashi, T., et al., *ATP drives eosinophil effector responses through P2 purinergic receptors*. *Allergol Int*, 2015. **64 Suppl**: p. S30-6.
94. Tsai, S.H., et al., *The ectoenzyme E-NPP3 negatively regulates ATP-dependent chronic allergic responses by basophils and mast cells*. *Immunity*, 2015. **42**(2): p. 279-93.
95. Zhou, Y., H.W. Deng, and H. Shen, *Circulating monocytes: an appropriate model for bone-related study*. *Osteoporos Int*, 2015. **26**(11): p. 2561-72.
96. Myrtek, D., et al., *Activation of human alveolar macrophages via P2 receptors: coupling to intracellular Ca²⁺ increases and cytokine secretion*. *J Immunol*, 2008. **181**(3): p. 2181-8.
97. Ferrari, D., et al., *Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65*. *J Cell Biol*, 1997. **139**(7): p. 1635-43.
98. Brough, D., et al., *Ca²⁺ stores and Ca²⁺ entry differentially contribute to the release of IL-1 beta and IL-1 alpha from murine macrophages*. *J Immunol*, 2003. **170**(6): p. 3029-36.
99. Hasko, G., et al., *ATP suppression of interleukin-12 and tumour necrosis factor-alpha release from macrophages*. *Br J Pharmacol*, 2000. **129**(5): p. 909-14.
100. Guerra, A.N., et al., *Purinergic receptor regulation of LPS-induced signaling and pathophysiology*. *J Endotoxin Res*, 2003. **9**(4): p. 256-63.
101. Ghonime, M.G., et al., *Inflammasome priming by lipopolysaccharide is dependent upon ERK signaling and proteasome function*. *J Immunol*, 2014. **192**(8): p. 3881-8.
102. Marques-da-Silva, C., et al., *Purinergic receptor agonists modulate phagocytosis and clearance of apoptotic cells in macrophages*. *Immunobiology*, 2011. **216**(1-2): p. 1-11.
103. Berchtold, S., et al., *Human monocyte derived dendritic cells express functional P2X and P2Y receptors as well as ecto-nucleotidases*. *FEBS Lett*, 1999. **458**(3): p. 424-8.

104. Liu, Q.H., et al., *Expression and a role of functionally coupled P2Y receptors in human dendritic cells*. FEBS Lett, 1999. **445**(2-3): p. 402-8.
105. Ferrari, D., et al., *The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release*. FASEB J, 2000. **14**(15): p. 2466-76.
106. Idzko, M., et al., *Nucleotides induce chemotaxis and actin polymerization in immature but not mature human dendritic cells via activation of pertussis toxin-sensitive P2y receptors*. Blood, 2002. **100**(3): p. 925-32.
107. Wilkin, F., et al., *The P2Y11 receptor mediates the ATP-induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7172-7.
108. la Sala, A., et al., *Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 1611-7.
109. Wilkin, F., et al., *Extracellular adenine nucleotides modulate cytokine production by human monocyte-derived dendritic cells: dual effect on IL-12 and stimulation of IL-10*. Eur J Immunol, 2002. **32**(9): p. 2409-17.
110. Schnurr, M., et al., *ATP gradients inhibit the migratory capacity of specific human dendritic cell types: implications for P2Y11 receptor signaling*. Blood, 2003. **102**(2): p. 613-20.
111. Wolberg, G., et al., *Inhibition of lymphocyte-mediated cytotoxicity by adenosine analogs. Biochemical studies concerning mechanism of action*. Biochem Pharmacol, 1978. **27**(10): p. 1487-95.
112. Wiley, J.S., et al., *The P2Z-purinoceptor of human lymphocytes: actions of nucleotide agonists and irreversible inhibition by oxidized ATP*. Br J Pharmacol, 1994. **112**(3): p. 946-50.
113. Freedman, B.D., et al., *ATP-evoked Ca²⁺ transients and currents in murine thymocytes: possible role for P2X receptors in death by neglect*. Eur J Immunol, 1999. **29**(5): p. 1635-46.
114. Woehrl, T., et al., *Hypertonic stress regulates T cell function via pannexin-1 hemichannels and P2X receptors*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(6): p. 1181-9.
115. Yip, L., et al., *Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors*. FASEB J, 2009. **23**(6): p. 1685-93.
116. Borsellino, G., et al., *Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression*. Blood, 2007. **110**(4): p. 1225-32.
117. Jamieson, G.P., et al., *Extracellular ATP causes loss of L-selectin from human lymphocytes via occupancy of P2Z purinoceptors*. J Cell Physiol, 1996. **166**(3): p. 637-42.
118. Pupovac, A., et al., *Activation of the P2X7 receptor induces the rapid shedding of CD23 from human and murine B cells*. Immunol Cell Biol, 2015. **93**(1): p. 77-85.
119. Aswad, F., H. Kawamura, and G. Dennert, *High sensitivity of CD4+CD25+ regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors*. J Immunol, 2005. **175**(5): p. 3075-83.
120. Schenk, U., et al., *ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors*. Sci Signal, 2011. **4**(162): p. ra12.
121. Padeh, S., A. Cohen, and C.M. Roifman, *ATP-induced activation of human B lymphocytes via P2-purinoceptors*. J Immunol, 1991. **146**(5): p. 1626-32.
122. Scrivens, M. and J.M. Dickenson, *Functional expression of the P2Y14 receptor in murine T-lymphocytes*. Br J Pharmacol, 2005. **146**(3): p. 435-44.
123. Henriksson, T., *Inhibition of natural killing by adenosine ribonucleotides*. Immunol Lett, 1983. **7**(3): p. 171-6.
124. Schmidt, A., J.R. Ortaldo, and R.B. Herberman, *Inhibition of human natural killer cell reactivity by exogenous adenosine 5'-triphosphate*. J Immunol, 1984. **132**(1): p. 146-50.

125. Krishnaraj, R., *Negative modulation of human NK cell activity by purinoceptors. 1. Effect of exogenous adenosine triphosphate*. Cell Immunol, 1992. **141**(2): p. 306-22.
126. Krishnaraj, R., *Negative modulation of human NK cell activity by purinoceptors. 2. Age-associated, gender-specific partial loss of sensitivity to ATP*. Cell Immunol, 1992. **144**(1): p. 11-21.
127. Gorini, S., et al., *ATP secreted by endothelial cells blocks CX(3)CL 1-elicited natural killer cell chemotaxis and cytotoxicity via P2Y(1)(1) receptor activation*. Blood, 2010. **116**(22): p. 4492-500.
128. Bulanova, E., et al., *Extracellular ATP induces cytokine expression and apoptosis through P2X7 receptor in murine mast cells*. J Immunol, 2005. **174**(7): p. 3880-90.
129. Wareham, K., et al., *Functional evidence for the expression of P2X1, P2X4 and P2X7 receptors in human lung mast cells*. Br J Pharmacol, 2009. **157**(7): p. 1215-24.
130. Gao, Z.G., Y. Ding, and K.A. Jacobson, *UDP-glucose acting at P2Y14 receptors is a mediator of mast cell degranulation*. Biochem Pharmacol, 2010. **79**(6): p. 873-9.
131. Trautmann, A., *Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal"*. Sci Signal, 2009. **2**(56): p. pe6.
132. Cisneros-Mejorado, A., et al., *ATP signaling in brain: release, excitotoxicity and potential therapeutic targets*. Cell Mol Neurobiol, 2015. **35**(1): p. 1-6.
133. Loiola, E.C. and A.L. Ventura, *Release of ATP from avian Muller glia cells in culture*. Neurochem Int, 2011. **58**(3): p. 414-22.
134. Pangrsic, T., et al., *Exocytotic release of ATP from cultured astrocytes*. J Biol Chem, 2007. **282**(39): p. 28749-58.
135. Santos, P.F., et al., *Characterization of ATP release from cultures enriched in cholinergic amacrine-like neurons*. J Neurobiol, 1999. **41**(3): p. 340-8.
136. Imura, Y., et al., *Microglia release ATP by exocytosis*. Glia, 2013. **61**(8): p. 1320-30.
137. Sakaki, H., et al., *Autocrine regulation of macrophage activation via exocytosis of ATP and activation of P2Y11 receptor*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e59778.
138. Soon, A.S., J.W. Chua, and D.L. Becker, *Connexins in endothelial barrier function - novel therapeutic targets countering vascular hyperpermeability*. Thromb Haemost, 2016. **116**(5).
139. Wei, C.J., X. Xu, and C.W. Lo, *Connexins and cell signaling in development and disease*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 811-38.
140. Glass, A.M., E.G. Snyder, and S.M. Taffet, *Connexins and pannexins in the immune system and lymphatic organs*. Cell Mol Life Sci, 2015. **72**(15): p. 2899-910.
141. Sohl, G. and K. Willecke, *Gap junctions and the connexin protein family*. Cardiovasc Res, 2004. **62**(2): p. 228-32.
142. Kanczuga-Koda, L., *[Gap junctions and their role in physiology and pathology of the digestive tract]*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2004. **58**: p. 158-65.
143. De Vuyst, E., et al., *Intracellular calcium changes trigger connexin 32 hemichannel opening*. EMBO J, 2006. **25**(1): p. 34-44.
144. Solan, J.L. and P.D. Lampe, *Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1711**(2): p. 154-63.
145. Solan, J.L. and P.D. Lampe, *Key connexin 43 phosphorylation events regulate the gap junction life cycle*. J Membr Biol, 2007. **217**(1-3): p. 35-41.
146. Oh, S. and T.A. Bargiello, *Voltage regulation of connexin channel conductance*. Yonsei Med J, 2015. **56**(1): p. 1-15.
147. Retamal, M.A., et al., *Opening of connexin 43 hemichannels is increased by lowering intracellular redox potential*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(20): p. 8322-7.

148. Orellana, J.A., et al., *ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels*. J Neurochem, 2011. **118**(5): p. 826-40.
149. Nualart-Marti, A., et al., *Role of connexin 32 hemichannels in the release of ATP from peripheral nerves*. Glia, 2013. **61**(12): p. 1976-89.
150. Eltzschig, H.K., et al., *ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function*. Circ Res, 2006. **99**(10): p. 1100-8.
151. Lohman, A.W., M. Billaud, and B.E. Isakson, *Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall*. Cardiovasc Res, 2012. **95**(3): p. 269-80.
152. Penuela, S., R. Gehi, and D.W. Laird, *The biochemistry and function of pannexin channels*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1828**(1): p. 15-22.
153. Penuela, S., et al., *Diverse post-translational modifications of the pannexin family of channel-forming proteins*. Channels (Austin), 2014. **8**(2): p. 124-30.
154. Boyce, A.K., et al., *Pore positioning: current concepts in Pannexin channel trafficking*. Channels (Austin), 2014. **8**(2): p. 110-7.
155. Gulbransen, B.D., et al., *Activation of neuronal P2X7 receptor-pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis*. Nat Med, 2012. **18**(4): p. 600-4.
156. Hayoz, S., C. Jia, and C. Hegg, *Mechanisms of constitutive and ATP-evoked ATP release in neonatal mouse olfactory epithelium*. BMC Neurosci, 2012. **13**: p. 53.
157. Kim, J.E. and T.C. Kang, *The P2X7 receptor-pannexin-1 complex decreases muscarinic acetylcholine receptor-mediated seizure susceptibility in mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(5): p. 2037-47.
158. Schenk, U., et al., *Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels*. Sci Signal, 2008. **1**(39): p. ra6.
159. Waldo, G.L. and T.K. Harden, *Agonist binding and Gq-stimulating activities of the purified human P2Y1 receptor*. Mol Pharmacol, 2004. **65**(2): p. 426-36.
160. Robson, S.C., J. Sevigny, and H. Zimmermann, *The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance*. Purinergic Signal, 2006. **2**(2): p. 409-30.
161. Ecke, D., et al., *Opposite diastereoselective activation of P2Y1 and P2Y11 nucleotide receptors by adenosine 5'-O-(alpha-boranotriphosphate) analogues*. Br J Pharmacol, 2006. **149**(4): p. 416-23.
162. *Datos de la OMS para el asma*. <http://www.who.int/respiratory/asthma/es/>, Revisado junio del 2016.
163. *Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud*. . <http://ais.paho.org/classifications/Chapters/pdf/Volume3.pdf>, Revisado julio del 2016. **Décima revisión, 2008. OMS y OPS**.
164. *Global Initiative for Asthma*. http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_2014_Aug12.pdf, Revisado agosto del 2014.
165. Maslan, J. and J.W. Mims, *What is asthma? Pathophysiology, demographics, and health care costs*. Otolaryngol Clin North Am, 2014. **47**(1): p. 13-22.
166. Fahy, J.V., *Type 2 inflammation in asthma--present in most, absent in many*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(1): p. 57-65.
167. Holgate, S.T., *Pathogenesis of asthma*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**(6): p. 872-97.
168. Elias, J.A., et al., *New insights into the pathogenesis of asthma*. Journal of Clinical Investigation, 2003. **111**(3): p. 291-297.

169. Gauthier, M., A. Ray, and S.E. Wenzel, *Evolving Concepts of Asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2015. **192**(6): p. 660-8.
170. Balkissoon, R., *Asthma overview*. Prim Care, 2008. **35**(1): p. 41-60, vi.
171. Martinez, F.D. and D. Vercelli, *Asthma*. The Lancet, 2013. **382**(9901): p. 1360-1372.
172. Lai, C.K., et al., *Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: phase three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)*. Thorax, 2009. **64**(6): p. 476-83.
173. *Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)*. Eur Respir J, 1998. **12**(2): p. 315-35.
174. <Epidemiología del asma.pdf>.
175. Dirección General de Epidemiología. Anuario de Morbilidad 1984 -2015. Secretaría de Salud. <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>, Revisado julio del 2016.
176. *Mortalidad por asma en grupos etarios*. Dirección General de Información en Salud. Secretaría de Salud. . http://www.dgis.salud.gob.mx/contenidos/sinais/e_mortalidadgeneral.html, Revisado noviembre 2015.
177. Ober, C. and T.C. Yao, *The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective*. Immunol Rev, 2011. **242**(1): p. 10-30.
178. Torgerson, D.G., et al., *Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations*. Nat Genet, 2011. **43**(9): p. 887-92.
179. Moffatt, M.F., et al., *A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma*. N Engl J Med, 2010. **363**(13): p. 1211-21.
180. Brigham, E.P. and N.E. West, *Diagnosis of asthma: diagnostic testing*. Int Forum Allergy Rhinol, 2015. **5 Suppl 1**: p. S27-30.
181. Li, J.T. and E.J. O'Connell, *Clinical evaluation of asthma*. Ann Allergy Asthma Immunol, 1996. **76**(1): p. 1-13; quiz 13-5.
182. Lambrecht, B.N. and H. Hammad, *The immunology of asthma*. Nat Immunol, 2015. **16**(1): p. 45-56.
183. Raundhal, M., et al., *High IFN-gamma and low SLPI mark severe asthma in mice and humans*. J Clin Invest, 2015. **125**(8): p. 3037-50.
184. Yegutkin, G.G., *Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2014. **49**(6): p. 473-97.
185. *ENTPD1 Gen*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/953>, Revisado noviembre del 2015.
186. *ENTPD1 Proteína*. <http://www.uniprot.org/uniprot/P49961>, Revisado noviembre del 2015.
187. *ENTPD2 Gen*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/954>, Revisado noviembre del 2015.
188. *ENTPD2 Proteína*. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y5L3>, Revisado noviembre del 2015.
189. *ENTPD3 Gen*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/956>, Revisado noviembre del 2015.
190. *ENTPD3 Proteína*. <http://www.uniprot.org/uniprot/O75355>, Revisado noviembre del 2015.
191. *ENTPD4 Gen*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9583>, Revisado noviembre del 2015.
192. *ENTPD4 Proteína*. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y227>, Revisado noviembre del 2015.
193. *ENTPD5 Gen*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/957>, Revisado noviembre del 2015.
194. *ENTPD5 Proteína*. <http://www.uniprot.org/uniprot/O75356>, Revisado noviembre del 2015.
195. *ENTPD6 Gen*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/955>, Revisado noviembre del 2015.
196. *ENTPD6 Proteína*. <http://www.uniprot.org/uniprot/O75354>, Revisado noviembre del 2015.

197. *ENTPD7 Gen.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/57089>, Revisado noviembre del 2015.
198. *ENTPD7 Proteína.* <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9NQZ7>, Revisado noviembre del 2015.
199. *ENTPD8 Gen.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/377841>, Revisado noviembre del 2015.
200. *ENTPD8 Proteína.* <http://www.uniprot.org/uniprot/Q5MY95>, Revisado noviembre del 2015.
201. Stefan, C., S. Jansen, and M. Bollen, *Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases.* Purinergic Signal, 2006. **2**(2): p. 361-70.
202. *ENPP7 Proteína.* <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6UWV6>, Revisado noviembre del 2015.
203. *ENPP7 Gen.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/339221>, Revisado noviembre del 2015.
204. *ENPP6 Proteína.* <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6UWR7>, Revisado noviembre del 2015.
205. *ENPP6 Gen.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/133121>, Revisado noviembre del 2015.
206. *ENPP5 Proteína.* <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9UJA9>, Revisado noviembre del 2015.
207. *ENPP5 Gen.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/59084>, Revisado noviembre del 2015.
208. *ENPP4 Proteína.* <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y6X5>, Revisado noviembre del 2015.
209. *ENPP4 Gen.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/22875>, Revisado noviembre del 2015.
210. *ENPP3 Proteína.* <http://www.uniprot.org/uniprot/O14638>, Revisado noviembre del 2015.
211. *ENPP3 Gen.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5169>, Revisado noviembre del 2015.
212. *ENPP2 Proteína.* <http://www.uniprot.org/uniprot/Q13822>, Revisado noviembre del 2015.
213. *ENPP2 Gen.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5168>, Revisado noviembre del 2015.
214. *ENPP1 Proteína.* <http://www.uniprot.org/uniprot/P22413>, Revisado noviembre del 2015.
215. *ENPP1 Gen.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5167>, Revisado noviembre del 2015.
216. Zhang, L. and M.J. Sanderson, *Oscillations in ciliary beat frequency and intracellular calcium concentration in rabbit tracheal epithelial cells induced by ATP.* The Journal of Physiology, 2003. **546**(3): p. 733-749.
217. Button, B., M. Picher, and R.C. Boucher, *Differential effects of cyclic and constant stress on ATP release and mucociliary transport by human airway epithelia.* J Physiol, 2007. **580**(Pt. 2): p. 577-92.
218. Chavez, J., et al., *Inhibition of extracellular nucleotides hydrolysis intensifies the allergic bronchospasm. A novel protective role of ectonucleotidases.* Allergy, 2013. **68**(4): p. 462-71.
219. Montano, L.M., et al., *Histamine, carbachol, and serotonin induce hyperresponsiveness to ATP in guinea pig tracheas: involvement of COX-2 pathway.* Pflugers Arch, 2013. **465**(8): p. 1171-9.
220. North, R.A. and E.A. Barnard, *Nucleotide receptors.* Curr Opin Neurobiol, 1997. **7**(3): p. 346-57.
221. Zimmermann, H., *Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2000. **362**(4-5): p. 299-309.
222. Fausther, M., et al., *Cystic fibrosis remodels the regulation of purinergic signaling by NTPDase1 (CD39) and NTPDase3.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010. **298**(6): p. L804-18.
223. Pellegrino, R., et al., *Lung mechanics during induced bronchoconstriction.* J Appl Physiol (1985), 1996. **81**(2): p. 964-75.
224. Levesque, S.A., et al., *Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases.* Br J Pharmacol, 2007. **152**(1): p. 141-50.
225. Krawiec, M.E., et al., *Persistent wheezing in very young children is associated with lower respiratory inflammation.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(6): p. 1338-43.

226. Saglani, S. and C.M. Lloyd, *Eosinophils in the pathogenesis of paediatric severe asthma*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2014. **14**(2): p. 143-8.
227. Lee, T.H., H.J. Song, and C.S. Park, *Role of inflammasome activation in development and exacerbation of asthma*. *Asia Pac Allergy*, 2014. **4**(4): p. 187-96.
228. Saredidine, M.Z., et al., *Connexin43 modulates neutrophil recruitment to the lung*. *J Cell Mol Med*, 2009. **13**(11-12): p. 4560-70.
229. Bono, M.R., et al., *CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression*. *FEBS Lett*, 2015. **589**(22): p. 3454-60.
230. Choy, E., *Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2012. **51 Suppl 5**: p. v3-11.
231. Sartor, R.B., *Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis*. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 2006. **3**(7): p. 390-407.
232. Wiersinga, W.J., et al., *Host innate immune responses to sepsis*. *Virulence*, 2014. **5**(1): p. 36-44.
233. Hofmann, U. and S. Frantz, *Role of lymphocytes in myocardial injury, healing, and remodeling after myocardial infarction*. *Circ Res*, 2015. **116**(2): p. 354-67.
234. Ingulli, E., *Mechanism of cellular rejection in transplantation*. *Pediatr Nephrol*, 2010. **25**(1): p. 61-74.
235. Jung, U.J. and M.S. Choi, *Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease*. *Int J Mol Sci*, 2014. **15**(4): p. 6184-223.
236. Jung, C.H., et al., *The risk of incident type 2 diabetes in a Korean metabolically healthy obese population: the role of systemic inflammation*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015. **100**(3): p. 934-41.
237. Carp, H.J., C. Selmi, and Y. Shoenfeld, *The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss*. *J Autoimmun*, 2012. **38**(2-3): p. J266-74.
238. Agache, I., et al., *Untangling asthma phenotypes and endotypes*. *Allergy*, 2012. **67**(7): p. 835-46.
239. Ray, A., T.B. Oriss, and S.E. Wenzel, *Emerging molecular phenotypes of asthma*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015. **308**(2): p. L130-40.
240. Xu, R., et al., *The role of neutrophils in the development of liver diseases*. *Cell Mol Immunol*, 2014. **11**(3): p. 224-31.
241. De Greef, K.E., et al., *Neutrophils and acute ischemia-reperfusion injury*. *J Nephrol*, 1998. **11**(3): p. 110-22.
242. Wright, H.L., R.J. Moots, and S.W. Edwards, *The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis*. *Nat Rev Rheumatol*, 2014. **10**(10): p. 593-601.
243. Hoenderdos, K. and A. Condliffe, *The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013. **48**(5): p. 531-9.
244. Ciepiela, O., M. Ostafin, and U. Demkow, *Neutrophils in asthma--a review*. *Respir Physiol Neurobiol*, 2015. **209**: p. 13-6.
245. Portales-Cervantes, L., et al., *Expression and function of the P2X(7) purinergic receptor in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis*. *Hum Immunol*, 2010. **71**(8): p. 818-25.
246. Moeckel, D., et al., *Optimizing human apyrase to treat arterial thrombosis and limit reperfusion injury without increasing bleeding risk*. *Sci Transl Med*, 2014. **6**(248): p. 248ra105.



ATP releases ATP or other nucleotides from human peripheral blood leukocytes through purinergic P2 receptors



Marlon De Ita^a, Mario H. Vargas^{b,1}, Verónica Carbajal^b, Blanca Ortiz-Quintero^c, Cintya López-López^d, Marcela Miranda-Morales^e, Carlos Barajas-López^d, Luis M. Montañó^{a,*,1}

^a Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, México

^b Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México, DF, México

^c Departamento de Investigación en Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México, DF, México

^d División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, SLP, México

^e Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 July 2015

Received in revised form 7 November 2015

Accepted 5 December 2015

Available online 8 December 2015

Keywords:

Human leukocytes

ATP/nucleotides

P2Y receptors

P2X receptors

ABSTRACT

Aims: Almost every eukaryotic cell releases ATP under certain conditions. The idea that ATP induces the release of ATP has been scantily investigated.

Methods: We explored this possibility by assessing the rate of exogenous ATP breakdown (measured by phosphates production) by human peripheral blood leukocytes. The role of P2Y and P2X receptors was evaluated pharmacologically, by patch clamp, or by flow cytometry.

Key findings: In mononuclear and/or polymorphonuclear cells, ATP increased phosphates formation in a time- and concentration-dependent manner. Uncoupling of P2Y receptors with N-ethylmaleimide and antagonism of P2Y and P2X receptors through suramin reduced phosphate formation after 500 μ M ATP, suggesting that part of the phosphate production was due to activation of P2 receptors, with subsequent release of ATP or other nucleotides. Similar results were obtained with UTP and ATP γ S. Gadolinium (connexins inhibitor) also significantly reduced the ATP-induced phosphate production. Blockade of P2X receptors with SKF 96365 or NF023 did not modify the phosphate production. In monocytes, 500 μ M ATP induced inward currents suggestive of P2X₁ activation, but higher concentrations (1–5 mM) induced inward currents suggestive of P2X₇ activation. We discarded a role of adenosine in the ATP-evoked nucleotides release. Flow cytometry identified that almost all mononuclear and polymorphonuclear cells expressed P2Y_{1,2,4,6,11} receptors.

Significance: 500 μ M ATP induced the release of ATP or other nucleotides through activation of P2Y_{2,4,6,11} receptors in human leukocytes, and probably via P2X receptors at higher concentrations. This ATP-induced nucleotides release constitutes a potential mechanism leading to amplification of ATP signaling.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The involvement of adenosine triphosphate (ATP) in the energetic metabolism of any cell is widely known. However, in 1959 Holton described for the first time that ATP was released as a neurotransmitter from sensory nerves of the rabbit ear [1], and in 1970 Burnstock et al. demonstrated that ATP was the neurotransmitter of gastrointestinal non-adrenergic non-cholinergic nerves in several animal species [2]. The concept that ATP could be released by neurons was progressively expanded to include many non-neuronal cells such as erythrocytes,

basophils, endothelial and epithelial cells [3–8]. Nowadays, it is considered that virtually every type of eukaryotic cell can release ATP under certain conditions. Multiple types of stimuli release ATP from non-neuronal cells, including physical perturbation, interaction with pathogens and receptor-mediated stimulation [9–11]. The mechanisms by which these stimuli release ATP include *diffusional release* and *vesicular release* [12]. The former is carried out through anion channels, connexin and pannexin hemichannels and P2X₇ receptor, among others. The latter involves exocytosis, which might be initiated by agonist-induced intracellular Ca²⁺ increase.

Purinergic receptors (P2) are classified as P2X and P2Y families. P2X receptors are ligand-gated nonselective cation channels that permeate Na⁺ and Ca²⁺ and are classified as P2X_{1–7} [13]. P2Y receptors are coupled to G proteins and are classified as P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14} [13,14]. Among all P2Y receptors, only P2Y_{1,2,4,6,11} are coupled to G_{q/11} [14], and thus these are the only P2Y receptors capable to promote intracellular Ca²⁺ increase via IP₃ synthesis.

* Corresponding author at: 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.

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

¹ Drs. Vargas and Montañó contributed equally to this work.

The first hint that activation of P2 receptors mediates ATP release was obtained in 1972 by Holmsen et al. through stimulation of platelets with ADP [15]. In 1992, Osipchuk and Cahalan found evidences that rat basophilic leukemia cells, peritoneal mast cells and mucosal mast cells release ATP after stimulation of purinergic receptors (P2-type), but they did not identify the specific P2 receptors involved (Osipchuk and Cahalan, 1992). In 2012, Hayoz et al. described that in neonatal mouse olfactory epithelium, exogenous ATP evoked the release of ATP through several mechanisms, including P2Y receptor-mediated Ca^{2+} -dependent vesicular exocytosis, P2X_{1,7} receptors activation and P2X₇-pannexin-1 complex [16].

Recently, we found that partial inhibition of ectonucleotidases activity in sensitized guinea pigs greatly enhanced the allergic bronchoconstriction elicited by the intravenous challenge with the specific antigen, a phenomenon that was prevented by antagonists of purinoceptors [17]. These results suggested, that during the allergic response, nucleotides were actively released to the intravascular compartment, and thus, the possibility that ATP might promote the release of more ATP acquired great relevance. Therefore, the aim of the present study was to explore in human peripheral blood leukocytes whether exogenous ATP has the potential of inducing the release of ATP or other nucleotides from these cells.

2. Materials and methods

2.1. Measurement of ectonucleotidase activity

Ectonucleotidase activity was assessed by a colorimetric assay with malachite green, a method that measures the amount of inorganic phosphate released during enzymatic breakdown of exogenous ATP by the cells. This method was first described by Chan et al. [18] and used by others [19–22]. Briefly, peripheral blood samples (10 ml) were obtained from healthy subjects attending the blood bank of the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias for donation. Mononuclear (MNC) and polymorphonuclear (PMN) cells fractions were separated by centrifuging the blood sample at 1800 rpm during 35 min at 20 °C using a commercial solution containing 13.8% (w/v) sodium diatrizoate and 8.0% (w/v) polysaccharide (Polymorphprep, 1:1 [v/v], Acurate, Oslo, Norway). Each collected fraction was mixed with 10 ml of the following working solution (WS): NaCl 120 mM, KCl 5 mM, glucose 60 mM, CaCl_2 0.5 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 adjusted with HCl, in deionized water [20], and centrifuged at 1800 rpm during 10 min at 20 °C. Supernatant was discarded and the last procedure was repeated once more. Supernatant was discarded again, and the pellet was mixed with 5 ml erythrocyte lysis buffer solution (600 mg NaHCO_3 , 4.15 g NH_4Cl , 18 mg EDTA in 500 ml H_2O) and refrigerated during 10 min. After addition of 8 ml WS, the tube was centrifuged at 1200 rpm during 10 min at 20 °C. Supernatant was discarded, the pellet was re-suspended in 1 ml WS, and cells were counted in a Neubauer chamber. Two million cells (either isolated MNC, isolated PMN or mixed [1:1] MNC + PMN cells) were suspended in 900 μl WS during 10 min at 37 °C. ATP or UTP was added to obtain different concentrations (75, 125, 250 or 500 μM in 100 μl). After a brief vortexing, a first sample of 100 μl was obtained and immediately put in an Eppendorf tube containing 100 μl of 10% trichloroacetic acid in ice to stop the reaction (time 0). This sampling was repeated at 4, 8, 16, 32, 64, and 128 min. From each of these tubes, 32 μl were transferred to an ELISA plate, 124 μl malachite green were added and the mixture was shaken in a rocking platform (Daigger, Model AR100 117 V 2A, IL, USA) during 7 min. Samples in the plates (by duplicate) were read at 650 nm in a spectrophotometer (Sinergy HT Microplate Reader, Biotek Instruments, Winooski, VT, USA). In every experiment, the results were compared with a standard curve made with increasing concentrations of KH_2PO_4 (1–1000 μM). Malachite green solution was prepared by mixing the following in a 2:1:2 proportion: 0.0812 g malachite green dissolved in 100 ml deionized water, 5.72% ammonium molybdate in 6N HCl, and deionized water,

respectively. We corroborated that at 500 μM concentration, ATP did not induce cell death after 64 and 128 min incubation, as assessed by Trypan blue staining (Supplementary Fig. 1).

Based on the above described experiments, we selected 500 μM as the ATP or UTP concentration to be used in subsequent experiments. Before adding this ATP concentration, cells were pre-incubated with 100 μM suramin (an antagonist of P2X_{1,2,3,5} and P2Y_{1,2,6,11,12,13} receptors [14,23]), 1 μM NF023 (a selective antagonist of P2X₁ receptors [24]), 30 μM SKF 96365 (a blocker of nonselective cation channels [25,26], including P2X receptors), 30 μM N-ethylmaleimide (NEM, a compound that uncouples G proteins from several receptors [27,28], including P2Y receptors), 10–100 μM MRS 2500 (a selective P2Y₁ receptor antagonist [29]), 100 μM carbenoxolone (which preferentially inhibits pannexin-1, more than connexins [30,31]), 50 μM gadolinium (a potent connexins inhibitor [32,33]), and/or ARL-67156 (an unspecific inhibitor of E-NTPDase 1, E-NTPDase 3, and ENPP1 [34]). More selective P2 receptors antagonists, such as PPADS for P2X or reactive blue 2 for P2Y, were not used because per se they develop color that interferes with the colorimetric measurement of inorganic phosphates.

The above-described protocol of phosphate production was also replicated by replacing ATP by 500 μM UTP or 125 μM ATP γS (a non-hydrolyzable analog of ATP), in both cases with or without pre-incubation with 30 μM NEM. We chose this relatively low concentration of ATP γS because at higher concentrations, it causes cell death [35].

Finally, in another set of experiments, a mixture of MNC + PMN cells were pre-incubated with or without 100 nM 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX, an antagonist of A₁ receptors [36]), 10 μM MRS 1191 (an antagonist of A₃ receptors [37]), 100 nM SCH-58261 (SCH, an antagonist of A_{2A} receptors [38]), or 10 μM MRS 1754 (an antagonist of A_{2B} receptors [39]).

All the antagonist or inhibitor drugs were pre-incubated during 10 min before ATP, UTP, or ATP γS addition.

2.2. Electrophysiology

Monocytes were isolated from 4 ml venous blood from healthy donors. Blood was diluted 1:2 with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.3, layered over 3 ml of Ficoll-Hystopaque (Sigma, St. Louis, MO, USA) and centrifuged at 2000 rpm for 25 min. The MNC fraction was washed with PBS and suspended at 1×10^6 cells/ml in RPMI-1640 medium (Gibco, NY, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine (Sigma), 10 U/ml penicillin and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (Sigma). MNC were plated and allowed to adhere on sterile round cover slips at 5×10^5 cell density in culture with complete RPMI 1640 medium at 37 °C for 4 h. Then, after washing to remove non-adherent cells, adhered monocytes were used for electrophysiological recordings.

We used the whole cell configuration of the patch clamp technique, which were recorded with the Axopatch 1D or the Axopatch 200B amplifiers (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and the AxoScope 9 software (Molecular Devices). Patch pipettes with resistances between 3 and 5 M Ω were manufactured as previously described [40]. Whole cell currents were recorded in while the monocyte's membrane potential was held at -40 mV. The composition of the internal pipette solution was (mM): CsCl 150, EGTA 10, HEPES 5, NaCl 10, ATPMg, 4.5, and GTPNa 0.1, with pH adjusted to 7.3–7.4 with CsOH. The external solution composition was (mM): NaCl 160, CaCl_2 2, glucose 10, HEPES 5, and CsCl 3, with pH adjusted to 7.3–7.4 with NaOH. Gigaseals obtained were always at least 1 G Ω , but lasted no more than 10–15 min, and thus electrophysiological stable recordings had to be obtained in shorter periods. ATP (0.1, 0.5, 1, or 5 mM) was applied using a fast perfusion system that allows recordings of fast desensitizing currents [41]. Because time between each ATP stimulus cannot be longer than 5 min, only one to three recordings could be accomplished per cell.

In another set of experiments, we investigated whether 30 μM SKF 96365 effectively blocks P2X receptors, either when cells were pre-

incubated before 500 μM ATP or when both drugs were simultaneously administered.

2.3. Flow cytometry analysis

To determine the expression of P2Y receptors in the different types of MNC, 5×10^5 cells were incubated with anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD14, and anti-CD19 antibodies (catalog No. 300430, 317408, 344722, 325620, and 302216, respectively, Biolegend, San Diego, CA, USA) during 30 min at 4 °C in PBS containing 0.2% bovine serum albumin and 0.1% sodium azide (PBA). Afterwards, cells were washed with PBA and incubated with either anti-P2Y₁, anti-P2Y₁₁ (catalog No. APR-021 and APR-015, respectively, Alomone, Jerusalem, Israel) or anti-P2Y₄ antibodies (catalog No. Ab140857, Abcam, UK) during 1 h at 4 °C in darkness. In the case of anti-P2Y₂ and anti-P2Y₆ staining (catalog No. APR-010, Alomone, and Ab101800, Abcam, UK, respectively), cells were first fixed in 4% formaldehyde during 10 min, and treated with permeabilization buffer (catalog No. 00-8333, eBioscience, San Diego, CA, USA) during 10 min. After incubation, cells were washed with either PBA (for anti-P2Y₁, P2Y₄ and P2Y₁₁ staining) or permeabilization buffer (for anti-P2Y₂ and P2Y₆ staining) and incubated with secondary anti-rabbit IgG antibody conjugated to phycoerythrin (catalog No. 12-4739, BD eBiosciences, San Diego, CA, USA) during 30 min at 4 °C. The cells were washed twice and fixed with 1% paraformaldehyde until analysis. Fifty thousand events were collected on a cytometer (FAScanto, Becton&Dickinson, Flankin Lakes, NJ, USA) and data were analyzed by Flow Jo software (version 887, TriStar, Ashlan, OR, USA).

To verify the expression of the above-mentioned P2Y receptors in PMN cells, 5×10^5 cells were incubated with anti-CD66b antibodies (catalog No. 305104, Biolegend, San Diego, CA), washed with PBA and incubated with anti-P2Ys antibodies and with secondary anti-rabbit IgG antibody conjugated to phycoerythrin, as described in the previous protocol.

2.4. Drugs

Adenosine 5'-triphosphate disodium salt (ATP), ATP γ S, suramin, NF023, N-ethylmaleimide (NEM), carbenoxolone, gadolinium, SKF 96365, 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine, MRS 1191, SCH-58261, malachite green oxalate, MRS 1754, and ARL-67156 were purchased from Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA. MRS 2500 tetraammonium salt was obtained from Tocris, Bristol, UK.

2.5. Data analysis

Amount of inorganic phosphate released was compared among groups at each time point through analysis of variance followed by Dunnett test. Because each blood sample was usually enough to accomplish 3 to 5 experiments (every one submitted to a different experimental condition), the analysis of variance could be either for independent groups or for repeated measures. Likewise, non-paired or paired Student's t-test was also used in other pairwise comparisons. Data were expressed in text and illustrations as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical significance was set at $p < 0.05$ bimarginally.

3. Results

As can be seen on Fig. 1A, in control experiments ($n = 5$) MNC + PMN cells without exogenous ATP addition, were not associated with a noticeable increase of inorganic phosphates (a marker of ATP metabolism by ectonucleotidases), suggesting that no spontaneous release and breakdown of this or other nucleotides occurred. By contrast, addition of 125, 250 or 500 μM ATP progressively increased the formation of inorganic phosphates in a time- and concentration-dependent manner ($n = 12$ –13 per group). Additionally, the use of 75, 125, 250

or 500 μM UTP, an agonist of P2Y₂ and P2Y₄ receptors, and indirectly through UDP, of P2Y₆ receptor [12], also progressively increased the formation of inorganic phosphates ($n = 5$, Fig. 2A). Based on these results, we decided to use 500 μM ATP or UTP in subsequent experiments.

The uncoupling of P2Y receptors by 30 μM NEM produced a statistically significant reduction of inorganic phosphate release by ATP ($n = 7$ –9) or UTP ($n = 6$), at 16 or 32 min and on in MNC + PMN cells, respectively (Figs. 1B and 2B), at 64 min and on in MNC cells (Fig. 1C), and at 32 min and on in PMN cells (Fig. 1D). This finding suggests that in normal conditions, P2Y receptor stimulation caused the release of ATP or other nucleotides (ATP/nucleotides) from these cells, providing an extra amount of nucleotides that could be hydrolyzed by ectonucleotidases. This extra amount roughly corresponded to 35%–40% of the total phosphate production, as judged by the reduction of the area under the curve generated by ATP (Fig. 1B) or UTP (Fig. 2B). Additionally, we found that suramin (an antagonist of almost all P2Y and P2X receptors) also decreased the inorganic phosphates production induced by ATP (Fig. 1B).

To further support the possibility that ATP was inducing the release of more ATP/nucleotides, we used the non-hydrolyzable analog ATP γ S. We found that 125 μM ATP γ S was still capable of inducing a time-dependent phosphate production in MNC + PMN cells, and this effect was greatly reduced by 30 μM NEM ($n = 4$, Fig. 3). Due to the non-hydrolyzable nature of ATP γ S, the origin of this phosphate production must necessarily be the breakdown of endogenous ATP/nucleotides, mainly released through activation of purinergic receptor by ATP γ S.

In order to assess the involvement of P2X receptors in the ATP-induced ATP/nucleotides release, cells were pre-incubated with 30 μM SKF 96365 to antagonize P2X receptors. We found that SKF 96365 did not modify the phosphates release in MNC or PMN cells, either in a cell mixture ($n = 9$, Fig. 1B) or when separated by cell type (MNC, $n = 8$, Fig. 1C or PMN cells, $n = 7$, Fig. 1D), suggesting that P2X receptors had no role in this phenomenon, at least at 500 μM ATP. Moreover, in isolated monocytes from healthy subjects we used patch clamp to assess the ATP concentration needed to activate P2X receptors, which in monocytes have been reported to be mainly P2X_{1,4,7} receptors [42]. We found two different patterns of response to the ATP stimulus (Fig. 4). In the first one, ATP induced an inward current which rapidly inactivates in spite of the continuous presence of ATP, which corresponds to a kinetic suggestive of P2X₁ receptor activation [43]. In the second pattern, ATP produced an inward current, but its amplitude increased only while ATP was present (indicating that the channel remained opened), a typical kinetic of the P2X₇ receptors [43,44]. The first pattern was mainly observed in some cells at 100 μM ATP (2 out of 11 [18%] monocytes) and 500 μM ATP (7 out of 10 [70%] monocytes). Both current patterns were observed at concentrations of 1 mM ATP (the first pattern in 13 out of 22 [59%] monocytes, and the second pattern in 2 out of 22 [9%] monocytes). At the highest ATP concentration (5 mM), only the second pattern was observed (in 7 out of 8 [88%] monocytes). These experiments suggested that at 500 μM ATP, only P2X₁ receptors were activated.

With patch clamp experiments we also corroborated that SKF 96365, at the same concentration (30 μM) used in the above-described experiments related to phosphate production, effectively blocks P2X receptors, inasmuch as it almost abolished the transient current suggestive of P2X₁ receptor activation elicited by 500 μM ATP (Fig. 5). In order to confirm the lack of participation of P2X₁ receptors in the ATP-induced ATP/nucleotides release (as suggested by experiments with SKF 96365), we used a specific antagonist of these receptors, NF023 (1 μM , a concentration 5-fold higher than its IC₅₀, $n = 4$). As can be seen in the Supplementary Fig. 2, this drug did not modify the phosphate production induced by exogenous ATP, ruling out the involvement of P2X₁ receptors in this phenomenon.

Taking into account that pannexin-1 and connexin hemichannels participate in the diffusional release of ATP, we also explored the potential role of these structures. We found that blockade of pannexin-1 by

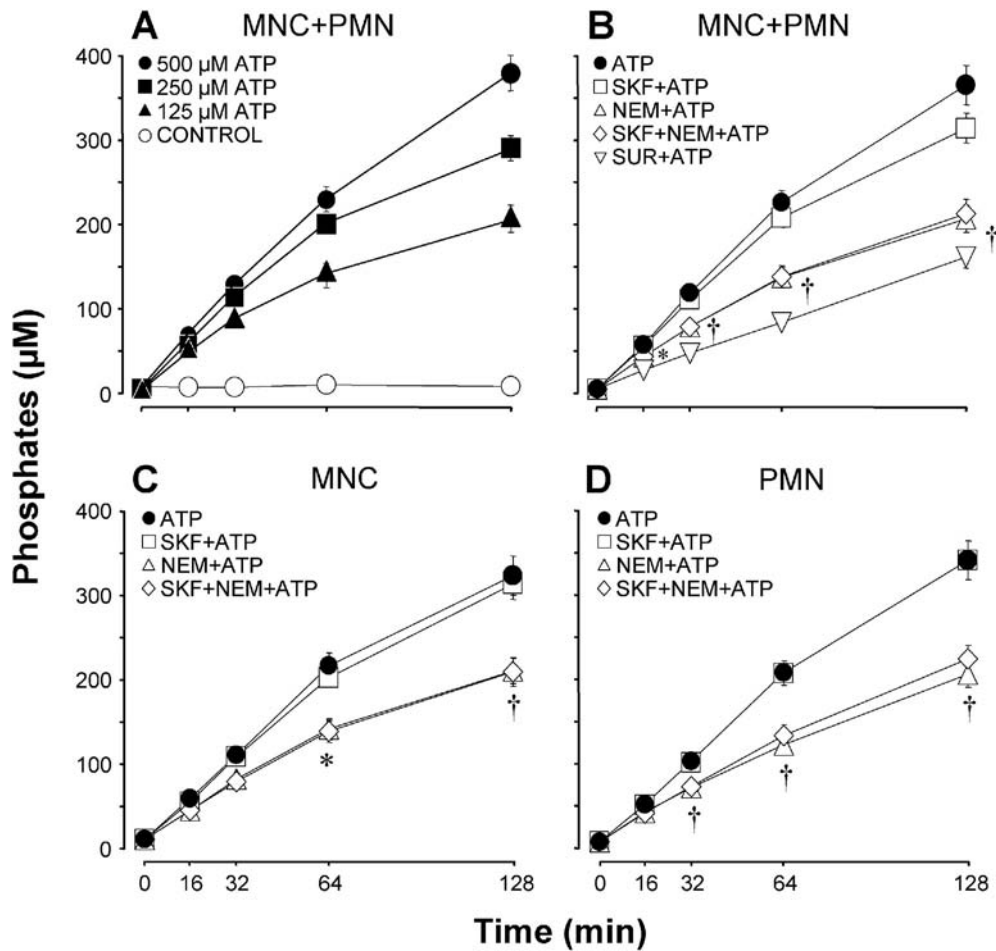


Fig. 1. Ectonucleotidases activity in leukocytes measured through their ability to release inorganic phosphates from exogenous ATP. Panel A shows the time- and concentration-dependent release of inorganic phosphates in mononuclear (MNC) and polymorphonuclear (PMN) cells. The control group (open circles, $n = 5$) corresponds to cells without administration of ATP. Panels B, C and D illustrate that the blockade of P2X receptors with 30 μM SKF 96365 (SKF) did not modify the inorganic phosphates release after 500 μM ATP in any cell type. Uncoupling of P2Y receptors by 30 μM N-ethylmaleimide (NEM) significantly reduced the phosphate production, which was not further modified by its combination with SKF. Antagonism of the majority of P2 receptors by 100 μM suramin (SUR) also notably diminished the phosphate production in MNC + PMN cells (panel B). Data correspond to mean \pm SEM of 12–13 (panel A) or 7–9 (panels B, C and D) experiments. * $p < 0.05$, and † $p < 0.01$ as compared the ATP group vs groups receiving NEM, SKF + NEM or SUR. (ANOVA followed by Dunnett's tests for each time period).

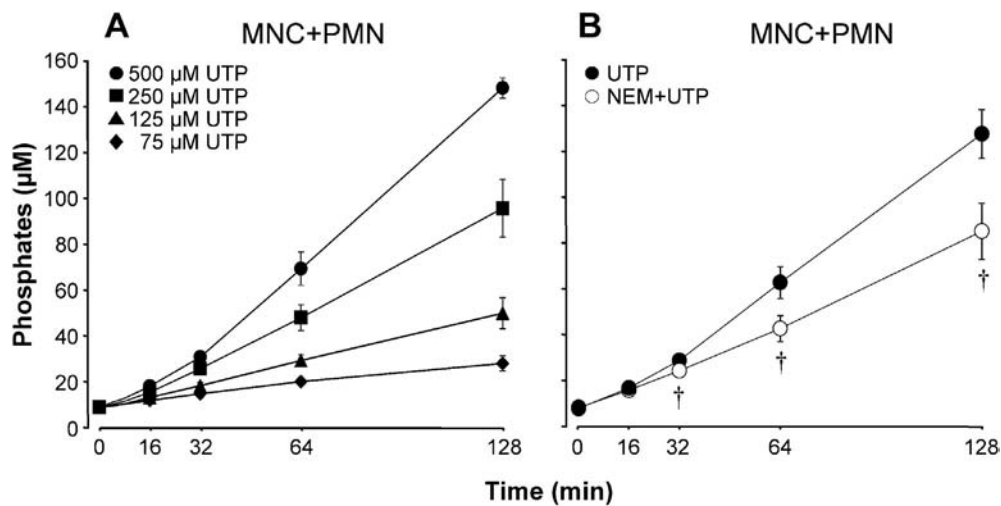


Fig. 2. UTP is metabolized by membrane ectonucleotidases from leukocytes. Panel A shows the time- and concentration-dependent release of inorganic phosphates in mononuclear (MNC) and polymorphonuclear (PMN) cells. Panel B illustrates that the uncoupling of P2Y receptors by 30 μM N-ethylmaleimide (NEM) significantly reduces the phosphate production. Data correspond to mean \pm SEM of $n = 5$ –6 experiments. † $p < 0.01$ as compared with UTP group by paired Student's t -test.

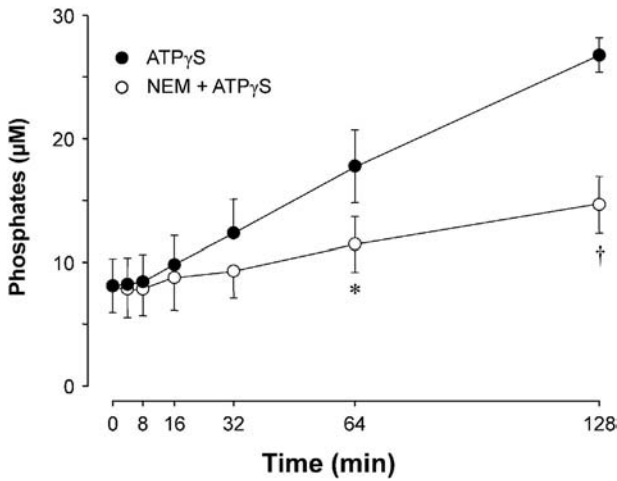


Fig. 3. ATP γ S (125 μM) induces time-dependent phosphate production in mononuclear plus polymorphonuclear cells, which was largely diminished by the uncoupling of P2Y receptors by N-ethylmaleimide (NEM, 30 μM). Because ATP γ S is a non-hydrolyzable nucleotide, the origin of the phosphate production must be endogenous ATP or other nucleotides mainly released by ATP γ S-induced activation of P2Y₁₁ receptor. Data correspond to mean ± SEM of n = 4 experiments per group. *p < 0.05 and †p < 0.01 as compared with ATP γ S group by paired Student's t-test.

100 μM carbenoxolone did not modify the phosphates production induced by 500 μM ATP, while blockade of connexins with 50 μM gadolinium significantly reduced it, in approximately 20% (Fig. 6).

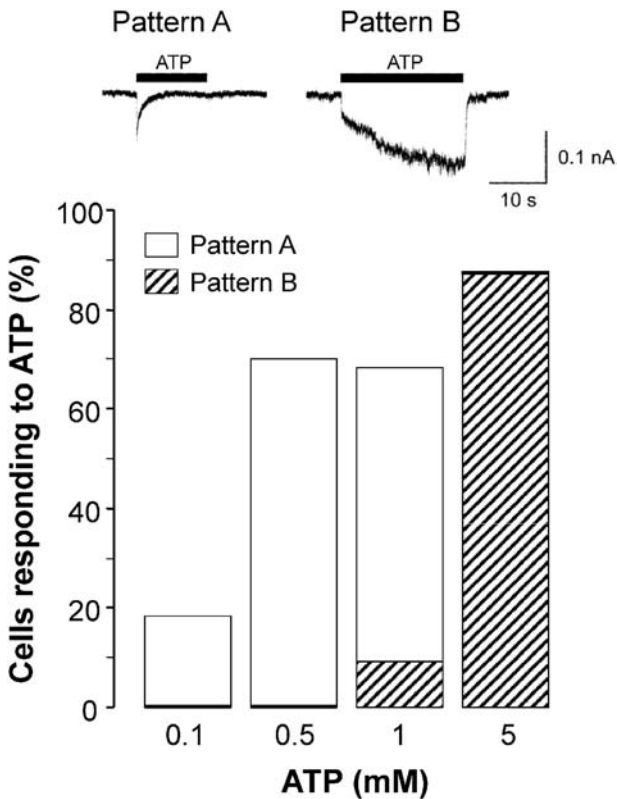


Fig. 4. Electrophysiological responses to ATP application in human blood monocytes. Examples of original path clamp recordings showing two typical patterns of inward currents due to activation of P2X receptors. In pattern A, ATP produced a rapidly-inactivating inward current suggestive of P2X₁ receptor stimulation. In pattern B, ATP response was characterized by an inward current that increased with time, suggestive of P2X₇ receptors activation. Bars correspond to percentage of monocytes responding in one or another pattern. The number of recordings was 11, 10, 22, and 8 for the ATP concentrations of 0.1, 0.5, 1, and 5 mM, respectively, obtained from a total number of 26 monocytes.

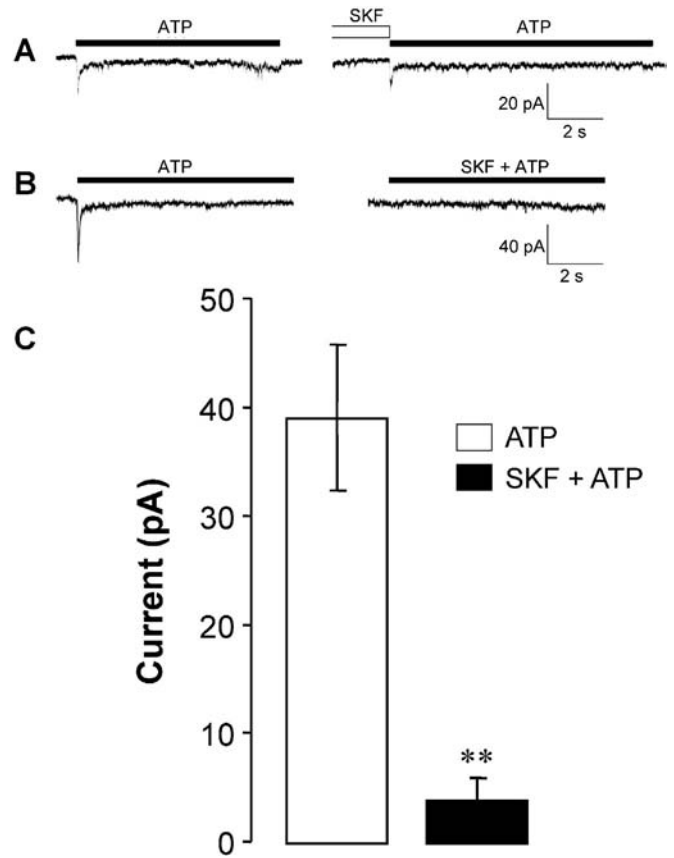


Fig. 5. Inhibition of ATP-induced transient current by SKF 96365 (SKF) in human monocytes. Addition of 500 μM ATP produced a transient current suggestive of P2X₁ activation, which was greatly inhibited by the simultaneous use of SKF (a blocker of nonselective cation channels) as exemplified in panel B, which yielded a high statistically significant difference (*p < 0.001, n = 6–7, panel C). This effect of SKF was not observed when it was first pre-incubated and then washed out with the administration of ATP, as observed in panel A.

Because the metabolism of the exogenous ATP can produce adenosine, which in turn can stimulate P1 receptors (A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃), MNC + PMN cells were incubated with the corresponding P1 receptor

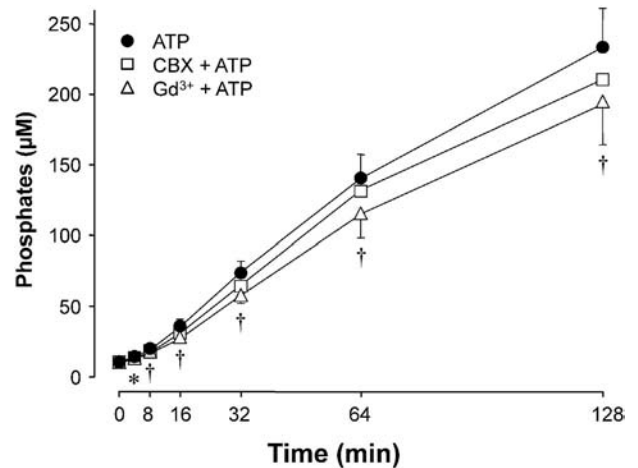


Fig. 6. The inhibition of connexin hemichannels by gadolinium reduced the ATP-induced phosphates production in mononuclear plus polymorphonuclear cells. While pre-incubation with the non-specific pannexin inhibitor carbenoxolone (CBX, 100 μM), did not modify the ATP-induced phosphates production, preincubation with the connexin inhibitor gadolinium (Gd³⁺, 50 μM) caused a statistically significant diminution of ATP-induced phosphates production (repeated measures ANOVA followed by Dunnett test for each time period). Data correspond to mean ± SEM of n = 7 experiments per group. *p < 0.05 and †p < 0.01 as compared with ATP group.

antagonists to discard the involvement of adenosine in the ATP-induced ATP/nucleotides release. In these experiments, we found that 100 nM DPCPX (antagonist of A_1 receptors, $n = 7$), 10 μ M MRS 1191 (antagonist of A_3 receptors, $n = 8$), 100 nM SCH-58261 (SCH, antagonist of A_{2A} receptors, $n = 3$), and 10 μ M MRS 1754 (antagonist of A_{2B} receptors, $n = 4$) did not modify the release of inorganic phosphates (Fig. 7).

The expression of several P2Y receptors (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ and P2Y₁₁) in different peripheral leukocytes was characterized by flow cytometry. Subsets of leukocytes were identified as T-cells (CD3+), helper T-cells (CD3+CD4+), cytotoxic T-cells (CD3+CD8+), monocytes (CD14+), B cells (CD19+), and neutrophils (CD66+). As can be seen in Fig. 8, P2Y₁ and P2Y₁₁ receptors were the most abundant of the explored purinoceptors, since more than 50% of monocytes and B cells, and more than 80% of the remaining cell types expressed these proteins. Contrariwise, the lowest expression corresponded to P2Y₄, which was almost absent in the majority of MNC, although it was abundantly expressed by neutrophils. In fact, neutrophils highly expressed all the purinergic receptors studied. The presence of the remaining receptors (P2Y₁, P2Y₂ and P2Y₆ receptors) followed different patterns, but in general they were expressed in 50 to 90% of the MNC.

4. Discussion

In the present work, we explored the rate at which exogenous ATP was metabolized by peripheral blood leukocytes, as measured by the inorganic phosphate production. Since this step solely involves an enzymatic reaction, it was expected that all exogenous ATP would be completely metabolized by ectonucleotidases (i.e., that the whole phosphate production would be the result of exogenous ATP breakdown). Surprisingly, we found that the pharmacological antagonism of P2Y receptors by suramin or the uncoupling of their associated G proteins by NEM greatly diminished the phosphate production, indicating that the exogenous ATP was interacting with purinergic receptors to induce the release of more ATP or of other nucleotides by these cells. Besides the well-known property of suramin as a P2Y receptor antagonist, some published studies have suggested that suramin also inhibits ectonucleotidases [20,45,46]. Thus, this additional mechanism could be responsible of the greater inhibition of the phosphate production achieved by suramin as compared with NEM. On the other hand, this ectonucleotidase inhibition has not been found for NEM [20],

supporting a role for P2Y receptor in this phenomenon. Experiments with ATP γ S, alone or in combination with NEM, further corroborated that part of the phosphate production came from the breakdown of endogenous ATP/nucleotides released by activation of P2Y receptors, inasmuch as ATP γ S is not metabolized by ectonucleotidases and hence cannot be the source of phosphates.

We found that ATP-evoked ATP/nucleotides release occurred almost with the same magnitude both in MNC and PMN cells. In line with this, we also demonstrated that almost all P2Y receptors studied (P2Y_{1,2,4,6,11}), and especially P2Y₁ and P2Y₁₁, were expressed in the majority (>50%) of leukocytes CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD14+, CD19+, and CD66+. The notable exception was P2Y₄, which was mainly expressed in CD66+ leukocytes (neutrophils) but only in a low percentage (<20%) of the other cell types. It is known that all these P2Y receptors act through activation of G_{q/11} protein, with the subsequent increment of intracellular Ca²⁺ concentration, and because such Ca²⁺ increments are required for both the vesicular and diffusional (via connexin hemichannels and/or pannexin channels) ATP release [12], then one or more of these receptors might be involved in the ATP/nucleotides release. In agreement with this proposal, we found that the phosphate production induced by UTP, an agonist of P2Y₂, P2Y₄ and (indirectly) P2Y₆, was diminished by NEM, suggesting that one or more of these receptors were involved in the UTP-evoked ATP/nucleotides release. Additionally, our experiments with ATP γ S indicated that P2Y₁₁ and P2Y₁ receptors could also be involved in the release of endogenous ATP/nucleotides, inasmuch as ATP γ S, which is a full agonist of the former [47] and a partial agonist of the latter [48], induced phosphate production. However, in view that MRS 2500, a selective P2Y₁ receptor antagonist, did not modify the phosphate production induced by ATP (Supplementary Fig. 3), we can rule out the participation of P2Y₁ receptors in this phenomenon. Thus, the ATP γ S-induced phosphate production appears to be due to activation of P2Y₁₁ receptors, with the subsequent release and breakdown of ATP/nucleotides, which is supported by the fact that NEM greatly diminished this effect. On the other hand, it has been proposed that activation P2Y receptors can induce ATP release via IP₃ production and Ca²⁺ release, with the subsequent opening of connexin hemichannels [30]. In this regard, our experiments with gadolinium, an inhibitor of connexin hemichannels, reduced by ~20% the phosphate production induced by exogenous ATP, thus confirming that connexins are also involved in the ATP-induced ATP/nucleotides release.

In addition to P2Y receptors, P2X receptors are known to release ATP [49]. This was recently corroborated by Hayoz et al., who described that one of the mechanisms capable of releasing ATP from neonatal mouse olfactory epithelium was the activation of P2X_{1,7} receptors, as well as activation of P2X₇ receptors to form a complex with pannexin channels [16]. It has been found that human monocytes express P2X_{1,4,7} receptors [42], and North described the inactivation kinetics of these and other P2X receptors in HEK693 cells transfected with cDNA of P2X_{1,2,3,4,5,7} receptors [43]. In our patch clamp experiments in monocytes, we found that non-decaying currents suggestive of P2X₇ receptor activation were mainly produced at 5 mM ATP concentration. Because this ATP concentration is 10-fold greater than the 500 μ M used in our experiments of phosphate production during ATP metabolism by ectonucleotidases, we can confidently conclude that P2X₇ was not involved in the ATP-induced ATP/nucleotide release phenomenon. Since the association of P2X₇ with pannexin-1 is essential for the release of ATP or nucleotides, our finding that the pannexin-1 inhibitor carbenoxolone did not modify the phosphate production further supports the null role of P2X₇ in the ATP-induced ATP/nucleotides release, at least at 500 μ M exogenous ATP.

Regarding P2X₁ receptors, up to 70% monocytes responded to 500 μ M ATP with an inward current that was suggestive of the activation of these receptors (Fig. 4). At first glance, this P2X₁ activation might be responsible for some ATP/nucleotides release. However, pharmacological experiments with SKF 96365 and NF023 to block P2X₁ did

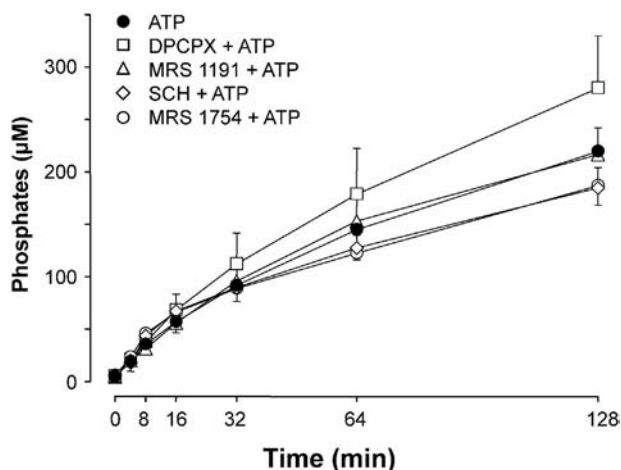


Fig. 7. Lack of effect of adenosine receptors antagonists on the ectonucleotidases activity measured through their ability to release inorganic phosphates from exogenous ATP. Addition of 500 μ M ATP to peripheral blood mononuclear plus polymorphonuclear cells from healthy donors induced the release of inorganic phosphates in a time-dependent manner (closed circles, $n = 8$). Pre-incubation with 100 nM 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX, antagonist of A_1 receptors, $n = 7$), 10 μ M MRS 1191 (antagonist of A_3 receptors, $n = 8$), 100 nM SCH-58261 (SCH, antagonist of A_{2A} receptors, $n = 3$), or 10 μ M MRS 1754 (antagonist of A_{2B} receptors, $n = 4$) did not modify the release of inorganic phosphate (ANOVA followed by Dunnett test for each time period).

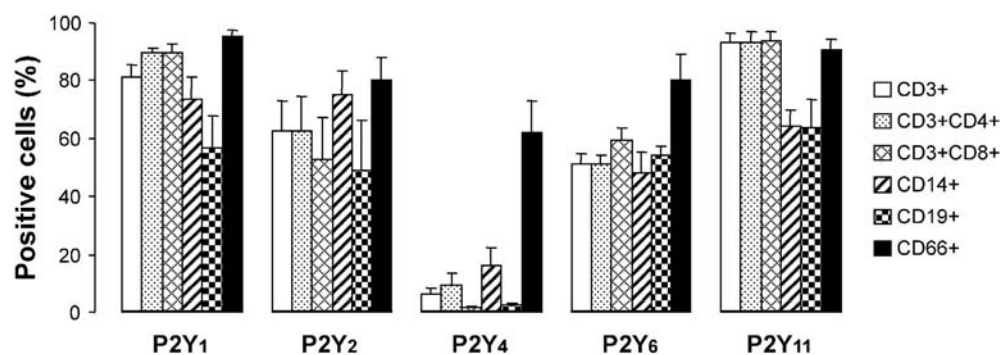


Fig. 8. Results of flow cytometry showing the percentage of cells immunolabeled to different P2Y receptors. Almost all P2Y receptors, especially P2Y₁ and P2Y₁₁, were identified in the majority (>50%) of T-cells (CD3+), helper T-cells (CD3+CD4+), cytotoxic T-cells (CD3+CD8+), monocytes (CD14+), B cells (CD19+), and neutrophils (CD66+), excepting P2Y₄, which was mainly expressed in neutrophils. Bars represent the mean, and vertical lines the standard error of n = 4–6 experiments.

not modify the phosphate production induced by exogenous ATP (Fig. 1 and Supplementary Fig. 2, respectively), ruling out the participation of P2X₁ receptors, at least at the ATP concentration tested (500 μM).

Our conclusion that P2X_{1,7} receptors do not participate in the nucleotides release induced by 500 μM ATP does not preclude that these receptors might participate at higher ATP concentrations and warrants further research. Following this line of thought, we could hypothesize two scenarios during the ATP-induced ATP/nucleotides release in peripheral blood leukocytes. One would mainly involve activation of P2Y receptors at low ATP concentrations, perhaps as a homeostatic mechanism, and the second would occur at higher ATP concentrations released during pathological conditions, in which P2X receptors would be activated in addition to the P2Y receptors. In this context, it is well known that ATP is released from endothelial cells during ischemia and hypoxia [50,51], and in most living tissues massive release of ATP acts as an indicator of cell damage.

It could be argued that adenosine, a by-product of the metabolism of exogenous ATP, might be modulating the release of nucleotides through activation of P1 receptors. However, none of the drugs used to antagonize P1 receptors (A₁, A_{2A}, A_{2B}, or A₃) modified the kinetics of inorganic phosphate production, implying that adenosine did not participate in the nucleotides release.

One potential limitation of the study was that we were unable to directly measure the release of ATP or other nucleotides, since MNC and PMN cells have a significant ectonucleotidase activity. The Supplementary Fig. 4 shows that the phosphate production due to ATP metabolism by membrane ectonucleotidases was only partially inhibited (~30%) by ARL-67156, an unspecific inhibitor of E-NTPDase 1, E-NTPDase 3, and ENPP1 [34]. Since no potent and selective ectonucleotidases inhibitors are available and ARL-67156 is the only one, under our experimental conditions still remains around 70% of ectonucleotidase activity that cannot be blocked, and thus all ATP or nucleotide released will be metabolized by these enzymes. Additionally, ARL-67156 is an ATP analog which is also metabolized by E-NPPs [52]. Therefore, trying to measure ATP or related nucleotides under these experimental conditions is not feasible.

It is increasingly acknowledged that ATP might be involved in a number of pathological conditions such as neuropathic pain, platelet aggregation, hypertension, asthma and some neurological diseases [17,53,54]. Thus, our finding that ATP can induce the release of more ATP or other related nucleotides from human leukocytes might constitute a potential mechanism that leads to amplification of the ATP/nucleotides concentrations. This mechanism might be especially relevant in local inflammatory processes where a large amount of leukocytes are present. In this context, recently Müller et al. found an up-regulation of P2X₇ receptors on macrophages from bronchoalveolar lavage and blood eosinophils of patients with chronic asthma [55]. On the other hand, Li et al. found a reduced expression of E-NTPDase 1 in bronchial epithelial cells from a mice model of pulmonary allergy [56], and we also recently

found that peripheral blood leukocytes from patients with a severe asthma exacerbation have decreased ectonucleotidase activity and reduced expression of E-NPP1 [57]. In this context, increased expression of purinergic receptors, along with reduced ectonucleotidase activity, are additional mechanisms capable to enhance the effects of the ATP-evoked ATP/nucleotides release.

5. Conclusions

Our results suggest that ATP induces the release of more ATP or other nucleotides from human leukocytes. This ATP-evoked ATP/nucleotides release appears to be mediated by activation of P2Y_{2,4,6,11} receptors, but participation of P2X receptors could also be involved at higher ATP concentrations.

Disclosures

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was partly supported by grants from CONACYT (219859), DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México (IN200613). The authors acknowledge CONACYT for the fellowship to Marlon De Ita (CVU:390453, scholarship no. 317559). Marlon de Ita is a PhD student in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México and this manuscript will allow him to obtain his PhD degree. Authors greatly appreciate the technical assistance of Luz María García-Hernández.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2015.12.013>.

References

- [1] P. Holton, The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves, *J. Physiol.* 145 (3) (1959) 494–504.
- [2] G. Burnstock, G. Campbell, D. Satchell, A. Smythe, Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut, *Br. J. Pharmacol.* 40 (4) (1970) 668–688.
- [3] P. Bahra, J. Mesher, S. Li, C.T. Poll, H. Danahay, P2Y₂-receptor-mediated activation of a contralateral, lanthanide-sensitive calcium entry pathway in the human airway epithelium, *Br. J. Pharmacol.* 143 (1) (2004) 91–98, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0705913>.
- [4] G.R. Bergfeld, T. Forrester, Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia, *Cardiovasc. Res.* 26 (1) (1992) 40–47.
- [5] G. Burnstock, Hypoxia, endothelium and purines, *Drug Dev. Res.* 28 (1993) 301–305.
- [6] Y. Osipchuk, M. Cahalan, Cell-to-cell spread of calcium signals mediated by ATP receptors in mast cells, *Nature* 359 (6392) (1992) 241–244, <http://dx.doi.org/10.1038/359241a0>.

- [7] E.M. Schwiebert, A. Zsembery, Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1615 (1–2) (2003) 7–32.
- [8] K. Yamamoto, K. Furuya, M. Nakamura, E. Kobatake, M. Sokabe, J. Ando, Visualization of flow-induced ATP release and triggering of Ca^{2+} waves at caveolae in vascular endothelial cells, *J. Cell Sci.* 124 (Pt 20) (2011) 3477–3483, <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.087221>.
- [9] R. Corriden, P.A. Insel, Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation, *Sci. Signal.* 3 (104) (2010) re1, <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.3104re1>.
- [10] A.R. Pinheiro, D. Paramos-de-Carvalho, M. Certal, M.A. Costa, C. Costa, M.T. Magalhaes-Cardoso, F. Ferreirinha, J. Sevigny, P. Correia-de-Sa, Histamine induces ATP release from human subcutaneous fibroblasts via pannexin-1 hemichannels leading to Ca^{2+} mobilization and cell proliferation, *J. Biol. Chem.* (2013) <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.460865>.
- [11] E. Rojas, H.B. Pollard, E. Heldman, Real-time measurements of acetylcholine-induced release of ATP from bovine medullary chromaffin cells, *FEBS Lett.* 185 (2) (1985) 323–327.
- [12] G. Burnstock, A. Verkhratsky, Purinergic signalling and the nervous system, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2012 http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-28863-0_4.
- [13] M. Hattori, E. Gouaux, Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors, *Nature* 485 (7397) (2012) 207–212, <http://dx.doi.org/10.1038/nature11010>.
- [14] G. Burnstock, Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission, *Physiol. Rev.* 87 (2) (2007) 659–797, <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00043.2006>.
- [15] H. Holmsen, H.J. Day, C.A. Setkowsky, Secretory mechanisms. Behaviour of adenine nucleotides during the platelet release reaction induced by adenosine diphosphate and adrenaline, *Biochem. J.* 129 (1) (1972) 67–82.
- [16] S. Hayoz, C. Jia, C. Hegg, Mechanisms of constitutive and ATP-evoked ATP release in neonatal mouse olfactory epithelium, *BMC Neurosci.* 13 (2012) 53, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2202-13-53>.
- [17] J. Chávez, M.H. Vargas, D.C. Rebollar-Ayala, V. Díaz-Hernández, J.E. Cruz-Valderrama, E. Flores-Soto, M. Flores-García, N.N. Jimenez-Vargas, C. Barajas-López, L.M. Montaña, Inhibition of extracellular nucleotides hydrolysis intensifies the allergic bronchospasm. A novel protective role of ectonucleotidases, *Allergy* 68 (4) (2013) 462–471, <http://dx.doi.org/10.1111/all.12113>.
- [18] K.M. Chan, D. Delfert, K.D. Junger, A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -stimulated ATPase activity, *Anal. Biochem.* 157 (2) (1986) 375–380.
- [19] K. Kozlak, J. Sevigny, S.C. Robson, J.B. Siegel, E. Kaczmarek, Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes, *Thromb. Haemost.* 82 (5) (1999) 1538–1544.
- [20] D.B. Leal, C.A. Streher, T.N. Neu, F.P. Bittencourt, C.A. Leal, J.E. da Silva, V.M. Morsch, M.R. Schetinger, Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes, *Biochim. Biophys. Acta* 1721 (1–3) (2005) 9–15, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.09.006>.
- [21] G.I. Lunkes, D. Lunkes, F. Stefanello, A. Morsch, V.M. Morsch, C.M. Mazzanti, M.R. Schetinger, Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies, *Thromb. Res.* 109 (4) (2003) 189–194.
- [22] C. Pilla, T. Emanuelli, S.S. Frassetto, A.M. Battastini, R.D. Dias, J.J. Sarkis, ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets, *Platelets* 7 (4) (1996) 225–230, <http://dx.doi.org/10.3109/09537109609023582>.
- [23] I. von Kugelgen, Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes, *Pharmacol. Ther.* 110 (3) (2006) 415–432, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.08.014>.
- [24] F. Soto, G. Lambrecht, P. Nickel, W. Stuhmer, A.E. Busch, Antagonistic properties of the suramin analogue NF023 at heterologously expressed P2X receptors, *Neuropharmacology* 38 (1) (1999) 141–149.
- [25] J.E. Merritt, W.P. Armstrong, C.D. Benham, T.J. Hallam, R. Jacob, A. Jaxa-Chamiec, B.K. Leigh, S.A. McCarthy, K.E. Moores, T.J. Rink, SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry, *Biochem. J.* 271 (2) (1990) 515–522.
- [26] M. Nagaoka, M. Nara, T. Tamada, H. Kume, T. Oguma, T. Kikuchi, J. Zaini, T. Moriya, M. Ichinose, G. Tamura, T. Hattori, Regulation of adenosine 5'-triphosphate (ATP)-gated P2X₄ receptors on tracheal smooth muscle cells, *Respir. Physiol. Neurobiol.* 166 (1) (2009) 61–67, <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2009.02.002>.
- [27] M.S. Shapiro, L.P. Wollmuth, B. Hille, Modulation of Ca^{2+} channels by PTX-sensitive G-proteins is blocked by N-ethylmaleimide in rat sympathetic neurons, *J. Neurosci.* 14 (11 Pt 2) (1994) 7109–7116.
- [28] M.M. Smith, T.K. Harden, Modification of receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase in NG108-15 neuroblastoma × glioma cells by N-ethylmaleimide, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 228 (2) (1984) 425–433.
- [29] M. Cattaneo, A. Lecchi, M. Ohno, B.V. Joshi, P. Besada, S. Tchilibon, R. Lombardi, N. Bischofberger, T.K. Harden, K.A. Jacobson, Antiaggregatory activity in human platelets of potent antagonists of the P2Y₁ receptor, *Biochem. Pharmacol.* 68 (10) (2004) 1995–2002, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2004.06.026>.
- [30] A. Baroja-Mazo, M. Barbera-Cremades, P. Pelegrin, The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling, *Biochim. Biophys. Acta* 1828 (1) (2013) 79–93, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbame.2012.01.002>.
- [31] P. Pelegrin, A. Surprenant, Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X₇ receptor, *EMBO J.* 25 (21) (2006) 5071–5082, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601378>.
- [32] C.E. Stout, J.L. Costantin, C.C. Naus, A.C. Charles, Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels, *J. Biol. Chem.* 277 (12) (2002) 10482–10488, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109902200>.
- [33] D.C. Spray, Z.C. Ye, B.R. Ransom, Functional connexin “hemichannels”: a critical appraisal, *Glia* 54 (7) (2006) 758–773, <http://dx.doi.org/10.1002/glia.20429>.
- [34] S.A. Levesque, E.G. Lavoie, J. Lecka, F. Bigonnesse, J. Sevigny, Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases, *Br. J. Pharmacol.* 152 (1) (2007) 141–150, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0707361>.
- [35] S. Amadio, N. D'Ambrosi, M.L. Trincavelli, D. Tuscano, G. Sancesario, G. Bernadi, C. Martini, C. Volonte, Differences in the neurotoxicity profile induced by ATP and ATP γ S in cultured cerebellar granule neurons, *Neurochem. Int.* 47 (5) (2005) 334–342, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2005.05.008>.
- [36] M.F. Ethier, J.M. Madison, Adenosine A₁ receptors mediate mobilization of calcium in human bronchial smooth muscle cells, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 35 (4) (2006) 496–502, <http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2005-0290OC>.
- [37] K.A. Jacobson, K.S. Park, J.L. Jiang, Y.C. Kim, M.E. Olah, G.L. Stiles, X.D. Ji, Pharmacological characterization of novel A₃ adenosine receptor-selective antagonists, *Neuropharmacology* 36 (9) (1997) 1157–1165.
- [38] J.M. Dickenson, S. Reeder, B. Rees, S. Alexander, D. Kendall, Functional expression of adenosine A_{2A} and A₃ receptors in the mouse dendritic cell line XS-106, *Eur. J. Pharmacol.* 474 (1) (2003) 43–51.
- [39] M.F. Zizzo, F. Mule, R. Serio, Inhibitory responses to exogenous adenosine in murine proximal and distal colon, *Br. J. Pharmacol.* 148 (7) (2006) 956–963, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0706808>.
- [40] C. Barajas-López, R. Espinosa-Luna, V. Gerzanich, ATP closes a potassium and opens a cationic conductance through different receptors in neurons of guinea pig submucous plexus, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268 (3) (1994) 1397–1402.
- [41] C. Barajas-López, L.M. Montano, R. Espinosa-Luna, Inhibitory interactions between 5-HT₃ and P2X channels in submucosal neurons, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283 (6) (2002) G1238–G1248, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00054.2002>.
- [42] A. Grahner, C. Klein, S. Hauschildt, Involvement of P2X receptors in the NAD⁺-induced rise in $[Ca^{2+}]_i$ in human monocytes, *Purinergic Signal* 5 (3) (2009) 309–319, <http://dx.doi.org/10.1007/s11302-009-9144-4>.
- [43] R.A. North, Molecular physiology of P2X receptors, *Physiol. Rev.* 82 (4) (2002) 1013–1067, <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00015.2002>.
- [44] E. Valdez-Morales, R. Guerrero-Alba, A. Llanan-Rico, R. Espinosa-Luna, S. Zarazua-Guzman, M. Miranda-Morales, L.M. Montano, C. Barajas-López, P2X₇ receptors contribute to the currents induced by ATP in guinea pig intestinal myenteric neurons, *Eur. J. Pharmacol.* 668 (3) (2011) 366–372, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.07.019>.
- [45] M.R. Schetinger, V.L. Vieira, V.M. Morsch, D. Balz, ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 128 (4) (2001) 731–741.
- [46] M.W. Beukers, C.J. Kerkhof, M.A. van Rhee, U. Ardanuy, C. Gurgel, H. Widjaja, P. Nickel, A.P. Ijzerman, W. Soudijn, Suramin analogs, divalent cations and ATP γ S as inhibitors of ecto-ATPase, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 351 (5) (1995) 523–528.
- [47] D. Communi, B. Robaye, J.M. Boeynaems, Pharmacological characterization of the human P2Y₁₁ receptor, *Br. J. Pharmacol.* 128 (6) (1999) 1199–1206, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0702909>.
- [48] J.B. Schachter, T.K. Harden, An examination of deoxyadenosine 5'(α -thio)triphosphate as a ligand to define P2Y receptors and its selectivity as a low potency partial agonist of the P2Y₁ receptor, *Br. J. Pharmacol.* 121 (2) (1997) 338–344, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0701136>.
- [49] S.O. Suadicani, C.F. Brosnan, E. Scemes, P2X₇ receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca^{2+} signaling, *J. Neurosci.* 26 (5) (2006) 1378–1385, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3902-05.2006>.
- [50] P. Bodin, G. Burnstock, Purinergic signalling: ATP release, *Neurochem. Res.* 26 (8–9) (2001) 959–969.
- [51] G. Burnstock, Purinergic signalling and vascular cell proliferation and death, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 (3) (2002) 364–373.
- [52] Y. Baqi, Ecto-nucleotidase inhibitors: recent developments in drug discovery, *Mini-Rev. Med. Chem.* 15 (1) (2015) 21–33.
- [53] G. Burnstock, Purinergic signalling: from discovery to current developments, *Exp. Physiol.* 99 (1) (2014) 16–34, <http://dx.doi.org/10.1113/expphysiol.2013.071951>.
- [54] M. Idzko, H. Hammad, M. van Nimwegen, M. Kool, M.A. Willart, F. Muskens, H.C. Hoogsteden, W. Luttmann, D. Ferrari, F. Di Virgilio, J.C. Virchow Jr., B.N. Lambrecht, Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells, *Nat. Med.* 13 (8) (2007) 913–919, <http://dx.doi.org/10.1038/nm1617>.
- [55] T. Müller, R.P. Vieira, M. Grimm, T. Durk, S. Cicko, R. Zeiser, T. Jakob, S.F. Martin, B. Blumenthal, S. Sorichter, D. Ferrari, F. Di Virgilio, M. Idzko, A potential role for P2X_{7R} in allergic airway inflammation in mice and humans, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44 (4) (2011) 456–464, <http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2010-0129OC>.
- [56] P. Li, J. Cao, Y. Chen, W. Wang, J. Yang, Apyrase protects against allergic airway inflammation by decreasing the chemotactic migration of dendritic cells in mice, *Int. J. Mol. Med.* 34 (1) (2014) 269–275, <http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2014.1771>.
- [57] L.M. Montaña, M.H. Vargas, V. Díaz-Hernández, M. De Ita, R. Kasakova, C. Barajas-López, Decreased expression of ectonucleotidase E-NPPI in leukocytes from subjects with severe asthma exacerbation, *Allergy* (2015) <http://dx.doi.org/10.1111/all.12772> (Epub ahead of print).

BRIEF COMMUNICATION

Decreased expression of ectonucleotidase E-NPP1 in leukocytes from subjects with severe asthma exacerbation

L. M. Montaña^{1,*}, M. H. Vargas^{2,*}, V. Díaz-Hernández³, M. De Ita^{1,3}, R. Kazakova¹ & C. Barajas-López⁴

¹Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México; ²Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias; ³Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF; ⁴División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí (SLP), México

To cite this article: Montaña LM, Vargas MH, De Ita M, Díaz-Hernández V, Kazakova R, Barajas-López C. Decreased expression of ectonucleotidase E-NPP1 in leukocytes from subjects with severe asthma exacerbation. *Allergy* 2016; **71**: 124–128

Keywords

adenosine 5'-triphosphate; ectonucleotidase; E-NPP1; severe asthma exacerbation.

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: +55/56232280
E-mail: lmmr@unam.mx

*Drs. Montaña and Vargas participated equally in this work.

Accepted for publication 21 September 2015

DOI:10.1111/all.12772

Edited by: Michael Wechsler

Abstract

Several studies suggest that ATP and related nucleotides play a role in the pathophysiology of asthma. However, the functionality of ectonucleotidases in this disease has been scantily investigated. We studied total ectonucleotidase activity in leukocytes from patients suffering from asthma exacerbation and explored the expression of E-NTPDase 1, 2, 3, and 8, and E-NPP1, 2, and 3, in their polymorphonuclear cells by immunofluorescence and qPCR. Leukocytes from patients with mild or moderate asthma exacerbation had similar ectonucleotidase activity than leukocytes from healthy subjects, while in patients with severe asthma exacerbation, this activity was lower. Of the ectonucleotidases studied, only E-NPP1 displayed diminished immunofluorescence and a significant decrease in its mRNA expression, both in patients with severe asthma exacerbation. This reduced E-NPP1 expression could be responsible for increased amounts of ATP or other nucleotides, capable of worsening asthma exacerbation, and warranting further investigation.

There is mounting evidence that adenosine 5'-triphosphate (ATP) and related nucleotides play a role in the pathophysiology of bronchoconstriction and asthma. Among the first studies on this issue, Pellegrino et al. found that inhaled ATP caused acute airway obstruction in healthy subjects and that this obstruction was much more intense in patients with asthma (1). Later, Idzko et al. detected increased concentrations of ATP in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid during the course of an antigenic challenge, either in subjects with asthma or in sensitized mice (2). In their study, the authors found that blocking the action of ATP with apyrase (an ATP-degrading enzyme) or suramin (a nonselective antagonist of purinergic receptors) significantly diminished

eosinophilia, airway inflammation, and bronchial hyperresponsiveness. Finally, in a previous study, we found that inhibition of ectonucleotidases with ARL-67156 greatly intensified allergic bronchoconstriction in sensitized guinea pigs, suggesting that ectonucleotidases play a protective role against potential airway obstruction induced by ATP or other nucleotides (3).

Concerning the nucleotide-degrading enzymes, three major groups comprise eight types of ectonucleotide triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDase), seven types of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases (E-NPP), and five isoenzymes of alkaline phosphatases, respectively. Among these, E-NTPDase 1, 2, 3, and 8, and E-NPP1, 2,

and 3 have their catalytic moiety located on the extracellular surface of the plasma membrane (4, 5), conferring the capability to metabolize extracellular ATP.

Li et al. (6) reported reduced expression of E-NTPDase 1 (CD39) in bronchial epithelial cells from a pulmonary allergy model in mice, and they found that this reduction was associated with a higher degree of allergic inflammation in the airways. This same research group demonstrated that in CD39^{-/-} knockout mice, airway inflammation after an antigenic challenge was more intense than in the wild-type mice (7). These studies indicated that a relative deficiency in the extracellular ATP breakdown would worsen allergic airway inflammation. In this context, asthmatic airways have an underlying inflammatory process that greatly accounts for airway hyperresponsiveness and propensity to develop asthma exacerbations. At least hypothetically, this airway inflammation could be enhanced if a relative deficiency of ectonucleotidase activity were present.

Methods

Detailed methods are described in the Online Supporting Information (Appendix S1).

We studied patients with asthma exacerbation, which was categorized as mild, moderate, or severe according to the international criteria. In order to explore whether asthma exacerbation was associated with a relative deficiency of the purine nucleotide metabolism, we determined total ectonucleotidase activity by the inorganic phosphate production technique in leukocytes from these patients and compared this activity with results obtained in a healthy control group (blood donors). Likewise, we explored the type and level of expression of ectonucleotidases in polymorphonuclear cells (PMNs) from all subjects by analyzing the protein and mRNA expression through immunofluorescence and quantitative PCR (qPCR), respectively.

Results

As can be observed in Fig. 1, after the addition of 500 μ M ATP to the leukocytes, there was a progressive, time-dependent increment of the inorganic phosphate concentration in all groups, suggesting the occurrence of an active breakdown of ATP by membrane ectonucleotidases. Cells from patients with mild or moderate asthma exacerbation showed a similar response to that in healthy control subjects. In contrast, in patients with severe asthma exacerbation, ectonucleotidase activity was notably lower than in the control group, reaching a statistically significant difference at the end of the period studied (128 min, $P < 0.01$) and in the whole area under the curve ($P < 0.05$).

Concerning the expression of membrane ectonucleotidases, E-NTPDase 3 and 8 were not detected in PMNs by immunofluorescence (data not shown). Although qPCR was also unable to detect E-NTPDase 8 mRNA, in the case of E-NTPDase 3, the qPCR indeed detected the mRNA in PMNs from healthy subjects, but values were very close to the equipment's detection limit (data not shown), while it

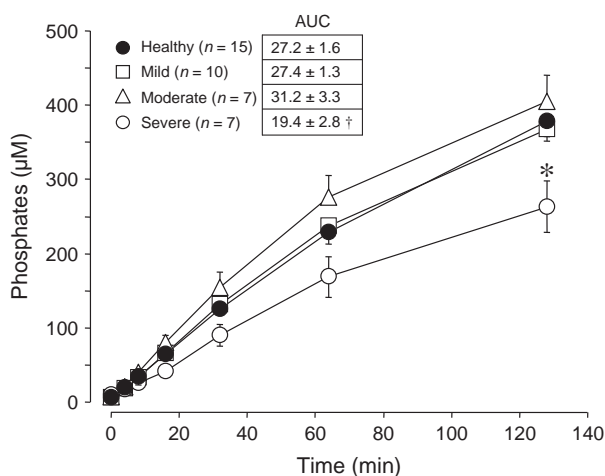


Figure 1 Measurement of total ectonucleotidase activity in healthy control subjects and patients with a mild, moderate, or severe asthma exacerbation. Time-dependent release of inorganic phosphates was measured by the malachite green method after adding 500 μ M ATP to polymorphonuclear + mononuclear cells isolated from peripheral blood. Symbols correspond to mean \pm SEM. The inset shows the area under the curve (AUC, arbitrary units) of each group. * $P < 0.01$ and † $P < 0.05$ vs the healthy group (Dunnnett test after ANOVA).

was absent in samples from subjects with asthma. Of the remaining ectonucleotidases, E-NPP1 was the enzyme exhibiting the most striking changes (Fig. 2). In this regard, immunofluorescence for E-NPP1 was clearly observed in cells from healthy controls, and this expression appeared to be similar in cells from patients with mild or moderate asthma exacerbations. In contrast, PMNs from patients with severe asthma exacerbation displayed a dramatic diminution of immunofluorescence to E-NPP1. These findings were in line with results from qPCR, in which mRNA expression was notably diminished in patients with severe asthma exacerbation ($P < 0.005$ vs the control group).

With respect to E-NPP2 and 3 (Figure S1), as well as for E-NTPDase 1 and 2 (Figure S2), there were no apparent changes in immunofluorescence between healthy controls and patients with asthma. Likewise, there were no statistically significant changes in mRNA expression between the groups studied.

Discussion

We found that patients with severe asthma exacerbation had lower ectonucleotidase enzymatic activity in their peripheral blood leukocytes. This was accompanied by a significant decrease in the expression of E-NPP1 mRNA and a noticeable reduction in the protein immunolabeling of this ectonucleotidase in PMNs.

Currently, there is increasing awareness that ATP and related nucleotides are involved in a number of pathophysiological lung responses, such as bronchoconstriction,

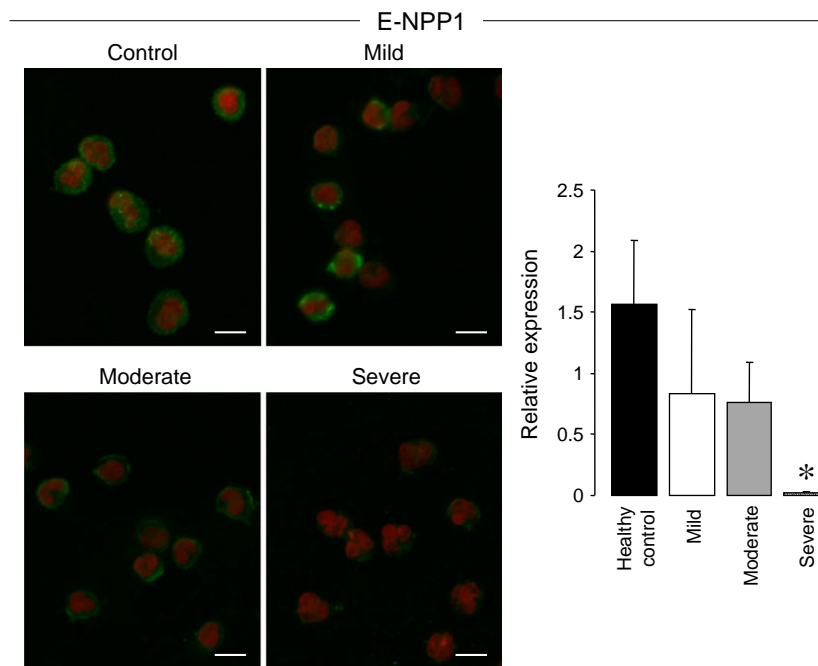


Figure 2 Diminished expression of ectonucleotidase pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (E-NPP1) in polymorphonuclear cells from patients with a severe asthma exacerbation. Images correspond to representative examples of E-NPP1 immunofluorescence staining (green) combined with nuclear staining with TOTO-3 iodide (red). The graph shows the relative expression of E-NPP1 mRNA

as detected by qPCR analyzed with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. * $P < 0.005$ vs healthy group (Student's *t*-test corrected by the Bonferroni method). Number of experiments in either technique was 6, 4, 11, and 11 for healthy controls and patients with mild, moderate, and severe asthma exacerbation, respectively. The horizontal bar in each panel corresponds to 10 μ m.

inflammation, and airway smooth muscle remodeling (2, 3, 8). Thus, an exquisite regulation controlling extracellular ATP levels through its enzymatic breakdown by ectonucleotidases must exist to avoid these harmful effects. Multiple types of stimuli are able to trigger the release of ATP from non-neuronal cells, including antigenic challenge, Th2-type cytokines, such as IL-4 and IL-13, tobacco smoke, receptor-mediated stimulation, physical perturbation, ischemia, hypoxia, and interaction with pathogens (9–13). Moreover, in the majority of living tissues, massive release of ATP acts as an indicator of cell damage. It is conceivable that many of these ATP-releasing mechanisms could be operating in the asthmatic airways, where an inflammatory process is well known to be established. In this context, a reduction in the ectonucleotidase activity in patients with severe asthma exacerbation could be associated with larger amounts of ATP in the lung.

The decrease in E-NPP1 immunoreactivity and mRNA expression suggests that probably this is one of the ectonucleotidases responsible for the lower enzymatic activity in PMNs from patients with severe asthma exacerbation. Some authors have already found that ectonucleotidases expression may be reduced in pathological states. Thus, Li et al. (6, 7) demonstrated that E-NTPDase 1 expression in bronchial epithelium was decreased in a mice model of allergic airway inflammation. Recently, Wang et al. found that mRNA expression of CD39 (i.e., E-NTPDase 1) was diminished in peripheral blood mononuclear cells from 18 patients with

persistent asthma and allergy to house dust mites (14). This last study was contrasting with our results, inasmuch as we did not find modifications of the E-NTPDase 1 mRNA, but this difference might be due to the different cell type that we studied (PMNs).

Asthma exacerbations can develop within a wide range of severity. Although severe asthma exacerbations are relatively uncommon, they often require admission to hospital or intensive care unit (15). Furthermore, severe asthma exacerbations are mainly responsible for deaths due to asthma. Thus, elucidation of mechanisms leading to this heightened severity is important. According to our results, decreased expression and activity of ectonucleotidases in leukocytes, especially E-NPP1, could be one such mechanism.

Some studies have shown that during severe asthma exacerbation, airway inflammation tends to be neutrophilic in nature, mainly if the crisis fully developed in a few hours in so-called sudden-onset fatal or near-fatal asthma (16). Neutrophils appear to play an additional role in asthma cases with persistent airway obstruction and relative insensitivity to inhaled corticosteroids (17). Some molecules have traditionally been considered major chemotactic agents for neutrophils, such as CXCL8 (IL-8) and leukotriene B₄ (LTB₄) (18, 19). However, it is increasingly evident that secondary release of ATP from these cells, with ensuing autocrine stimulation through P2Y₂ receptors, is highly relevant for the cellular orientation in the chemotactic gradient. Moreover, once

ATP is metabolized by ectonucleotidases, the resulting adenosine molecule is important for enhancing cell-migration speed through the activation of A₃ receptors (20). In this regard, during asthma exacerbation, decreased activity and/or expression of ectonucleotidases in peripheral leukocytes (as found by our group in the present study, and by Wang et al. (14)) or in other location, such as airway epithelium (as found by other authors (6)), accompanied by increased amounts of local extracellular ATP due to the inflammatory process, would explain the large number of PMNs infiltrating the airways in the most severe episodes.

Our finding that ectonucleotidase activity is decreased in severe asthma exacerbation raises the interesting speculation that the administration of an exogenous ectonucleotidase such as apyrase may improve the therapeutic management of these patients. Apyrase has been shown to inhibit the development of airway inflammation in a murine model of allergic asthma (6), and we already found that its intratracheal administration greatly diminished allergic bronchospasm in guinea pigs (3).

One limitation of the study was that we were unable to follow up the patients after their severe asthma exacerbation subsided. Thus, we could not discern whether the reduced ectonucleotidase activity and E-NPPI expression were due to severe asthmatic exacerbation or whether it was a long-standing feature of patients prone to develop severe exacerbations. If the latter possibility were true, then it would be interesting to investigate the origin of these ectonucleotidase abnormalities.

In conclusion, we found that patients with severe asthma exacerbation had reduced activity of leukocyte ectonucleotidases and reduced expression of E-NPPI in PMNs. The biological relevance of these findings warrants further research.

Acknowledgments

This study was partly supported by grants from CONACYT (219859), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México (IN200613) and a post-doctoral scholarship given to Renata Kazakova from DGAPA, UNAM. Authors acknowl-

edge CONACYT for the scholarship (390453) to Marlon De Ita Ley. This manuscript will enable Marlon De Ita Ley to obtain his PhD degree in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Authors greatly appreciate the valuable help of the personnel from the Emergency Room of the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Authors' contributions

LMM contributed to the design and global supervision of the study, data analysis, and the writing of the manuscript. MHV contributed to the study design, data analysis, and writing of the manuscript. MDIL participated in the recruitment and blood sampling of control subjects and patients with asthma, leukocyte purification, qPCR experiments, and the writing of the manuscript. VD contributed to confocal experiments, mRNA extraction, and qPCR experiments. RK participated in the recruitment and blood sampling of control subjects and patients with asthma, and in the measurement of ectonucleotidase activity. CBL contributed to the critical revision 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:

Figure S1. Expression of E-NPPI2 and E-NPPI3 in polymorphonuclear cells from healthy controls and patients with an asthma exacerbation.

Figure S2. Expression of E-NTPDase 1 and E-NTPDase 2 in polymorphonuclear cells from healthy controls and patients with an asthma exacerbation.

Appendix S1. Detailed Materials and Methods.

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.
- Chavez J, Vargas MH, Rebollar-Ayala DC, Diaz-Hernandez V, Cruz-Valderrama JE, Flores-Soto E et al. Inhibition of extracellular nucleotides hydrolysis intensifies the allergic bronchospasm. A novel protective role of ectonucleotidases. *Allergy* 2013;**68**:462–471.
- Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2006;**2**:409–430.
- Stefan C, Jansen S, Bollen M. Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. *Purinergic Signal* 2006;**2**:361–370.
- Li P, Cao J, Chen Y, Wang W, Yang J. Apyrase protects against allergic airway inflammation by decreasing the chemotactic migration of dendritic cells in mice. *Int J Mol Med* 2014;**34**:269–275.
- Li P, Gao Y, Cao J, Wang W, Chen Y, Zhang G et al. CD39 regulatory T cells attenuate allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 2015;**45**:1126–1137.
- Michoud MC, Napolitano G, Maghni K, Govindaraju V, Cogo A, Martin JG. Effects of extracellular triphosphate nucleotides and nucleosides on airway smooth muscle cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;**27**:732–738.
- Baxter M, Eltom S, Dekkak B, Yew-Booth L, Dubuis ED, Maher SA et al. Role of transient receptor potential and pannexin channels in cigarette smoke-triggered ATP release in the lung. *Thorax* 2014;**69**:1080–1089.
- Burnstock G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;**22**:364–373.

11. Corriden R, Insel PA. Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Sci Signal* 2010;**3**(104 re1):1–12.
12. Gao YD, Cao J, Li P, Huang G, Yang J. Th2 cytokine-primed airway smooth muscle cells induce mast cell chemotaxis via secretion of ATP. *J Asthma* 2014;**51**:997–1003.
13. Pinheiro AR, Paramos-de-Carvalho D, Certal M, Costa MA, Costa C, Magalhaes-Cardoso MT et al. Histamine induces ATP release from human subcutaneous fibroblasts via pannexin-1 hemichannels leading to Ca²⁺ mobilization and cell proliferation. *J Biol Chem* 2013;**288**:27571–27583.
14. Wang LL, Tang PH, Shi CG, Wan YH, Tang W, Hou XX et al. Expression of CD39 mRNA is altered in the peripheral blood of patients with allergic asthma. *Biomed Rep* 2014;**2**:75–78.
15. Picado C. Classification of severe asthma exacerbations: a proposal. *Eur Respir J* 1996;**9**:1775–1778.
16. Sur S, Crotty TB, Kephart GM, Hyma BA, Colby TV, Reed CE et al. Sudden-onset fatal asthma. A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa? *Am Rev Respir Dis* 1993;**148**:713–719.
17. Choi JS, Jang AS, Park JS, Park SW, Paik SH, Uh ST et al. Role of neutrophils in persistent airway obstruction due to refractory asthma. *Respirology* 2012;**17**:322–329.
18. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013;**13**:159–175.
19. Mukaida N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int J Hematol* 2000;**72**:391–398.
20. Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A et al. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y₂ and A₃ receptors. *Science* 2006;**314**:1792–1795.

Anexo

Anexo 1.- Clasificación de la gravedad de la exacerbación asmática

La gravedad de la exacerbación asmática se clasificará de acuerdo a la propuesta por GINA según la siguiente tabla:

Gravedad de la exacerbación asmática (en adultos)*				
	LEVE	MODERADA	GRAVE	PARO RESPIRATORIO INMINENTE
Disnea	<ul style="list-style-type: none"> • Al caminar • Puede acostarse 	<ul style="list-style-type: none"> • Al hablar • Prefiere sentarse 	<ul style="list-style-type: none"> • En reposo • Inclinado hacia adelante 	
Habla	Oraciones completas	Frases	Palabras	
Estado de alerta	Puede estar agitado	Usualmente agitado	Usualmente agitado	Adormilado o confuso
Frecuencia respiratoria	Aumentada	Aumentada	A menudo >30/min	
Uso de músculos accesorios y retracción suprasternal	Usualmente no	Usualmente	Usualmente	Movimiento tóraco-abdominal paradójico
Sibilancias	Moderadas, a menudo solo espiratorias	Audibles	Usualmente audibles	Ausencia de sibilancias
Pulso/min	<100	100-120	>120	Bradicardia
Pulso paradójico	<ul style="list-style-type: none"> • Ausente • <10 mmHg 	<ul style="list-style-type: none"> • Puede estar presente • 10-25 mmHg 	<ul style="list-style-type: none"> • A menudo presente • >25 mmHg 	La ausencia sugiere fatiga de músculos respiratorios

VEF ₁ después del broncodilatador inicial (% del predicho o del mejor valor personal)	Más de 80%	Aproximadamente entre 60-80%	<ul style="list-style-type: none"> • <60% • <100 L/min • La respuesta dura <2 h 	
PaO ₂ (inhalando aire) y/o PaCO ₂	<ul style="list-style-type: none"> • Normal • La prueba no suele ser necesaria • <45 mmHg 	>60 mmHg <45 mmHg	<60 mmHg Posible cianosis >45 mmHg; Posible insuficiencia respiratoria	
%SaO ₂ (inhalando aire)	>95%	91-95%	<90%	
Hipercapnia (hipoventilación) se desarrolla más en niños que en adultos y adolescentes				
* Nota: La presencia de varios parámetros, pero no necesariamente todos, indica la clasificación general de la exacerbación				

Anexo 2.- Soluciones empleadas

Buffer de lisis

Solución de 600 mg NaHCO₃, 4.15 g NH₄Cl, y 18 mg EDTA en 500 ml H₂O destilada.

Solución de trabajo

Solución con 120 mM NaCl, 5 mM de KCl, 60 mM de glucosa, 0.5 mM de CaCl₂, 50 mM de Tris-HCl pH 8.0 en agua destilada.



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN
PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

PAPEL DE LAS ECTONUCLEOTIDASAS EN EL ASMA

México DF, a _____ de _____ de 20____.

Lo estamos invitando a participar en este estudio de investigación que se está llevando a cabo en 40 pacientes que, como usted, tienen asma y acudieron a Urgencias porque están atravesando por una crisis asmática. Por favor, lea cuidadosamente esta carta y si está de acuerdo con ella y con participar en el estudio, fírmela.

Objetivo del estudio

El propósito del estudio es conocer si una proteína que está en la sangre y que se llama “ectonucleotidasa” tiene algo que ver con la intensidad de las crisis asmáticas y con la gravedad a largo plazo del asma.

En que consiste su participación

Si acepta entrar en el estudio, su participación consistirá en que en un rato más le tomaremos una muestra de 10 ml de sangre de una vena del antebrazo, para lo cual emplearemos jeringas y agujas nuevas y desechables. Aproximadamente un mes después le volveremos a tomar otra muestra de 10 ml de sangre durante su visita de control en la consulta externa. La única molestia de la toma de sangre es el dolor pasajero del piquete en la vena y la única complicación que podría haber sería que se le hiciera un pequeño moretón, que desaparece en algunos días. Aparte de las dos muestras de sangre, no se le pedirá ninguna otra cosa, ya que toda la información que necesitamos sobre su enfermedad será tomada de su expediente

Qué pasa si no participa, o si acepta y luego quiere retirarse

Usted no está obligado(a) a participar, y si decide no hacerlo nadie se enojará con usted ni se tomarán represalias ni perderá sus derechos como paciente del INER. Además, si toma la decisión de retirarse usted conserva el derecho de retirarse del estudio en cualquier momento, incluso aunque ya haya firmado esta carta, y esto no afectará para nada la atención médica que recibe del hospital.

Gastos o beneficios

Usted no recibirá pago alguno por su participación en este estudio ni obtendrá ningún beneficio inmediato. Pero por otro lado su participación no representará ningún gasto extra para usted, y los resultados nos ayudarán mucho a comprender mejor la enfermedad y tal vez en el futuro desarrollar mejores alternativas para su tratamiento.

Sobre su privacidad

Una vez que se termine el estudio seguramente los resultados se presentarán en congresos y se publicarán en alguna revista, pero en todo momento protegeremos su privacidad ya que ni su nombre u otros datos personales aparecerán en ningún lado

Dudas que pueda tener

Los investigadores nos comprometemos a responder cualquier pregunta y a aclarar cualquier duda que pueda tener acerca del estudio, de los riesgos, beneficios o de cualquier otro asunto relacionado con la investigación. Puede comunicarse directamente con:

Dr. Luis M Montaña o Dr. Mario H. Vargas a los teléfonos 54871771 y 54871736, o a los correos electrónicos Immr@unam.mx o mhvargasb@yahoo.com.mx.

En caso de dudas sobre sus derechos como participante del estudio puede contactar a la Dra. Rocío Chapela Mendoza, Presidente del Comité de Ciencia y Bioética en Investigación, al teléfono 54871700 ext. 5254 ó 5110.

Nombre y Firma del Participante

Fecha

Nombre y Firma del Investigador

Fecha

Nombre y Firma del Testigo 1

Fecha

Nombre y Firma del Testigo 2

Fecha