

## SEÑALES PURINERGICAS

<sup>1</sup>EDUARDO R. LAZAROWSKI, <sup>2</sup>PABLO J. SCHWARZBAUM

<sup>1</sup>*School of Medicine, Department of Medicine, The Cystic Fibrosis Treatment and Research Center, University of North Carolina, USA;* <sup>2</sup>*Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQUIFIB), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*

**Resumen** En la última década se ha aportado clara evidencia de que tanto nucleósidos como nucleótidos de adenina y uridina pueden funcionar como factores de señalización extracelular. Su acción es mediada por dos tipos principales de receptores de superficie denominados purinérgicos. Los receptores P1 se activan por adenosina, y son todos metabotrópicos, mientras que los receptores de nucleótidos (ATP, ADP, UTP y UDP) y nucleótidos-azúcares (UDP-glucosa y UDP-galactosa) pueden ser metabotrópicos (P2Y) o ionotrópicos (P2X). La importancia y complejidad de este sistema de señalización se evidencia por la diversidad de mecanismos de liberación de nucleótidos al medio extracelular y por la distribución ubicua de varios grupos de ectonucleotidasas capaces de catalizar la degradación y conversión de nucleótidos. Hasta el momento se han descrito y clonado una veintena de estos receptores que modulan una variedad de respuestas, como el impulso nervioso, la respuesta inflamatoria, la secreción de insulina, la regulación del tono vascular y la percepción del dolor. En la presente revisión se describen las características estructurales y farmacológicas de los receptores purinérgicos y se analiza la interacción dinámica entre estos receptores, los nucleósidos y nucleótidos, y las ectonucleotidasas, con especial atención a la dinámica de la agregación plaquetaria, la respuesta inmune y la hidratación de las mucosas respiratorias.

**Palabras clave:** receptores purinérgicos, ecto-apirasa, CFTR, transducción de señal

**Abstract** *Purinergic signals.* In the last decade evidence accumulated that nucleosides and nucleotides of both uridine and adenine can act as extracellular signaling factors. Their action is mediated by two main types of surface receptors commonly known as purinergic. P1 receptors are metabotropic and activated by adenosine, whereas receptors for nucleotides (ATP, ADP, UTP and UDP) and nucleotide-sugars (UDP-glucose and UDP-galactose) can be either metabotropic (P2Y) or ionotropic (P2X). The importance and complexity of this signaling system is evidenced by various mechanisms of nucleotide release, as well as by the ubiquitous distribution of various types of ectonucleotidases which catalyze and convert extracellular nucleotides. Up to now about twenty receptors have been cloned and found to modulate the nerve impulse, inflammatory response, insulin secretion, the regulation of the vascular tone and nociception, among other processes. In the present review we describe the main structural and pharmacological features of purinergic receptors, and analyze how the dynamic interaction between these receptors, nucleotides and nucleosides, and ectonucleotidases modulate several biological responses. Particular focus is given to platelet aggregation and thrombus formation, the immune response and the hydration of the mucosal linings of the respiratory tract.

**Key words:** purinergic receptors, ecto-apyrase, CFTR, signal transduction

Los nucleósidos y nucleótidos son componentes esenciales de todo sistema biológico. Forman parte de la estructura de los ácidos nucleicos, son fuente de energía en la gran mayoría de los procesos metabólicos y participan como co-factores en numerosas reacciones bioquímicas. Un nucleósido consta de una base nitrogenada

unida a una ribosa o deoxiribosa. Los nucleótidos resultan de la unión de un nucleósido con uno, dos o tres fosfatos identificados con las letras griegas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . De acuerdo al tipo de base nitrogenada que posean, los nucleósidos y sus nucleótidos se denominan purinas o pirimidinas. Los nucleósidos adenosina y guanósina son purinas, mientras que la uridina, la timidina, y la citosina son pirimidinas. Los nucleótidos se encuentran en la célula mayoritariamente libres en forma de nucleósido trifosfato, el más abundante de los cuales es el ATP. Le siguen en abundancia la uridina trifosfato (UTP), guanósina trifosfato (GTP), adenosina difosfato (ADP), y ciertos nucleótidos-azúcares. En menor concentración se encuentran los nucleósidos monofosfatos.

Recibido: 12-VIII-2008

Aceptado: 20-II-2008

**Dirección postal:** Dr. Pablo J. Schwarzbaum, IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina.  
Fax (54-11) 4 962 5457 e-mail: pablos@qb.ffyb.uba.ar

Además de sus funciones dentro de las células, los nucleótidos pueden ser liberados al medio extracelular, donde gatillan diversas respuestas mediante su interacción con receptores de superficie denominados *receptores purinérgicos*. El presente artículo se propone discutir brevemente tres aspectos importantes relacionados a la señalización mediada por nucleótidos extracelulares: ¿Cuál es el papel fisiológico de los nucleótidos extracelulares? ¿Qué mecanismos regulan la liberación celular de los nucleótidos? ¿Qué son y cómo funcionan los receptores purinérgicos?

## Reseña histórica

Cerca de setenta años han transcurrido desde que Fritz Lipmann y Herman Kalckar establecieron que el ATP es el principal dador de energía metabólica en los sistemas biológicos. El concepto ha sido verificado hasta el presente por incontables trabajos de fisiólogos y bioquímicos. La energía almacenada en el enlace fosfato terminal (fosfato  $\gamma$ ) del ATP es obtenida primariamente a partir del metabolismo de la glucosa, azúcar que se almacena en el organismo en forma de glucógeno. Un hito importante en el estudio del papel de los nucleótidos en las reacciones de transferencia de energía fue el descubrimiento, por Leloir y su grupo, del nucleótido-azúcar UDP-glucosa, un intermediario en la incorporación de la glucosa al glucógeno. Un cuarto de siglo más tarde estos trabajos le valdrían a Leloir el premio Nobel en Química<sup>1</sup>.

Entre muchas otras funciones, los nucleótidos son las unidades que forman la estructura compleja del ADN y ARN. Algunos derivados de nucleótidos sirven como intermediarios en reacciones biosintéticas, como por ejemplo los nucleótidos-azúcares UDP-galactosa y UDP-N-acetilglucosamina que participan en la síntesis de glicoproteínas (proteínas unidas a polisacáridos) y fosfolípidos. Ciertos nucleótidos complejos (nicotina-adenina-dinucleósido o NAD, flavina-adenina-dinucleósido o FAD, y otros) sirven de cofactores en numerosas reacciones enzimáticas, mientras que algunos nucleótidos participan como cofactores (GTP) o como segundos mensajeros (Ej. AMP cíclico) en la transducción de señales. Es a través de estos segundos mensajeros que los estímulos externos desencadenan respuestas celulares específicas. Los nucleótidos extracelulares pueden activar un tipo específico de proteína G. Por ejemplo, la proteína  $G_s$  activa la enzima adenilato ciclasa (AC) que convierte al ATP citosólico en AMP cíclico (AMPc), un potente segundo mensajero que estimula numerosas respuestas celulares (Fig. 1).

Dado que tanto el ATP como los demás nucleótidos y nucleótidos-azúcares no atraviesan libremente la membrana plasmática, se supuso durante mucho tiempo que estas moléculas sólo podrían existir en el interior de la

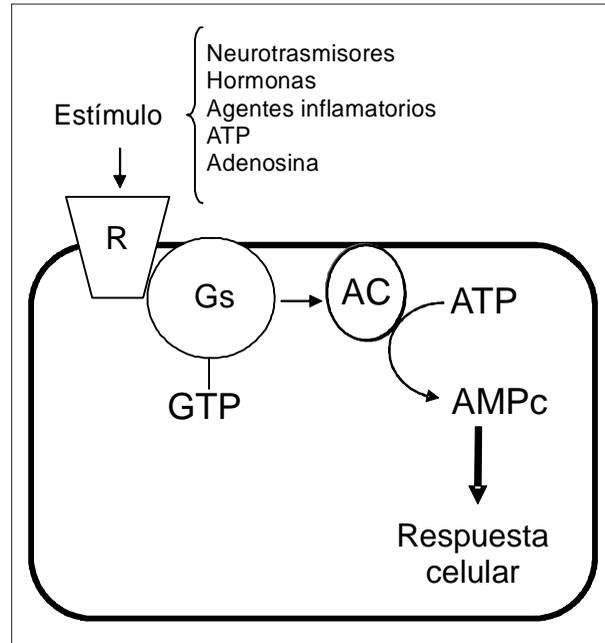


Fig. 1.- Nucleótidos y transducción de señales. La activación de receptores (R) de superficie por un estímulo externo causa la activación de un tipo de proteína G. La proteína  $G_s$  activa la enzima adenilato ciclasa (AC) que convierte al ATP citosólico en el segundo mensajero AMP cíclico (AMPc).

célula. Esta visión era reforzada principalmente por ser el ATP la moneda energética de las reacciones intracelulares. Dado que la célula posee complejos mecanismos de síntesis y reserva de nucleótidos, era esperable que también poseyera mecanismos que evitaran la salida de estos componentes. Este concepto comenzaría a cambiar cuando en 1970 Geoffrey Burnstock, pionero en el estudio de la señalización por nucleótidos, postulara que el ATP podría actuar como transmisor en el espacio sináptico<sup>2,3</sup>.

Deberían transcurrir otros veinte años hasta que se aceptara definitivamente la idea de que los nucleótidos actúan como factores de señalización extracelular. La identificación a nivel genético y molecular de una veintena de receptores de superficie que traducen en respuesta fisiológica la presencia extracelular de los nucleótidos y nucleósidos (Figs. 2 y 3), ha convertido al campo de los *receptores purinérgicos* en uno de los de mayor expansión de la farmacología y fisiología modernas<sup>4,5</sup>.

Si bien inicialmente el término *purinérgico* hacía referencia a los nervios que utilizan ATP como su principal neurotransmisor, actualmente "*purinérgico*" se refiere más ampliamente a las señales impartidas por nucleótidos y nucleósidos extracelulares en todo tipo de células. Es así que varios receptores son activados por pirimidinas (UTP, UDP, UDP-glucosa), como veremos más adelante.

Dos factores adicionales han contribuido al desarrollo de las investigaciones en el campo de los receptores purinérgicos. Primero, la identificación y caracterización de varios grupos de ecto-nucleotidasas, enzimas de membrana que hidrolizan nucleótidos extracelulares, posibilitó comprender cómo se controlan los niveles extracelulares de los nucleótidos, y por ende, la duración y magnitud del estímulo purinérgico<sup>6</sup>. Segundo, el desarrollo de técnicas analíticas (fluorométricas y radiométricas) de alta sensibilidad verificó la presencia extracelular de nucleótidos y nucleósidos en la mayoría de los tejidos<sup>4,7</sup>.

Actualmente, el nucleósido adenosina, los nucleótidos ATP, ADP, UTP, y UDP, y ciertos nucleótidos-azúcares (UDP-glucosa, UDP-galactosa) son reconocidos como potentes y selectivos mensajeros extracelulares que controlan, entre otras funciones, el impulso nervioso, la respuesta inflamatoria, la secreción de insulina, la agregación plaquetaria, la hidratación y protección de las mucosas respiratorias, la regulación del tono vascular y la percepción del dolor. Tantas son las funciones fisiológicas reguladas por los nucleótidos extracelulares y sus receptores que el interés en el tema ha experimentado en los últimos años un crecimiento exponencial. Sólo a partir del año 2005, se han publicado más de 2 000 artículos científicos avalando el rol fisiológico de los receptores purinérgicos.

### Aspectos estructurales y farmacológicos de los receptores purinérgicos

Las acciones extracelulares de los nucleótidos son mediadas por dos familias de receptores purinérgicos, los receptores P2X y P2Y (Fig. 2). Una tercera familia, constituida por los llamados receptores P1, reconoce como activador (agonista) selectivo al nucleósido adenosina (Fig. 2). Los receptores P2X poseen dos dominios hidrofóbicos expandidos a través de la membrana plasmática, formados por 20-30 aminoácidos mayoritariamente no polares, y que por lo tanto tienden a disponerse alejados del contacto con el agua. Ambos dominios hidrofóbicos están unidos entre sí por una extensa cadena extracelular de aminoácidos predominantemente polares. Dos dominios hidrofílicos relativamente pequeños se expanden hacia el interior de la célula formando los segmentos amino- y carboxi-terminales de estos receptores. La característica estructural saliente de los receptores P2Y y P1 es la presencia de siete dominios hidrofóbicos expandidos a través de la membrana plasmática, separando al segmento amino-terminal extracelular del carboxi-terminal citosólico (Fig. 2).

Los receptores P2X (P2X<sub>1</sub>-P2X<sub>7</sub>) conforman poros o canales catiónicos (principalmente canales de calcio, Ca<sup>2+</sup>) que se activan (abren) en presencia de ATP ex-

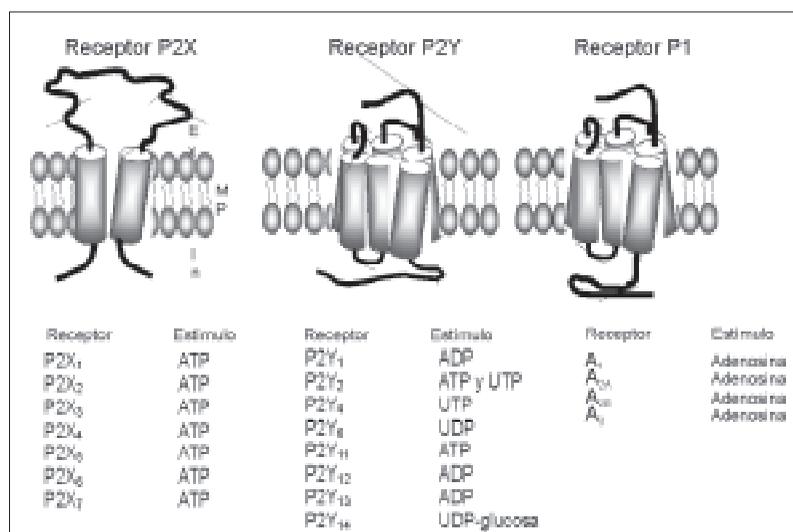


Fig. 2.— Estructura y selectividad de los receptores purinérgicos P2X, P2Y y P1. El esquema ilustra los dominios hidrofóbicos dispuestos en la membrana plasmática (MP), y los dominios hidrofílicos que se expanden hacia el interior (In) o el exterior (Ex) de la célula. En la parte inferior se indican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

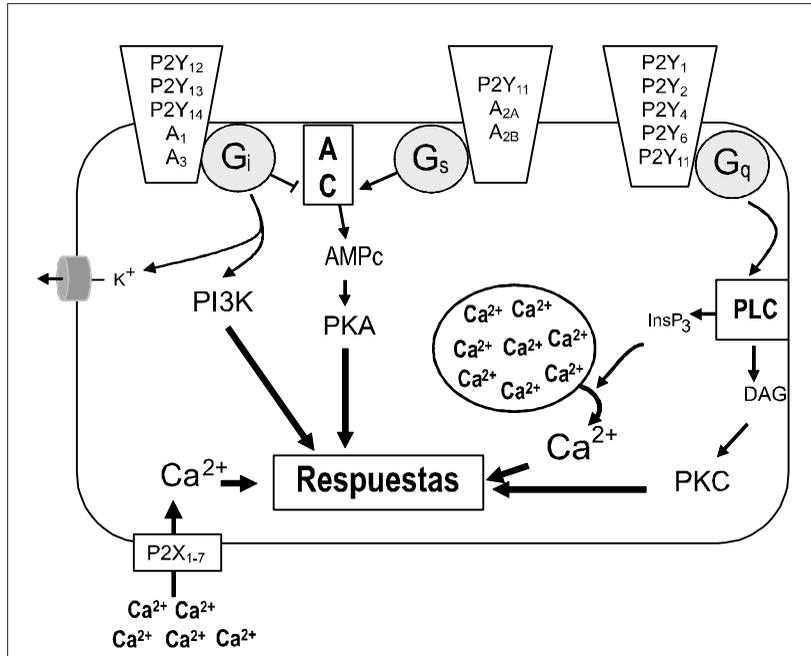


Fig. 3.— Mecanismos de acción de los receptores purinérgicos. Los receptores P2Y y P1 están acoplados selectivamente a diversos tipos de proteína G, las cuales en respuesta a la estimulación del receptor activan distintas enzimas, generando segundos mensajeros. Los receptores P2X son canales catiónicos.

tracelular. Ni el ADP, ni la adenosina, ni los nucleótidos de uridina activan a estos receptores<sup>8</sup>.

Los receptores P2Y reconocen como agonistas selectivos a distintos nucleótidos de adenina y/o uridina (Fig. 2), y pertenecen a la superfamilia de los llamados *receptores acoplados a proteínas G* (indicados en inglés con la sigla GPCR)<sup>9</sup>.

Cuando un receptor de tipo GPCR se activa, produce un cambio conformacional en la proteína G y seguidamente la activación de enzimas que promueven la activación de señales intracelulares o segundos mensajeros. En la Fig. 3 se ilustran las selectividades de los receptores P2Y para distintos tipos de proteínas G ( $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$ ) y los segundos mensajeros generados por las mismas. El grupo mayoritario de receptores P2Y ( $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$ ,  $P2Y_4$ ,  $P2Y_6$  y  $P2Y_{11}$ ) está acoplado a la proteína  $G_q$ , que activa a la fosfolipasa C (PLC) y genera como segundos mensajeros al inositol tri-fosfato ( $InsP_3$ ) y el diacil-glicerol (DAG).

El  $InsP_3$  promueve la movilización de  $Ca^{2+}$  de compartimentos intracelulares; el DAG activa a la proteína quinasa C (PKC). El receptor  $P2Y_{11}$ , además de acoplarse a  $G_q$ , se acopla a  $G_s$ , promoviendo la estimulación de la enzima adenilato ciclasa (AC), aumentando la producción de AMP cíclico (AMPc). Los receptores  $P2Y_{12}$ ,  $P2Y_{13}$  y  $P2Y_{14}$  están acoplados a la proteína  $G_i$  que inhibe la adenilato ciclasa, regula ciertos canales iónicos, y ac-

tiva una quinasa de fosfolípidos, la PI-3 quinasa (PI3K). Los receptores P1 (de adenosina) están acoplados ya sea a  $G_i$  (receptores  $A_1$  y  $A_3$ ) o a  $G_s$  (receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$ ). Los receptores P2X son canales iónicos y su activación resulta en la entrada de  $Ca^{2+}$  desde el espacio extracelular.

Los receptores de adenosina, de los cuales hay cuatro tipos ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ ), sólo se activan por este nucleósido y, al igual que los receptores P2Y, están acoplados a proteínas G. Estos receptores fueron inicialmente denominados P1 para diferenciarlos de los receptores P2 activados por nucleótidos.

El grado de activación de los receptores purinérgicos depende del tipo y concentración de los nucleótidos extracelulares. Por ende, antes de analizar el papel fisiológico de estos receptores, es conveniente discutir cómo se liberan los nucleótidos, y una vez en el espacio extracelular, qué tipo de reacciones permiten que éstos se conviertan y/o degraden.

### Mecanismos de liberación de nucleótidos

La liberación celular de nucleótidos es reconocida hoy día como un fenómeno fisiológico generalizado<sup>10</sup>. El ATP, ADP, adenosina, UTP, UDP, y UDP-glucosa, todos ellos potentes y selectivos agonistas purinérgicos, se encuen-

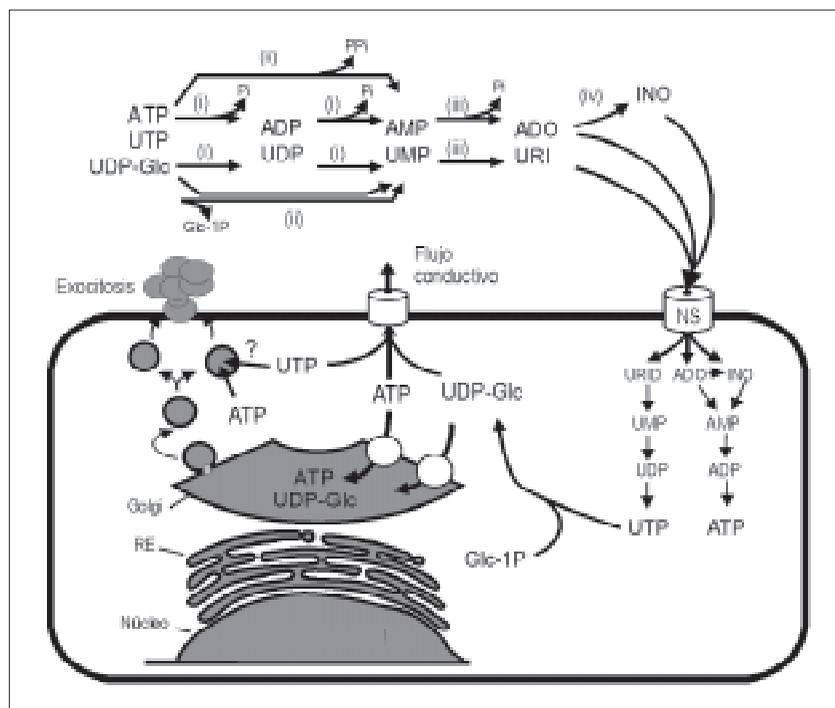


Fig. 4.- Liberación y metabolismo extracelular de nucleótidos. La liberación celular de nucleótidos puede ocurrir por flujo conductivo o exocitosis. Tanto el UTP como el ATP pueden ser degradados a nucleósidos di- (NDPs) y monofosfato (NMPs) por E-NTPDasas (i). Además, tanto el ATP como el UTP y la UDP-glucosa (UDP-Glc) pueden ser hidrolizados por las ecto-nucleótido-pirofosfatasas E-NPPs (ii), generando AMP y UMP. Estos últimos son sustrato de la ecto-5'-nucleotidasa (E-5'NT; iii). La uridina (URI), la adenosina (ADO) y eventualmente la inosina (INO) generada por acción de la adenosina deaminasa (ADA) (iv), penetran a la célula a través de transportadores de nucleósidos (NS).

tran presentes en el medio extracelular de cuanto tejido haya sido investigado. Al menos que ocurra muerte celular, los nucleótidos no difunden libremente al exterior de la célula, sino que cuentan con mecanismos especializados en el control de la liberación de ATP y otros agonistas purinérgicos.

Los nucleótidos pueden ser liberados por las células en dos contextos no excluyentes: 1) difusión a través de canales presentes en la membrana plasmática (mecanismo conductivo), y 2) secreción de gránulos conteniendo nucleótidos (exocitosis). El primero de ellos se fundamenta en que las concentraciones citosólicas de ATP y otros nucleótidos (0.1-10 mM) superan por varios órdenes de magnitud a las observadas en el medio extracelular (< 100 nM), hecho que facilitaría el flujo de nucleótidos desde el citosol hacia el exterior a través de canales presentes en la membrana plasmática (Fig. 4). Además, los nucleótidos generalmente se encuentran como aniones, y el interior celular es electronegativo con respecto al exterior, de modo que no solamente el gradiente químico, sino también el gradiente eléctrico a través de la membrana celular favorecería la salida de nucleótidos. Los estudios farmacológicos y electrofisiológicos sugieren que en algunas células, ciertas proteínas de superfi-

cie (Ej. conexinas, panexinas, y canales aniónicos dependientes de voltaje) podrían servir como canales de ATP<sup>11</sup>.

Por otro lado, en algunos tejidos el ATP y posiblemente el UTP son almacenados en altas concentraciones en vesículas o gránulos citoplasmáticos especializados, y liberados por exocitosis en respuesta a ciertos estímulos (Fig. 4). Este proceso, conocido como exocitosis regulada, ha sido descrito en terminales nerviosas, células cromafines, plaquetas, páncreas exocrino y otros tejidos secretorios. Aunque en la vasta mayoría de los tejidos periféricos, la existencia de gránulos secretorios ricos en ATP no ha sido demostrada, en muchos casos la liberación de ATP y UDP-glucosa se reduce considerablemente en presencia de agentes que inhiben el tráfico de vesículas hacia la membrana plasmática. Es sabido que el ATP y los nucleótido-azúcares son activamente transportados desde el citosol hacia el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi, para ser utilizados en la biosíntesis de glicoproteínas y otras moléculas complejas destinadas a ser transportadas hacia la superficie celular. El hecho de que prácticamente todas los nucleótidos involucrados en reacciones bioquímicas dentro del RE o del aparato de Golgi sean detectados en el

medio extracelular, sugiere que la inserción de vesículas en la superficie celular podría ser uno de los mecanismos de liberación de nucleótidos (Fig. 6).

### Metabolismo extracelular de nucleótidos

La regulación de las concentraciones extracelulares de los nucleótidos impide que los receptores purinérgicos estén permanentemente activados, llegando incluso a desensibilizarse (inactivarse) frente a la estimulación excesiva o prolongada de un ligando. Este papel lo cumplen las ecto-nucleotidasas, enzimas presentes en la superficie de la gran mayoría de las células que metabolizan los distintos nucleótidos extracelulares. La actividad de las ecto-nucleotidasas garantiza no sólo la terminación de un estímulo específico, sino que posibilita la conversión de unos agonistas en otros, los cuales presentan diferentes selectividades hacia distintos receptores<sup>12</sup>.

Existen tres grupos de ecto-nucleotidasas, esquematizadas en la Fig. 4. (i) Las apirinasas o ecto-nucleósido trifosfato-difosfohidrolasas (E-NTPDasas), (ii) las ecto-nucleótido-pirofosfatasas (E-NPP), y (iii) la ecto-5'-nucleotidasa. Las E-NTPDasas remueven secuencialmente al fosfato (Pi) terminal de los nucleósido di (NDPs) y trifosfato (NTPs). Las E-NPP remueven ambos fosfatos ( $\beta$  y  $\gamma$ ) juntos de los NTPs, liberando pirofosfato (PPi). Además, las E-NPP remueven glucosa-1P de la UDP-glucosa. La 5'-nucleotidasa promueve la formación de nucleósidos a partir del correspondiente nucleósido-monofosfato (NMPs). La adenosina deaminasa (ADA) convierte a la adenosina en inosina (otro nucleósido). Los nucleósidos generados como resultante de estas actividades son captados por la célula a través de transportadores específicos, sirviendo de sustrato para la síntesis de NTPs y UDP-glucosa (Fig. 4).

### Papel fisiológico de los receptores purinérgicos

Los receptores purinérgicos están presentes en todos los tejidos. Los receptores P2X están ampliamente distribuidos a través del sistema nervioso central y periférico así como también en los endotelios y epitelios, en la musculatura vascular, en leucocitos y plaquetas, mastocitos y macrófagos. Dentro del sistema nervioso, los receptores P2X se encuentran tanto en neuronas pre- y post-sinápticas como en células de la glía. Los receptores sinápticos P2X responden rápidamente (en milisegundos) al ATP liberado en las terminales nerviosas, facilitando la entrada de  $Ca^{2+}$  a la neurona, y han sido asociados funcionalmente a la percepción del dolor y otras sensaciones. Estudios realizados en ratones genéticamente carentes de receptor P2X<sub>3</sub> (P2X<sub>3</sub>-R<sup>-/-</sup>) indican que estos animales pierden la sensibilidad a la distensión mecánica

de la vejiga urinaria. Dado que la distensión del urotelio (el epitelio que cubre la pared interior de la vejiga) provoca la liberación de ATP, el receptor P2X<sub>3</sub> actuaría como "detector" de los cambios de volumen (llenado) de la vejiga urinaria. Trabajos similares han establecido que los receptores P2X<sub>2</sub> y P2X<sub>3</sub> participan en la sensación gustativa y que, además, el receptor P2X<sub>3</sub> presente en terminales nerviosas de la arteria carótida juega un importante papel en la respuesta a la escasez de oxígeno en la sangre.

Uno de los fenómenos más investigados dentro del campo de las señales purinérgicas debido a sus implicaciones fisisiológicas, es la acción del ADP sobre los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub> de las plaquetas. Al dañarse los vasos, las plaquetas se adhieren al tejido expuesto, aglutinándose en el sitio donde se ha producido la lesión. Así se forma el llamado tapón plaquetario que detiene la hemorragia. La formación del tapón plaquetario depende en gran medida de la capacidad de las plaquetas activadas de reclutar nuevas plaquetas en el sitio lesionado. Esta respuesta es mediada principalmente por el ADP liberado por las propias plaquetas, y la consiguiente activación de los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub>.

La activación del receptor P2Y<sub>1</sub> induce movilización de  $Ca^{2+}$  y activación de la proteína quinasa C (Fig. 3), lo que lleva a la fosforilación y polimerización de proteínas integrales del esqueleto celular (citoesqueleto) y cambios en la forma de las plaquetas. El receptor P2Y<sub>1</sub>, al activarse, inicia la agregación plaquetaria, pero ésta es débil y reversible. Se requiere de la activación del receptor P2Y<sub>12</sub> para que la agregación iniciada por el receptor P2Y<sub>1</sub> prosiga en forma sostenida e irreversible. Esto se debe principalmente a la capacidad del receptor P2Y<sub>12</sub> de activar señales (entre ellas PI3-quinasa, Fig. 3), que controlan la activación y expresión de proteínas de superficie (ej. integrinas) responsables de la adhesión fuerte entre plaquetas.

La activación del receptor P2Y<sub>12</sub> también es importante para la agregación plaquetaria iniciada por otros estímulos no purinérgicos, como trombina, serotonina, adrenalina y tromboxano A<sub>2</sub>. Dado el rol del receptor P2Y<sub>12</sub> en el desarrollo de trombos, sus antagonistas (ej. clopidogrel) son utilizados en la clínica médica como agentes anti-trombóticos<sup>13</sup>.

De lo arriba expuesto se deduce que si la activación de los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub> no fuera controlada entonces una simple lesión, por ejemplo una herida menor, provocaría un trombo y consecuentemente oclusión de los vasos sanguíneos. Este control es llevado a cabo por las diversas E-NTPDasas presentes en la superficie del endotelio de los vasos sanguíneos y tejido circundante. Es interesante notar que la E-NTPDasa-1, la enzima que hidroliza al ATP y al ADP con igual eficacia, se ubica en las células endoteliales, mientras que la E-NTPDasa-2, que hidroliza al ATP mucho más eficazmente que al ADP se halla presente en la superficie de las células del tejido

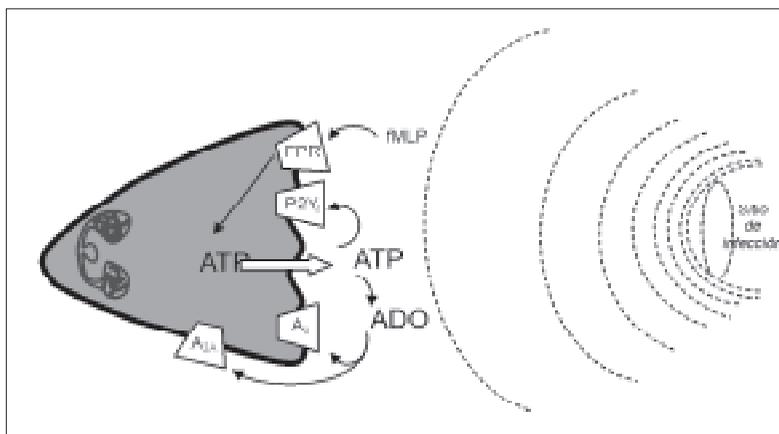


Fig. 5.— Receptores purinérgicos y respuesta inflamatoria. La activación del receptor FPR por el fMLP, causa la liberación de ATP y activación del receptor  $P2Y_2$  amplificando la respuesta quimiotáctica del neutrófilo. La conversión de ATP en adenosina resulta en activación del receptor  $A_3$ , también pro-quimiotáctico, y del receptor  $A_{2A}$ , inhibidor de la quimiotaxis.

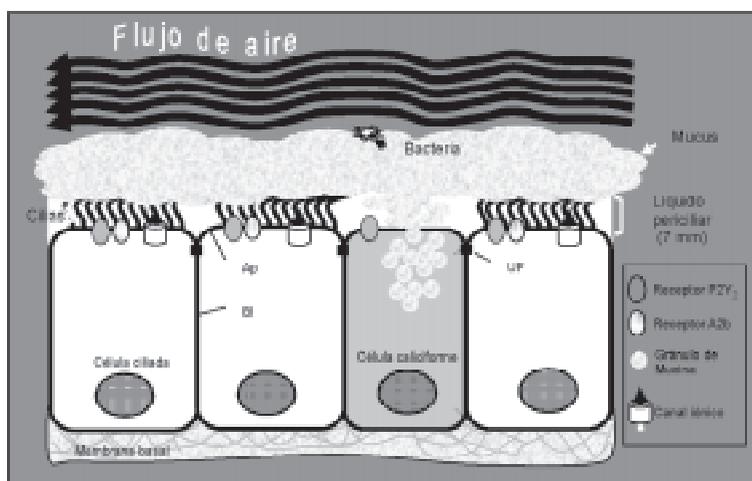


Fig. 6.— Componentes del epitelio respiratorio. El aclaramiento mucociliar (MCC) es regulado por receptores purinérgicos de la superficie apical (Ap) de células epiteliales. Los receptores  $A_{2B}$  están presentes en las células ciliadas mientras que los receptores  $P2Y_2$  se encuentran tanto en las células ciliadas como en las células caliciformes, productoras de mucinas. La Ap de las células epiteliales está separada de la superficie basolateral (BI) por uniones fuertes (UF).

circundante<sup>14</sup>. Esta distribución asimétrica de ectonucleotidasas previene la activación de las plaquetas dentro de vasos intactos. Es decir, en ausencia de lesión, la E-NTPDasa-1 que se encuentra dentro del vaso no permite que se acumule ADP. Por el contrario, en el caso de rotura de vasos, la E-NTPDasa-2 del tejido circundante favorece la agregación plaquetaria al promover la conversión de ATP en ADP.

La hidrólisis del ADP no sólo finaliza la activación de los receptores  $P2Y_1$  y  $P2Y_{12}$  sino que promueve, a través de la formación de adenosina, la activación de receptores plaquetarios  $A_{2A}$  que inhiben la agregación de las plaquetas.

Otro receptor ampliamente estudiado es el  $P2Y_2$ , presente en la mayoría de los tejidos periféricos y en células de la glía del SNC. El receptor  $P2Y_2$  está involucrado en la amplificación de la respuesta inmune mediada por los neutrófilos, los más abundantes leucocitos circulantes. La función primordial de los neutrófilos es destruir las bacterias patógenas que penetran en el organismo. En un proceso conocido como quimiotaxis, los neutrófilos reconocen la presencia de moléculas de origen bacteriano, el quimioatrayente, y migran hacia la zona de origen de las mismas llamada foco de infección. El neutrófilo se orienta y mantiene su movimiento direccional a través de pequeñísimos gradientes de concentración

del quimioatrayente. Al detectar un estímulo (por ejemplo, el péptido bacteriano fMLP) la superficie del neutrófilo se deforma y emite un pseudópodo en dirección a aquel (Fig. 5). La deformación de la membrana plasmática promueve la liberación de ATP, el cual activa al receptor P2Y<sub>2</sub> presente en el pseudópodo naciente y amplifica la señal quimiotáctica iniciada por el fMLP. Un segundo mecanismo de amplificación involucra la conversión del ATP en adenosina –por acción de las E-NTPDasas y ecto-5'-nucleotidasa- y la consiguiente activación del receptor A<sub>3</sub> de los neutrófilos (Fig. 5). Como contrabalance, la misma adenosina, al difundir sobre la superficie del neutrófilo, activa al receptor A<sub>2A</sub> localizado en la región central de la célula, causando inhibición de la quimiotaxis. Dada su importancia en la migración de neutrófilos, el desarrollo de antagonistas selectivos de los receptores P2Y<sub>2</sub> y A<sub>3</sub> podría conducir a nuevas terapéuticas anti-inflamatorias.

Como veremos luego, el receptor P2Y<sub>2</sub> también cumple importantes funciones en los mecanismos de defensa innata del epitelio respiratorio.

Otros ejemplos de funciones reguladas por receptores P2Y incluyen el control de la secreción de electrolitos en el yeyuno y en la vesícula biliar, mediados por los receptores P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>6</sub> respectivamente, y la regulación de la respuesta inmune mediada por el receptor P2Y<sub>11</sub>, expresado en linfocitos, monocitos y neutrófilos<sup>4</sup>.

Los receptores P1 (de adenosina) se encuentran distribuidos dentro y fuera del sistema nervioso central. En el cerebro, la adenosina funciona como depresor, actuando a través de receptores A<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub> presentes en terminales nerviosas de la corteza y en vías motoras. Muchas de las acciones psico-estimulantes de la cafeína se deben a que ésta es un inhibidor de los receptores A<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub>, y por lo tanto contrarresta la acción depresora ejercida por la adenosina endógena. Ya hemos mencionado el papel de los receptores A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, y A<sub>3</sub> en el control de la activación de las plaquetas y en la respuesta inflamatoria. El receptor A<sub>2B</sub> también cumple importantes funciones en el mantenimiento de la secreción de electrolitos en el epitelio pulmonar.

### Los receptores purinérgicos y los mecanismos de defensa pulmonar

El epitelio que recubre el árbol respiratorio desde las vías aéreas superiores hasta los bronquios y bronquiolos representa la primera línea de defensa contra las infecciones pulmonares. La capa más superficial del epitelio respiratorio está formada mayoritariamente por células ciliadas, secretoras de iones y agua, y en menor proporción por células caliciformes. Tanto éstas como células de las glándulas mucosas son las responsables de la producción de mucinas, macromoléculas de alto peso molecular que, al ser liberadas a las vías respiratorias,

forman la capa viscosa de mucus que atrapa las bacterias inhaladas.

La eliminación del mucus y de las partículas en él retenidas es propulsada por el movimiento direccional coordinado de las cilias, proceso conocido como aclaramiento mucociliar o *muco-ciliary clearance* (MCC). Es importante destacar que las cilias no penetran la capa viscosa del mucus sino que están “sumergidas” en un film acuoso, el líquido periciliar, por encima del cual “flota” el mucus. El líquido periciliar recubre la superficie del epitelio respiratorio en toda su extensión y, con un espesor similar a la altura de las cilias, brinda la lubricación necesaria para el movimiento de éstas. La remoción eficiente de las partículas inhaladas depende no sólo de la secreción de mucinas y del movimiento ciliar, sino fundamentalmente de la producción de líquido periciliar. Esta a su vez está determinada por la capacidad de las células ciliadas de regular la concentración de electrolitos en el compartimiento extracelular apical.

*La enfermedad fibroquística (FQ):* La falta de producción de líquido periciliar provoca la deshidratación del mucus y el colapso de las cilias, y lleva a la obstrucción e infección pulmonar. Este es el caso típico de la enfermedad fibroquística pulmonar. La enfermedad fibroquística es la más común de las enfermedades genéticas letales en la población blanca<sup>15, 16</sup>, y es causada por mutaciones en el gen que codifica a la proteína CFTR, un canal de cloruro (Cl<sup>-</sup>) regulado por AMP cíclico (Fig. 7). El mal funcionamiento del CFTR genera la disminución de la secreción de Cl<sup>-</sup> y aumento de la absorción de sodio (Na<sup>+</sup>), seguido de depleción del líquido periciliar. Estudios recientes han demostrado que el CFTR se encuentra mayoritariamente expresado en las células ciliadas<sup>17</sup>. Aunque la enfermedad FQ afecta numerosos órganos y tejidos (páncreas, intestino, sistema reproductor masculino, conductos biliares, piel) los síntomas más graves se manifiestan en el sistema respiratorio.

En las células epiteliales de individuos con enfermedad FQ, la disminución de la secreción de Cl<sup>-</sup> causada por la deficiencia del CFTR podría ser compensada mediante mecanismos que promuevan la activación del receptor P2Y<sub>2</sub>. Esto ha sido verificado experimentalmente, ya que la estimulación de receptores P2Y<sub>2</sub> en células epiteliales FQ promueve la secreción de Cl<sup>-</sup> vía CACC (Fig. 7), revirtiendo la depleción del líquido periciliar característico de estas células.

Resulta paradójico que, mientras las células normales necesitan convertir al ATP por ellas liberado en adenosina para activar CFTR, las células FQ (defectuosas de CFTR) requieren de la estabilidad del ATP extracelular para promover la activación de los receptores P2Y<sub>2</sub> y así estimular los canales CACC. La posibilidad de administrar nucleótidos no hidrolizables en forma de aerosol para inducir la producción de líquido periciliar en las vías respiratorias de pacientes con en-



de los desafíos de la investigación biomédica pasa por desarrollar potentes y selectivos agonistas y antagonistas que permitan manipular las numerosas respuestas controladas por los receptores purinérgicos.

**Agradecimientos:** Este trabajo fue financiado con subsidios de NIH P01-HL034322, CONICET, UBA y ANPCYT (1432).

## Bibliografía

1. Leloir LF. Two decades of research on the biosynthesis of saccharides. Nobel Lecture, 11 December, 1970. En: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1970/leloir-lecture.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1970/leloir-lecture.html); consultado el 1/9/2008.
2. Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol* 1970; 120: 337-57.
3. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 1972; 24: 509-81.
4. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. 2007; *Cell Mol Life Sci*. 64: 1471-83.
5. Williams M, Jarvis MF. Purinergic and pyrimidinergic receptors as potential drug targets. 2000; *Biochem Pharmacol* 59: 1173-85.
6. Zimmermann H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. 2001; *Drug Develop Res* 52: 44-56.
7. Lazarowski ER, Tarran R, Grubb BR, van Heusden CA, Okada S, Boucher RC. Nucleotide release provides a mechanism for airway surface liquid homeostasis. 2004; *J Biol Chem* 279: 36855-64.
8. North, R. A. Molecular Physiology of P2X Receptors. 2002; *Physiol Rev* 82: 1013-67.
9. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 281-341.
10. Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol* 2003; 64: 785-95.
11. Okada SF, Nicholas RA, Kreda SM, Lazarowski ER, Boucher RC. Physiological regulation of ATP release at the apical surface of human airway epithelia. *J Biol Chem* 2006; 281: 22992-23002.
12. Pafundo DE, Mut P, Pérez Recalde M, et al. Effects of extracellular nucleotides and their hydrolysis products on regulatory volume decrease of trout hepatocytes. *Am J Physiol* 2004; 287: 833-43.
13. Gachet C. Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006; 46: 277-300.
14. Seigny J, Sundberg C, Braun B, et al. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. *Blood* 2002; 99: 2801-09.
15. Boucher RC. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med* 2004; 58: 157-70.
16. Kotsias B. La ventaja de los heterocigotas. *Medicina (Buenos Aires)* 2004; 64: 79-83.
17. Kreda SI, Mall M, Mengos A, et al. Characterization of wild-type and deltaF508 cystic fibrosis transmembrane regulator in human respiratory epithelia. *Mol Biol* 2005; 16: 2154-67.
18. Lazarowski ER, Shea DA, Boucher RC, Harden TK. Release of cellular UDP-Glucose as a potential extracellular signaling molecule. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 1190-7.

----

[...] *As apothecaries we make new mixtures every day, pour out of one vessel into another; and as those old Romans robbed cities of the world to set out their bad-sited Rome, we skim the cream of other men's wits, pick the choice flowers of their tilled gardens to set out our own sterile plots. [...]*

[...] Como los boticarios hacemos nuevas mezclas cada día, vertemos de un vaso a otro, y como aquellos romanos de antaño robaron las ciudades del mundo para erigir la mal situada Roma, nosotros espumamos la crema del ingenio de otros hombres, las flores elegidas de sus labrados jardines para establecer nuestras estériles parcelas. [...]

Robert Burton (1577-1640)

*The Anatomy of Melancholy* (1621). London: Dent, 1932. *Volume One. Democritus junior to the reader*, p 23