



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

**Receptores purinérgicos
en células de músculo liso vascular
de la arteria umbilical humana:
caracterización electrofisiológica
y su rol en la regulación del calcio
intracelular**

Bioq. Nicolás Jorge Enrique

Directora: Prof. Dra. Verónica Milesi

2015

El presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado bajo
la dirección de la Dra. Verónica Milesi.

Durante los primeros años de mi doctorado, el laboratorio donde realicé casi la totalidad del trabajo se denominaba GINFIV (Grupo de Investigación de Fisiología Vascular), perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

En la actualidad, nuestro grupo de investigación forma parte del recientemente formado Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP) UNLP - CONICET de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP.

Los experimentos de medida de calcio intracelular fueron llevados a cabo en el laboratorio del Prof. Franco Tanzi del Departamento de Ciencias Fisiológicas y Farmacológicas de la Universidad de Pavia, Italia, con quien nuestro laboratorio mantiene una estrecha colaboración.

Cursos de Postgrado realizados durante el doctorado

Neurociencia: preguntas claves y enfoques metodológicos actuales.

Facultad de Ciencias Exactas, UNLP - Argentina. Duración: 16 horas (21 y 22 de agosto de 2014). Evaluación final aprobada.

Curso Intensivo de Introducción a la Epistemología.

Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP - Argentina. Duración: 45 horas (10 al 14 de marzo de 2014). Evaluación final aprobada.

Modelamiento molecular de Proteínas

Facultad de Ciencias Exactas, UNLP - Argentina. Duración: 18 horas (6, 7 y 8 de marzo de 2013). Evaluación final aprobada.

Modelo cinético en el estudio de Canales Iónicos.

Facultad de Ciencias Exactas, UNLP - Argentina. Duración: 16 horas (6 y 7 de diciembre de 2012). Evaluación final aprobada.

Ion Channels: from molecules to pathology

Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo. Instituto Pasteur, Montevideo – Uruguay. Duración: 50 horas (24 de abril al 4 de mayo de 2012). Evaluación final aprobada

41st Course of International School of Biophysics on “Channels and Transporters”

Ettore Majorana Foundation and Centre for Scientific Culture, Erice - Italia. Duración: 40 horas (10 al 18 de mayo de 2011).

Estadías en otros laboratorios

Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso, Chile. Trabajos realizados en el Laboratorio de Electrofisiología que dirige el Prof. Dr. Carlos González León y el Prof. Dr. Ramón Latorre.(Facultad de Ciencias - Universidad de Valparaíso).

Duración de pasantía: 5 meses

Laboratorio de Fisiología Cardiovascular de la Universidad de Pavia, Italia, que dirige el Prof. Dr. Franco Tanzi.

Duración: 2 estadías de 1 mes cada una

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en 2 congresos en formato de poster, y han sido publicados en el siguiente trabajo:

“Extracellular ATP induces fast and transient non-selective cationic currents and cytosolic Ca^{2+} changes in human umbilical artery smooth muscle cells.”
Enrique, N.; Rebolledo, A.; Martín, P.; Roldan Palomo, A.R.; Tanzi, F.; Milesi, V. *Purinergic Signalling*. 8(2):199-206, 2012.

*La memoria guardará lo que valga la pena.
La memoria sabe de mí más que yo;
y ella no pierde lo que merece ser salvado.*

Eduardo Galeano

a mis seres queridos, gracias por ser parte de mi memoria

Quiero expresar mi agradecimiento a la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por haber sido mi lugar de formación y por brindarme un lugar de trabajo donde desarrollar esta Tesis Doctoral.

INDICE

1	Introducción y Objetivos	1
1.1	Receptores purinérgicos	2
1.1.1	Reseña histórica de los receptores purinérgicos	2
1.1.2	Receptores purinérgicos en la actualidad. Características y rol fisiológico en el tejido vascular humano	4
	Receptores de Adenosina - P1	5
	Receptores Purinérgicos P2Y	7
	Receptores Purinérgicos P2X	9
1.2	Arteria umbilical humana y células de músculo liso vascular	16
1.2.1	Arteria umbilical humana y ATP extracelular	25
1.2.2	Arteria umbilical humana y receptores purinérgicos P2X	27
1.3	Acoplamiento funcional de los receptores purinérgicos con canales iónicos	28
1.4	Objetivos	30
2	Materiales y Métodos	31
2.1	Muestras de arteria umbilical humana. Obtención y disociación celular	32
2.1.1	Obtención de la muestra	32
2.1.2	Disociación celular	34
2.2	Registros electrofisiológicos en células de músculo liso vascular de la arteria umbilical humana	35
2.3	Registros y metodología de análisis de las corrientes macroscópicas medidas en configuración de célula completa (<i>whole cell</i>)	39
2.3.1	Registros de la corriente evocada por ATP extracelular en configuración de célula completa (<i>whole cell</i>)	39
2.3.2	Registros de la corriente mediada por el canal BKCa en configuración de célula completa (<i>whole cell</i>)	42
2.4	Registros y metodología de análisis de las corrientes de canal único en configuración <i>cell attached</i>	44

2.4.1	Registros de las corrientes de canal único mediadas por el canal BKCa en configuración <i>cell attached</i>	44
2.4.2	Análisis de los registros de las corrientes de canal único mediadas por el canal BKCa en configuración <i>cell attached</i>	45
2.5	Medida de cambios en la concentración intracelular de calcio mediante técnicas fluorimétricas	47
2.6	Objetivos	51
3	Resultados	56
3.1	Caracterización electrofisiológica de los receptores purinérgicos ionotrópicos de tipo P2X en células de músculo liso de la arteria umbilical humana	57
3.1.1	Activación de corrientes purinérgicas a partir del agregado de ATP extracelular en distintas concentraciones	57
3.1.2	Inhibición de corrientes purinérgicas por suramina y zinc	62
3.1.3	Participación de los iones sodio y calcio en la corriente evocada por ATP extracelular	64
3.2	Regulación del calcio intracelular a partir de la activación de receptores purinérgicos P2X de las células de músculo liso de la arteria umbilical humana	67
3.2.1	Cambios de concentración de calcio intracelular inducidos por el agregado de ATP extracelular y su dependencia con la concentración de calcio extracelular. Rol del retículo sarcoplásmico.	69
3.2.2	Valoración del rol de los canales de calcio sensibles al voltaje secundario a la activación de receptores P2X	72
3.3	Interacción funcional entre canales P2X y el canal BKCa	75
4	Discusión y Conclusiones finales	80
5	Bibliografía	89

Sección 1

Introducción y Objetivos

1.1. Receptores purinérgicos

1.1.1. Reseña histórica de los receptores purinérgicos

El adenosín trifosfato (ATP) es mayormente conocido como molécula fundamental en la obtención de energía celular y como señal intracelular. Éstas fueron las principales funciones que durante años se le adjudicó, siendo centro de numerosos estudios, principalmente en el campo del metabolismo celular.

El concepto de señalización por nucleótidos extracelulares fue introducido por Geoffrey Burnstock y sus colaboradores. En el año **1972** publicó el trabajo *Purinergic Nerves* [1] en el cual desarrolla la teoría de la señalización nerviosa purinérgica, a partir de la evidencia experimental recolectada de un gran número de trabajos previamente publicados, en los cuales se demostraba la existencia de **señalización nerviosa no-adrenérgica-no-colinérgica (NANC)** sobre músculo liso gastrointestinal [2][3], músculo liso vascular [4][5][6], músculo liso del sistema urinario [7][8], entre otros. En el mismo trabajo, surgen las especulaciones sobre el neurotransmisor NANC, indicando al ATP como un posible candidato, no solo por cumplir una serie de criterios necesarios para ser considerado un neurotransmisor [9], sino principalmente basándose en resultados experimentales en los cuales se identifica la liberación de la molécula de ATP cuando se estimulan nervios autónomos [10].

Todos estos planteos y pensamientos formaron parte de la teoría conocida en su momento como **neurotransmisión purinérgica**. Inicialmente esta teoría, contemplaba la existencia de “nervios purinérgicos” puros, es decir, células nerviosas cuyas terminales sinápticas liberaban solamente ATP. Pero pronto se planteó además una nueva teoría de co-liberación de

neurotransmisores por un mismo nervio [11], cuestionando el paradigma hasta ese momento establecido de que cada terminación nerviosa podía liberar solo un neurotransmisor específico.

La teoría de la función neurotransmisora del ATP, así como de otros nucleótidos purinérgicos, de forma implícita suponía la existencia de **receptores de membrana para el ATP**, lo cual fue planteado en el año 1976 [12]. En el año 1978 siguiendo criterios funcionales, se propuso la existencia de dos tipos de receptores: los llamados **P1**, con sensibilidad exclusiva para adenosina y los denominados **P2**, con mayor sensibilidad por ATP y ADP [13]. Además se observó que la activación de los receptores P1 afectan la actividad de la adenilato ciclasa y cambian los niveles intracelulares de AMPc.

En el año 1979 se identifican 2 tipos de receptores P1, proponiéndose los nombres de A1 y A2, según si disminuían o aumentaban los niveles intracelulares de AMPc, respectivamente [14].

En el año 1985, se pone en consideración la división de los receptores P2 en dos subtipos: **P2X** y **P2Y** [15]. Los criterios utilizados para esta clasificación fueron farmacológicos y fisiológicos, y surgieron de la mano del desarrollo de nuevos agonistas y antagonistas que permitieron poner en evidencia diferentes efectos fisiológicos en distintos tejidos.

En los comienzos de la década del '90, se logran clonar y aislar por primera vez los ADNc de los receptores purinérgicos: entre el año 1989 y 1991 se clonan los primeros receptores P1[16][17][18], en el año 1993 se clonan receptores P2Y [19][20] y en el año 1994 receptores P2X [21][22]. Estos trabajos permitieron observar que los receptores P1 y los P2Y eran

estructuralmente similares a receptores acoplados a proteínas G y los P2X se correspondían en estructura con canales iónicos operados por ligando.

1.1.2. Receptores purinérgicos en la actualidad. Características y rol fisiológico en el tejido vascular humano.

La clasificación actual de los receptores purinérgicos recomendada por la IUPHAR (*International Union of Pharmacology*) mantiene la separación de P1, P2Y y P2X, pero a los receptores P1 se recomienda denominarlos Receptores de Adenosina [23][24][25]. Las nuevas clasificaciones y nomenclaturas se basan fuertemente en criterios estructurales, además de los farmacológicos y funcionales utilizados en un principio [26].

Hasta el momento se han identificado y caracterizado:

- **4** subtipos de **Receptores de Adenosina (P1)**: A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃.
- **8** subtipos de receptores **P2Y**: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄.
- **7** subtipos de receptores **P2X**: P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆, P2X₇.

Con respecto a los ligandos naturales (nucleótidos y nucleósidos) de los receptores en humanos, se conoce que presentan selectividad, resumida en la Tabla 1.1.1 [27].

Tabla 1.1.1. Agonistas naturales y su selectividad sobre receptores purinérgicos humanos. Modificada de *Lazarowski E. y col.* [27].

Nucleótido/Nucleósido	Receptores
ATP	P2X ₁ - P2X ₇ ; P2Y ₂ ; P2Y ₁₁
ADP	P2Y ₁ ; P2Y ₁₂ ; P2Y ₁₃
UTP	P2Y ₂ ; P2Y ₄
UDP	P2Y ₆ ; P2Y ₁₄
UDP-glucosa (y UDP-otros azúcares)	P2Y ₁₄
Adenosina	A ₁ , A _{2A} , A _{2B} y A ₃
Ap ₃ A, Ap ₄ A	P2X ₁ - P2X ₄ ; P2Y ₁ ; P2Y ₂

Receptores de Adenosina (P1)

Los 4 subtipos de receptores de adenosina son metabotrópicos, formando parte de la familia de receptores de membrana asociados a proteína G (GPCR, del inglés *G protein coupled receptor*) de 7 segmentos transmembrana (TM). El extremo N-terminal se encuentra del lado extracelular y el C-terminal está ubicado en el lado citoplasmático, siendo éste segmento intracelular, junto con el segmento de unión entre el TM5 y el TM6, las regiones que interactúan con la proteína G específica de cada subtipo. La región extracelular entre los segmentos TM6 y TM7, es importante para la unión de la adenosina, ligando endógeno natural de todos los subtipos de receptores P1, y potencialmente además para la inosina en el caso del subtipo A₃.

En el año 2008 se obtuvo la estructura por cristalización del receptor A_{2A} [28]. Esto significó un gran avance para el estudio de los receptores de

adenosina, aumentando y optimizando los estudios *in-silico* junto con un incremento en la especificidad de la evaluación de la interacción con ligandos agonistas y antagonistas.

En la tabla 1.1.2 se resumen las características más relevantes de los distintos receptores de adenosina.

Tabla 1.1.2. Receptores de Adenosina (P1). Modificado de [29][30][31].

Receptor	Mecanismo de transducción	Expresión proteica y distribución en humanos
A ₁	G _{i/o} inhibe AC (↓ cAMP)	Cerebro, medula espinal, testículo, corazón, nervios autónomos
A _{2A}	G _s estimula AC (↑ cAMP)	Cerebro, corazón, pulmones, bazo, vasos sanguíneos
A _{2B}	G _s estimula AC (↑ cAMP)	Intestino grueso, vesícula biliar, vasos sanguíneos
A ₃	G _{i/o} inhibe AC (↓ cAMP)	Esófago, glándulas adrenales, pulmón, hígado, cerebro, testículo, corazón

En **tejido vascular humano**, la presencia de receptores de adenosina ha sido descripta en células endoteliales, informándose la expresión principalmente de receptores A_{2A} y A_{2B} [32] y en células de músculo liso, de A_{2A} y A_{2B} [33][34]. El rol fisiológico y la importancia de los receptores de adenosina en el tejido vascular, no está claramente establecido [35], pero se los vincula con: (1) la producción de óxido nítrico (NO, del inglés *nitric oxide*) por parte del endotelio y consecuente efecto vasodilatador [36]; y (2) con fenómenos de angiogénesis durante procesos de isquemia e hipoxia, a través de la estimulación de la producción de factor de crecimiento endotelial vascular y de la proliferación celular [37].

Receptores Purinérgicos P2Y

Al igual que los receptores de adenosina, los receptores purinérgicos P2Y son receptores metabotrópicos y pertenecen a la familia de receptores de membrana acoplados a proteína G de 7 segmentos transmembrana [38]. En mamíferos, se han identificado 8 subtipos funcionales (ver tabla 1.1.3). Sus ligandos naturales son ATP, ADP, UTP, UDP y UDP-glucosa, mostrando cada uno de los subtipos diferente afinidad por estos ligandos. El subíndice numérico con el cual se denominan los distintos subtipos, se corresponde cronológicamente con la obtención del clonado del ADNc.

Tabla 1.1.3. Receptores purinérgicos P2Y. Modificado de [29][31][39].

Receptor	Mecanismo de transducción	Expresión proteica y distribución en humanos
P2Y ₁	G _{q/11} activa PLC(↑ DAG e IP ₃)	Hígado, corteza cerebral, intestino delgado y grueso, útero, riñón, músculo liso, testículo
P2Y ₂	G _{q/11} activa PLC(↑ DAG e IP ₃)	Células ciliadas, epitelios no queratinizados
P2Y ₄	G _{q/11} activa PLC(↑ DAG e IP ₃)	Páncreas, tiroides, vesícula biliar, hígado, cerebro, corazón, testículo, musculo esquelético, riñón
P2Y ₆	G _{q/11} activa PLC(↑ DAG e IP ₃)	Vesícula biliar, células epiteliales intestinales y respiratorias,
P2Y ₁₁	G _{q/11} activa PLC(↑ DAG e IP ₃) G _s estimula AC (↑ cAMP)	Expresión ubicua en células humanas. Sistema digestivo, renal, reproductivo y nervioso, tejido glandular, músculo esquelético, cardíaco y liso, piel
P2Y ₁₂	G _{i/o} inhibe AC (↓ cAMP)	Tejido linfoide, plaquetas

P2Y ₁₃	Gi/o inhibe AC (↓ cAMP)	Tejido hematopoyético, páncreas, eritrocitos, pulmón, estómago
P2Y ₁₄	Gi/o inhibe AC (↓ cAMP)	Tejido linfoide, intestino delgado, músculo esquelético y liso

En **tejido vascular humano**, se ha encontrado la expresión mayoritaria de P2Y₁, P2Y₂ y P2Y₄ en células endoteliales y de los P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₆ en células de músculo liso [40]. Los subtipos P2Y 1, 2, 4 y 6 actúan, vía proteína G, activando la fosfolipasa C (PLC, del inglés *phospholipase C*) que cataliza la reacción de hidrolisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂, del inglés *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*), dando lugar a la generación de diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃, del inglés *inositol 1,4,5-trisphosphate*). El IP₃ difunde por el citoplasma y actúa sobre receptores ionotrópicos específicos localizados en el retículo sarcoplásmico (RS), conocidos como receptores de IP₃ (rIP₃), los cuales son canales de calcio operados por ligando, que permiten la liberación de calcio hacia el citoplasma.

La activación de los subtipos P2Y predominantes en las **células endoteliales** genera un aumento de calcio citoplasmático, el cual a su vez provoca un incremento en la actividad enzimática de la NO sintasa de origen endotelial (eNOS, del inglés *endothelium nitric oxide syntase*), aumentando la producción y la liberación de NO, el cual generará sobre el musculo liso vascular un proceso de relajación, dando lugar a la dilatación del vaso sanguíneo [41][42]. Además de este proceso de relajación por liberación de NO, también se ha descrito que la activación de los receptores P2Y de las células endoteliales provoca vasodilatación por liberación de prostaglandinas y de factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF, del inglés *endothelium-derived hyperpolarizing factor*) [43][44].

La activación de los subtipos P2Y en las **células de músculo liso vascular**, dependiendo del lecho vascular y de la co-liberación de otras sustancias vasoactivas, puede tener un efecto vasodilatador (fenómeno mayoritariamente reportado) o vasoconstrictor [45][46][47].

Además de los efectos fisiológicos sobre el estado contráctil del tejido vascular, los receptores P2Y también participan en la regulación del crecimiento celular, tanto de las células endoteliales como de las células de músculo liso [48].

Receptores Purinérgicos P2X

Los receptores purinérgicos P2X son receptores ionotrópicos operados por ligando, del tipo catiónico no selectivos. Los receptores están formados por 3 subunidades, cada una de las cuales presenta 2 segmentos de transmembranas, con las porciones N- y C- terminal ubicadas de forma intracelular y un extenso bucle extracelular que ocupa aproximadamente el 70% de la masa total de cada subunidad [21][49]. Por lo tanto, el canal está formado por 6 segmentos de transmembrana, 2 pertenecientes a cada subunidad (figura 1.1.1).

Como se detalló anteriormente, se han descrito 7 subtipos de subunidades P2X: P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆, P2X₇. Las distintas subunidades forman receptores homoméricos y también pueden encontrarse en agrupaciones heteroméricas, ambos funcionales [50]. Por ejemplo, heteromultímeros P2X_{2/3} en los receptores de neuronas nociceptivas, P2X_{4/6} en neuronas del sistema nervioso central, y P2X_{1/5} en algunos vasos sanguíneos. Los P2X₇ no forman heteromultímeros y los P2X₆ no son funcionales como homomultímeros [51].

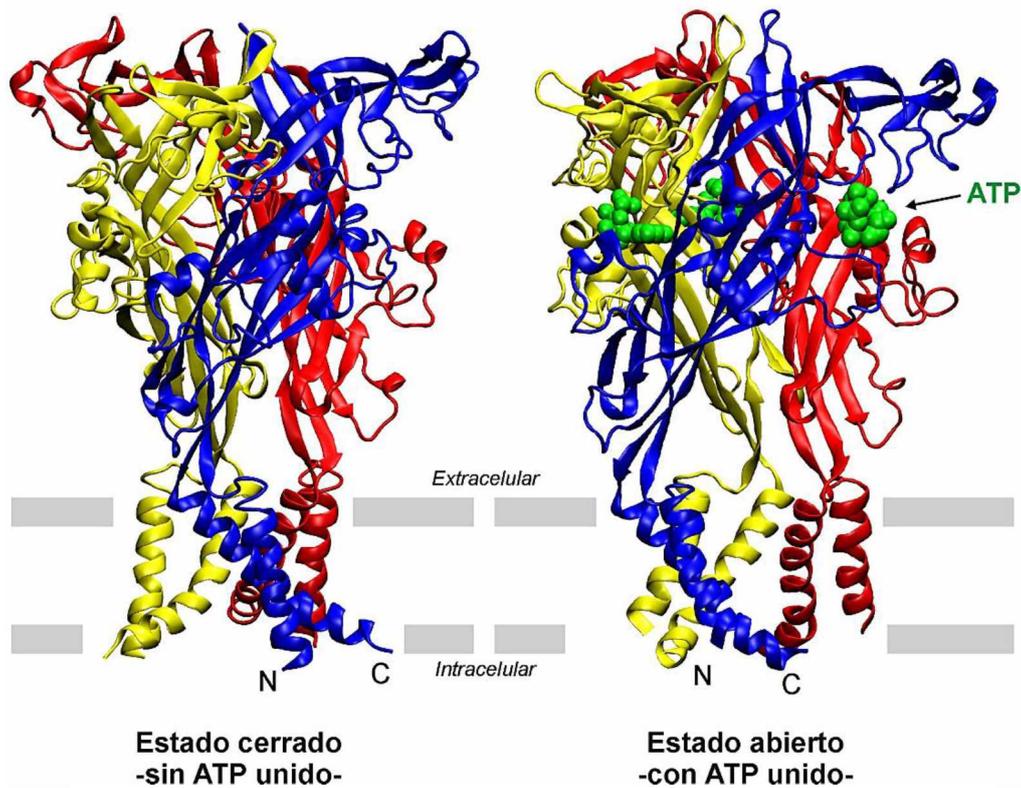


Figura 1.1.1. Estructura obtenida del cristal del receptor homotrimérico P2X₄, en conformación cerrada -sin el ATP unido- (PDB ID: 4DW0) y en conformación abierta -con el ATP unido representado en color verde- (PDB ID: 4DW1). Se muestran las 3 subunidades, cada una en colores distintos (azul, rojo y amarillo). La porción extracelular ocupa aproximadamente el 70% de la masa total de cada subunidad, con los extremos N- y C-terminal del lado intracelular. Esquema realizado a partir de los archivos PDB indicados anteriormente, resultados del trabajo de *Hattori y col.* [52].

De cada subunidad se conoce que la región transmembrana próxima al extremo N-terminal (TM1) está involucrado en la determinación de la cinética del canal y la región transmembrana próxima al extremo C-terminal (TM2) forma parte del revestimiento del poro del canal [53]. El tamaño de las subunidades en humanos se encuentra entre los 388 (P2X₄) y 595 (P2X₇) aminoácidos, con una identidad de secuencia a nivel de aminoácidos del 30-

50% entre ellos, lo cual permite hacer comparaciones estructurales por homología entre ellos [51].

En el año 2009, el grupo de Kawate y col. [54] obtiene por primera vez, la estructura cristalina de un receptor purinérgico P2X. Se cristalizó el receptor homotrimérico P2X₄, en estado cerrado, sin ATP unido. El trabajo permitió explorar distintas teorías sobre el poro de conductividad iónica del canal y sobre el sitio de unión del ATP, las cuales habían sido investigadas previamente, principalmente por estudios funcionales y mutagénesis de los receptores, pero con resultados no concluyentes [55]. Estos aspectos fueron resueltos en el año 2012, cuando Hattori y col. [52], logran obtener la estructura cristalina del mismo receptor P2X₄, en estado conformacional cerrado, sin la unión del ATP, y abierto, unido al ATP.

Con respecto al sitio de unión del ATP, se conocía que el canal trimérico se activa por la unión de 3 moléculas de ligando, por lo que el supuesto más firme era que cada subunidad formadora del canal poseía una región donde unir al ATP. Pero los resultados obtenidos del cristal unido al ATP permitieron establecer que el sitio de unión al ATP se encuentra localizado en una región definida entre 2 subunidades (figura 1.1.1), identificando los aminoácidos que estabilizan esta unión (Subunidad "A": Asn296, Lys316, Arg298, Lys316; lys193. Subunidad "B": Lys70, Lys72, Thr189). Esto permitió además explicar los distintos grados de afinidad por otros ligandos, como ADP, AMP, UTP y CTP entre otros.

A partir del estudio del canal en conformación cerrado y abierto, el trabajo de Hattori y col. permitió reforzar la hipótesis de que los iones atraviesan el canal a partir de fenestraciones laterales, y no por el eje vertical de simetría (figura 1.1.2). La selectividad por cationes ocurre a nivel del vestíbulo central del canal, ya que posee aminoácidos expuestos al poro, que le

confieren un entorno electrostático negativo, repeliendo aniones y atrayendo cationes, como previamente había sido reportado [56].

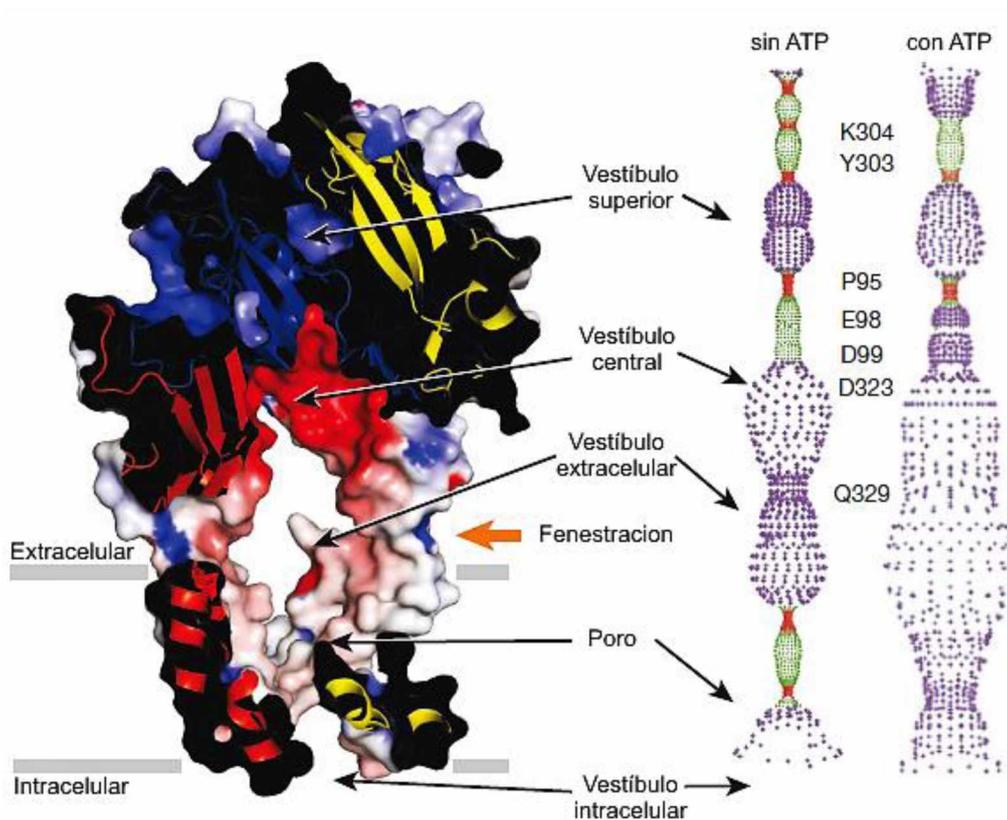


Figura 1.1.2. Panel izquierdo: sección de la superficie electrostática molecular del receptor P2X₄ (rojo potencial electrostático negativo, y azul positivo), donde se puede observar una zona con potencial electrostático negativo en el vestíbulo central. **Panel derecho:** superficies de revestimiento del eje central (*pore lining surfaces*) de la molécula del receptor P2X₄ obtenido a partir del modelado de receptor generado con los datos de la estructura cristalina. Cada color indica diferentes rangos de radio desde el eje central (rojo <1.15 Å, verde 1.15-2.3 Å, violeta >2.3 Å). Los resultados muestran que el pasaje de iones debería ocurrir a través de las fenestraciones laterales, ya que el eje central vertical de la molécula permanece estrecho en la conformación abierta (con ATP unido). Modificado de Hattori y col. [52].

Se conoce que la corriente iónica a través de los receptores P2X esta llevada por los iones Na^+ , Ca^{2+} y K^+ , con relaciones de permeabilidad a estos iones específica de cada subtipo y tejido [57].

Las características electrofisiológicas de las corrientes iónicas a través de los receptores P2X homotriméricos dependen del subtipo. La corriente iónica evocada por ATP extracelular (ATPe) ha sido caracterizada en un sistema de expresión heterólogo: células HEK293 transfectadas con receptores homotriméricos P2X de rata. Sus propiedades se resumen en la figura 1.1.3.

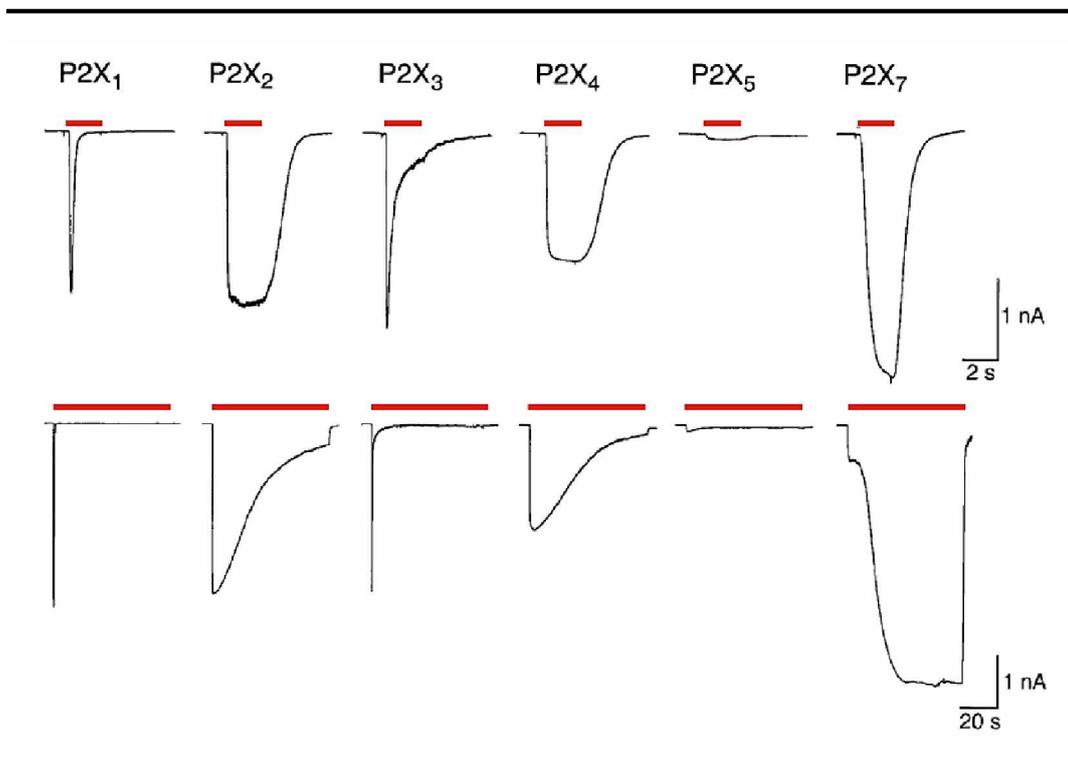


Figura 1.1.3. Corrientes iónicas entrantes, registradas en células HEK293 transfectadas con receptores homotriméricos P2X de rata. El estímulo aplicado de ATP extracelular está representado por las líneas rojas. En el panel superior se muestra la respuesta frente a un estímulo de 2 segundos, mientras que en el inferior el estímulo se mantiene por 20 segundos. En todos los casos se utilizó una concentración de $30 \mu\text{M}$ de ATP, excepto para el P2X₇, donde se utilizó 1mM . El receptor P2X₆ no es funcional. Modificado de *North* [58].

Se observa que las corrientes a través de receptores P2X₁ y P2X₃ se activan muy rápido, y decaen también rápidamente en presencia del ligando. Este proceso es conocido como desensibilización del receptor. Se trata de un estado activado por la presencia del ligando, pero no conductor. Las corrientes a través de los receptores P2X₂ y P2X₄ son de activación rápida y desensibilizan en forma lenta. Las corrientes a través de los receptores P2X₇ son lentas en su cinética de activación, y no desensibilizan. Para los P2X₂, P2X₄ y P2X₇ se ha evidenciado la existencia de un segundo estado abierto conductor con permeabilidad aumentada frente a moléculas orgánicas pequeñas, conocido como estado dilatado, el cual ocurre cuando el ligando se mantiene durante tiempos prolongados [59].

En la tabla 1.1.4 se resumen brevemente algunas características de los receptores P2X:

Tabla 1.1.4. Receptores purinérgicos P2X. Modificado de [29][31][60].

Receptor	Mecanismo de transducción	Expresión proteica y distribución en humanos
P2X ₁	Canal ionotrópico	Músculo liso vascular, plaquetas, tejido nervioso, células hematopoyéticas, músculo cardíaco, páncreas
P2X ₂	Canal ionotrópico	Músculo liso vascular, tejido glandular, células hematopoyéticas, músculo cardíaco y esquelético, epitelios no queratinizados,
P2X ₃	Canal ionotrópico	Tejido glandular exócrino, riñón, tejido nervioso, músculo cardíaco, células hematopoyéticas,
P2X ₄	Canal ionotrópico	Tejido glandular exócrino, pulmón, riñón
P2X ₅	Canal ionotrópico	Células hematopoyéticas, bazo, hígado
P2X ₆	¿Canal ionotrópico?	Músculo esquelético y cardíaco, tejido nervioso

P2X ₇	Canal ionotrópico	Células del sistema inmune, pulmón, riñón, músculo cardíaco
------------------	-------------------	--

En tejido vascular humano se ha descrito por inmunohistoquímica y análisis de ARNm por PCR, la presencia de los receptores P2X₁ y P2X₄ en células endoteliales y de P2X₁, P2X₂, P2X₄, P2X₅, P2X₆ y P2X₇ en células de músculo liso.

En las **células endoteliales**, la activación de receptores P2X se relaciona con efectos vasodilatadores, a partir de la liberación de NO secundaria a la entrada de Ca²⁺ [61].

En **células de músculo liso**, la activación de receptores P2X se relaciona con procesos vasoconstrictores, a partir de la entrada de Ca²⁺ directamente por los receptores P2X y también por entrada de Ca²⁺ a través de canales de calcio activados por la despolarización que supone la activación de los receptores P2X [61][62]. Además hay evidencia de la activación de canales de K⁺ sensibles al Ca²⁺, que llevarían a la hiperpolarización de la membrana de la célula de músculo liso, provocando la relajación del vaso [63][64].

Del balance de los efectos que el ATP pueda ejercer en los distintos tipos celulares que forman el vaso sanguíneo, dependerá el efecto vasoconstrictor o vasorelajador inducido. Este balance dependerá del lecho vascular implicado, del estado fisiológico y fisiopatológico del vaso, entre otros factores condicionantes.

En este trabajo de Tesis se caracterizó la respuesta que el ATPe genera en las células de músculo liso de la arteria umbilical humana. En particular, se describió la respuesta eléctrica a través de receptores P2X y las variaciones de

calcio intracelular que se generan a partir de la activación de los mismos. Además indagamos el mecanismo de acción de esta respuesta, y sobre otras estructuras celulares posiblemente involucradas en la misma. Analizamos finalmente si la respuesta purinérgica presenta acoplamiento funcional con el canal de K^+ de alta conductancia y sensible al Ca^{2+} intracelular (BKCa), el cual se encuentra altamente expresado en las células de músculo liso de la arteria umbilical humana [65][66].

1.2. Arteria umbilical humana y células de músculo liso vascular

Durante la fase embrionaria temprana comienza el desarrollo del aparato circulatorio extraembrionario formado por las vellosidades coriónicas y el cordón umbilical. Este último posee dos arterias y una vena las cuales, a diferencia de otros vasos sanguíneos, carecen de vasa vasorum, vasos linfáticos e inervación autónoma [67]. Las arterias umbilicales tienen su origen en la aorta fetal y junto a la vena, también de origen fetal, se prolongan hasta la placenta formando parte del cordón umbilical (figura 1.2.1) [68].

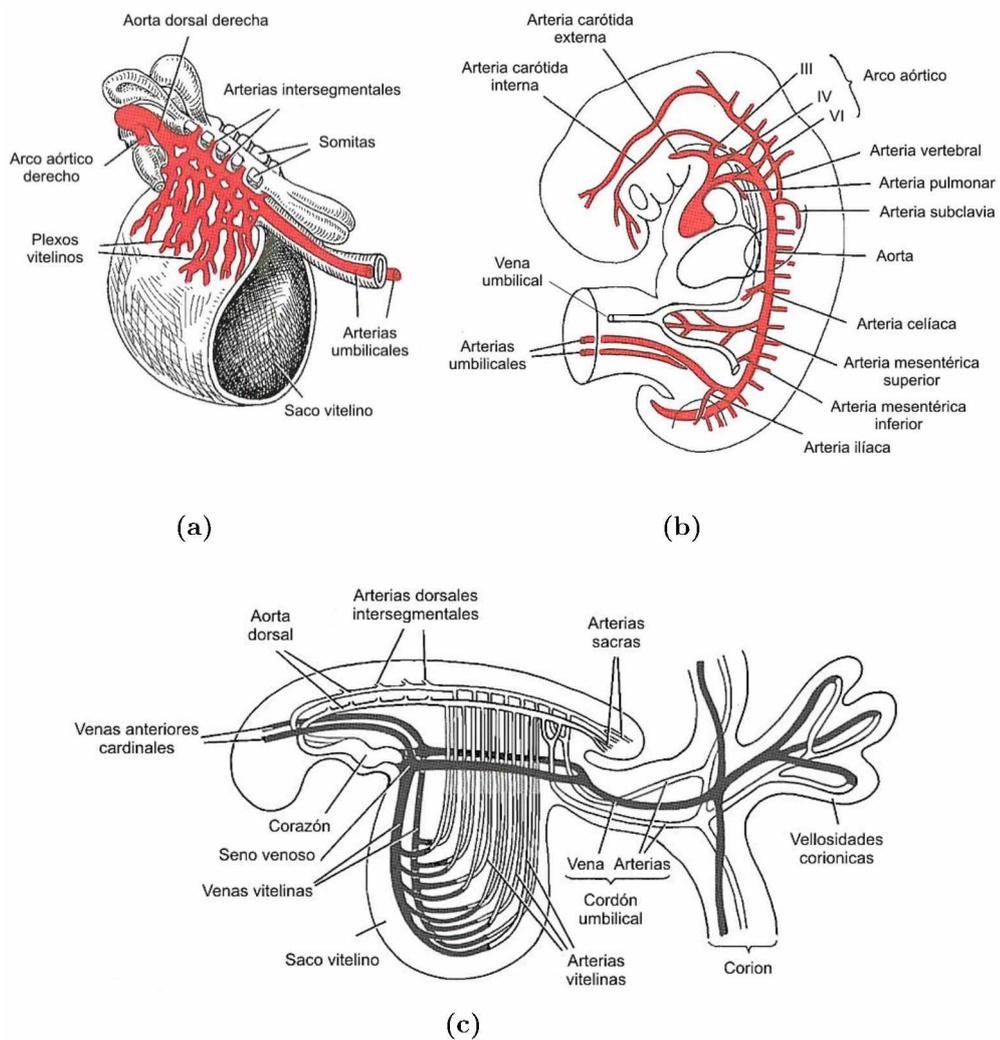


Figura 1.2.1. Esquemas de los vasos sanguíneos fetales humanos. (a) Embrión de aproximadamente 1 semana de gestación, vista lateral derecha. En rojo se encuentran resaltados los vasos arteriales. (b) Embrión de aproximadamente 35 días de gestación. En rojo se encuentran resaltados los vasos arteriales. (c) Embrión de aproximadamente 25 días de gestación. Los vasos arteriales están en blanco, los vasos venosos en gris. Esquemas modificados de *Review of Medical Embryology*. Pansky, B. [68].

El intercambio de materia entre la madre y el feto se produce a través de la membrana placentaria. La sangre materna llega por las arterias espirales (ramas de la arteria uterina) y baña las vellosidades coriónicas. La sangre fetal llega a la placenta por las arterias umbilicales, las cuales terminan en asas capilares largas y dilatadas dentro de las vellosidades coriónicas. La sangre retorna al feto por las venas umbilicales (figura 1.2.2) [69].

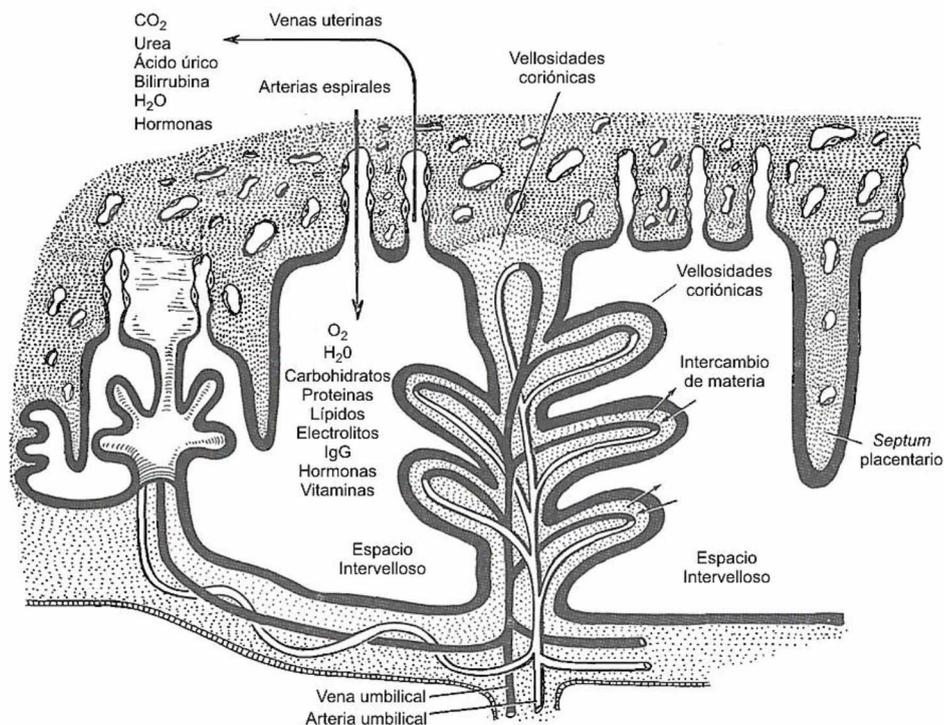


Figura 1.2.2. Circulación feto-placentaria. Esquema modificado de *Review of Medical Embryology*. Pansky, B. [68].

Las arterias umbilicales mantienen una baja resistencia al flujo sanguíneo y logran recibir alrededor del 40% del volumen minuto cardíaco fetal que se oxigena circulando por la placenta. Por lo tanto, la regulación del tono vasomotor de las arterias umbilicales juega un rol fundamental en la oxigenación y el crecimiento fetal intrauterino [70]. Una vez realizado el intercambio gaseoso, la sangre materna retorna a la circulación por las venas uterina y la sangre fetal, oxigenada, retorna al feto por la vena umbilical (figura 1.2.2) [69].

De esta forma el estudio de la arteria umbilical humana, además de representar un modelo de vaso humano muy útil en el campo de la fisiología vascular, es importante para entender el rol de los vasos sanguíneos en los numerosos y complejos mecanismos que regulan el flujo feto-placentario.

La organización histológica de la arteria umbilical humana comprende, la túnica íntima y la túnica media. La túnica íntima se ubica internamente (hacia la luz del vaso) y se está compuesta por una monocapa de células endoteliales. La túnica media de la arteria umbilical está formada por células de músculo liso (CML) que se disponen internamente, en dirección longitudinal al eje del vaso, y externamente, formando una capa circular compacta [71]. La túnica media carece de lámina elástica y de la adventicia típica de otros lechos arteriales, pero se encuentra inmersa en una matriz extracelular denominada gelatina de Wharton (figura 1.2.3.a). Esta estructura funciona, no sólo como soporte, sino también como lugar de almacenamiento y estabilización de las concentraciones de distintos factores de crecimiento en la vecindad de las células vasculares [70][72]. En la figura 1.2.3.b puede observarse los dos tipos de orientación celular.

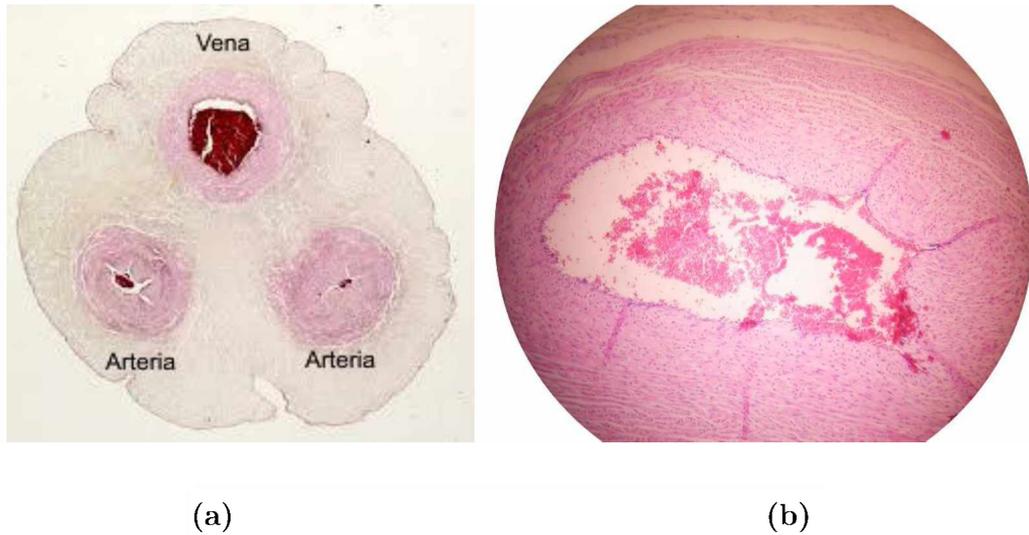


Figura 1.2.3. (a) Sección transversal de cordón umbilical. (b) Sección transversal de arteria umbilical humana.

Las CML son fusiformes de longitud variable (100 a 500 μm de largo) y 2 a 6 μm de diámetro con una gran proporción superficie/volumen. Esta relación se debe, en parte, a las invaginaciones que presenta la membrana denominadas caveolas [73].



Figura 1.2.4. Células de músculo liso de arteria umbilical humana, disociadas enzimáticamente. Fotografía tomada en nuestro laboratorio (400x).

Como es característico de este tipo celular, las CML poseen proteínas contráctiles específicas que se ordenan en filamentos:

- Filamentos finos: formados por actina globular polimerizada, junto con tropomiosina, caldesmona y calponina.
- Filamentos gruesos: constituidos por miosina, organizada en dos subunidades proteicas pesadas y dos pares de subunidades livianas que cuando se activan le confieren a la célula la propiedad de contraerse. Las cadenas pesadas de la miosina están enrolladas entre sí, constituyendo el núcleo del filamento, y terminan en dos porciones de naturaleza globular capaces de hidrolizar ATP, las cuales sobresalen del mismo a intervalos regulares. Sobre cada cabeza de miosina se disponen los dos tipos de cadenas livianas, denominadas cadena liviana reguladora (MLC20, del inglés *myosine light chain 20 kDa*) y cadena liviana esencial (MLC17, del inglés *myosine light chain 17 kDa*). La MLC20 posee un sitio de fosforilación en el aminoácido serina 19, importante para la regulación de la contracción.

Estos filamentos se organizan en unidades de tres a cinco filamentos gruesos rodeados de varios filamentos finos. Los filamentos finos se encuentran fijados a estructuras proteicas denominadas cuerpos densos, formados principalmente por α -actina, los cuales están anclados a proteínas del citoesqueleto celular y a la membrana celular (figura 1.2.5.a) [74][75].

Esta estructura conforma la maquinaria básica contráctil de la CML vascular y permite la transmisión de las fuerzas contráctiles, que se originan en el interior celular, hacia la superficie celular, modificando de esta manera la

forma de la célula, la longitud de la misma, y en conjunto cambiando el diámetro del vaso sanguíneo del cual forman parte.

La activación de esta estructura depende estrictamente de la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol de la CML la cual es determinante en la regulación del grado de interacción y tracción de dichos filamentos. En el músculo liso, el Ca^{2+} forma un complejo con la calmodulina, proteína intracelular de alta afinidad por este ión. El aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular favorece la formación de dicho complejo el cual activa la proteína quinasa de la cadena liviana de la miosina (MLCK, del inglés *myosine light chain kinase*). Esta quinasa puede estar ligada a los filamentos finos a través de su extremo N terminal y cuando es activada fosforila a la MLC20 [76][77]. Esta reacción desencadena un ciclo, durante el cual ocurre el corrimiento de las cabezas de miosina desplazando los filamentos de actina mediante el gasto de energía metabólica a través de la actividad ATPasa del complejo actomiosínico. Este mecanismo conduce al acortamiento de la estructura contráctil y el consiguiente desarrollo de fuerza. El ciclo de contracción se prolonga hasta que el Ca^{2+} es removido del citoplasma mediante su extrusión a través de la membrana celular y secuestro hacia los compartimentos intracelulares (figura 1.2.5.b).

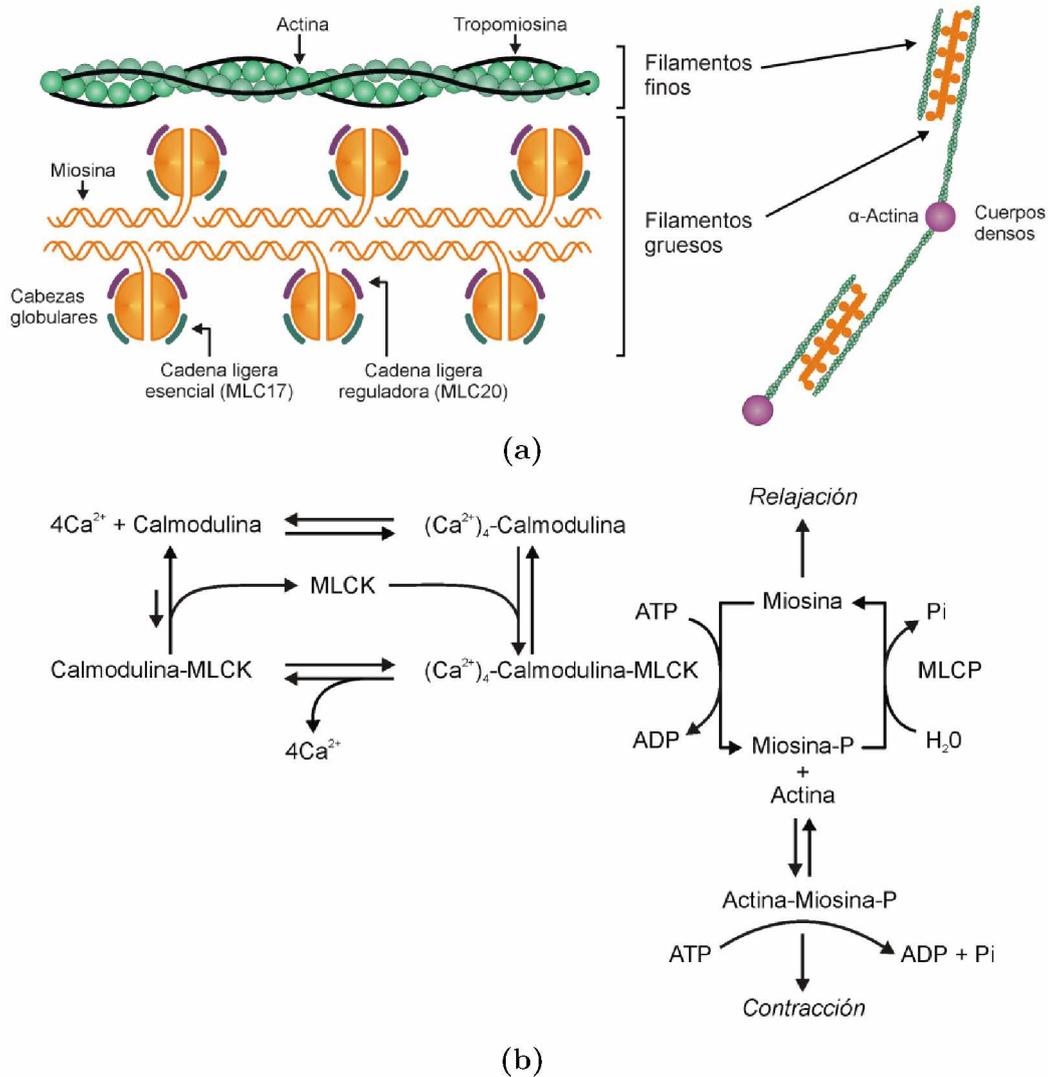


Figura 1.2.5. (a) Esquema de los elementos que forman parte del aparato contráctil en las células de músculo liso. (b) Eventos bioquímicos del fenómeno de contracción en las células de músculo liso. MLCP: fosfatasa de la cadena liviana de la miosina (del inglés, *myosin light-chain phosphatase*)

En condiciones de reposo, la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol de la CML está comprendida en el rango de valores de 120 a 200 nM. Un aumento global en la concentración del Ca^{2+} intracelular a niveles de 500 a 700 nM activa el aparato contráctil, desencadenando la contracción y acortamiento

de la célula [77]. Dicho aumento se puede producir por el influjo de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de diferentes estructuras específicas, o mediante la liberación del mismo desde organelas intracelulares, como el retículo sarcoplásmico y las mitocondrias, los cuales constituyen reservorios de Ca^{2+} intracelular. Las vías de influjo de Ca^{2+} son numerosas y la importancia relativa de cada una de ellas en la generación del aumento del calcio intracelular en las CML vascular varía entre los distintos lechos vasculares y en función del estímulo. En general se ha observado que, un aumento global o local de la concentración de Ca^{2+} puede estar mediado por:

- **Activación de canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje**, de los cuales diferentes subtipos han sido identificados en el músculo liso (L, T, P/Q, R) y su probabilidad de apertura cambia en función del potencial de membrana celular y el estado de fosforilación, entre otros factores reguladores.
- **Activación de canales catiónicos no selectivos permeables al Ca^{2+}** que pueden activarse mediante un número importante de estímulos como agonistas, estiramiento mecánico, depleción del retículo sarcoplásmico, estímulos despolarizantes de la membrana celular entre otros.
- **Activación del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en su modo reverso de acción**. Este mecanismo es sensible a los cambios en la concentración de Na^+ y Ca^{2+} , intra y extracelular, así como a las variaciones del potencial de membrana celular cuando se trata de isoformas electrogénicas.

- **Liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico**, en sus distintas formas de liberación e inducido por el influjo de Ca^{2+} o por segundos mensajeros.
- **Liberación de Ca^{2+} desde la mitocondria**, regulado en gran medida por el pH intracelular y por la propia concentración de Ca^{2+} intracelular.

Diversos estímulos endógenos y exógenos (agonistas, iones, fármacos, entre otros) pueden alterar el estado contráctil de las CML vascular, actuando sobre las estructuras celulares que intervienen directa o indirectamente en la regulación de la concentración del Ca^{2+} intracelular, la cual se conoce es variable en el tiempo y en el espacio. Numerosos estudios demuestran que en distintos compartimentos citoplasmáticos pueden encontrarse diferentes concentraciones de Ca^{2+} dependiendo del estado fisiológico de la célula y del tipo de estímulo que reciba.

Las sustancias vasoactivas endógenas que reciben las CML vascular pueden originarse en el endotelio vascular, plaquetas, eritrocitos, células del sistema inmune, terminales nerviosas, glándulas endócrinas, células del tejido conectivo entre las más relevantes.

1.2.1. Arteria umbilical humana y ATP extracelular

La arteria umbilical humana tiene la particularidad de no poseer inervación autónoma, por lo tanto sustancias vasoactivas de origen autocrino, paracrino o endocrino son las que modulan su diámetro y en consecuencia, la resistencia al flujo sanguíneo.

El aumento de ATPe produce en el músculo liso de esta arteria cambios en la concentración del calcio intracelular y modificaciones en la contractilidad del vaso [78]. El origen del aumento del ATPe en la arteria umbilical humana puede deberse bien a un proceso de injuria o daño tisular con la consecuente liberación del contenido intracelular de ATP [79], o bien a procesos fisiológicos regulados, a través de estructuras especializadas (transportadores ABC, panexinas y conexinas), por parte de los siguientes tipos celulares:

- **Células endoteliales:** se ha evidenciado que liberan ATP frente a un aumento del flujo sanguíneo que produce un efecto de roce sobre las células endoteliales (denominado *shear-stress*), en procesos inflamatorios, en condiciones de bajo Ca^{2+} extracelular, inducido por retroalimentación positiva por ATPe, por estimulación con acetilcolina, serotonina, trombina, entre otros [27][80][81][82].
- **Eritrocitos:** liberan ATP al medio extracelular frente a distintos estímulos fisiológicos y fisiopatológicos, como lo son la deformación mecánica, los cambios en la tensión de oxígeno y del pH, procesos infecciosos, estímulos farmacológicos [83][84].
- **Plaquetas:** se ha detectado la liberación de ATP por parte de plaquetas, durante el proceso de activación [85][86].
- **Células de músculo liso:** se ha propuesto que liberan ATP frente a un aumento en el *shear-stress*, por estimulación con trombina [87][88].

A su vez, se observó en explantes de vellosidades placentarias cultivados en situaciones de hipoxia, una disminución de la cantidad de ATP presente en el endotelio vascular [89], de forma que se podría especular que los niveles de

esta sustancia vasoactiva podrían estar alterados en la arteria umbilical humana en patologías con disminución de la oxigenación de la placenta (ej.: hipoperfusión placentaria en preeclampsia, retardo de crecimiento intrauterino).

1.2.2. Arteria umbilical humana y receptores purinérgicos P2X

Hasta la fecha se ha demostrado, por técnicas de inmunohistoquímica, que el receptor purinérgico ionotrópico de tipo P2X₁ es el receptor que se expresa mayoritariamente en las CML de esta arteria [90].

Otro grupo ha reportado la presencia del ARNm perteneciente a los receptores P2X₁, P2X₂, P2X₄, P2X₅, P2X₆, P2X₇, siendo el ARNm de P2X₂ únicamente presente en el segmento proximal de la arteria umbilical, y el ARNm de P2X₅ presente en las porciones medias y distales del mismo [91].

1.3. Acoplamiento funcional de los receptores purinérgicos con canales iónicos

Como se describió en detalle anteriormente, la activación de receptores purinérgicos, en particular de tipo P2X, genera una corriente catiónica rápida y transitoria a través del propio receptor. Una pregunta interesante que surge de este evento, discutida en la literatura de este campo de trabajo, se refiere a la relevancia del influjo de Ca^{2+} mediado por estos receptores en la fisiología de la CML vascular.

El canal de K^+ de alta conductancia, activado por voltaje y por Ca^{2+} intracelular, conocido con la sigla BKCa, tiene un rol muy importante en la fisiología de las CML vascular, en las cuales se encuentra altamente expresado y nuestro grupo de investigación ha caracterizado con detalle en la arteria umbilical humana [65][66][92][93].

El canal BKCa participa en la modulación de la respuesta contráctil a diferentes estímulos excitatorios celulares que implican aumentos en la concentración de Ca^{2+} intracelular ya sea por una despolarización de la membrana plasmática, liberación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplásmico (RS), u otro evento que lo genere [93]. Posee una gran sensibilidad al Ca^{2+} y se activa cuando el Ca^{2+} aumenta en el medio intracelular, tanto sea en forma global, localizado en pequeñas áreas celulares, o debido a liberaciones espontáneas locales de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico (chispas, conocidas en inglés como *sparks*). Este proceso tiene una gran relevancia fisiológica, ya que la misma señal que produce la contracción de la CML vascular (el aumento de calcio) induce también un mecanismo de relajación debido a la activación de los canales BKCa, que funciona como freno de la contracción y, en muchos casos, produce incluso la relajación celular.

El acoplamiento entre receptores de membrana y el canal BKCa se ha estudiado principalmente en el músculo liso de diferentes órganos, donde este canal cumple un rol fisiológico muy importante. Por ejemplo, interviene en la regulación del diámetro de los vasos sanguíneos, la función eréctil, el funcionamiento de la vejiga y la permeabilidad de las vías aéreas, entre otros.

El canal BKCa puede acoplarse funcionalmente a una variedad de receptores de membrana como son los receptores β -adrenérgicos, receptores de Acetilcolina, de Tromboxano A2 y de Angiotensina II. Este acoplamiento funcional involucra, generalmente, proteínas G las cuales transducen las señales recibidas por el receptor y generan cambios directos o indirectos en la actividad del canal. La resultante puede ser la inhibición o activación del BKCa. Recientemente se ha reportado un nuevo mecanismo de transducción, que involucra interacciones directas proteína-proteína entre el receptor de Tromboxano A2 y el canal BK [94][95]. Sin embargo, hasta la fecha son escasos los trabajos que demuestran acoplamiento funcional entre canales purinérgicos y el canal BKCa. En coronarias humanas se ha demostrado acoplamiento entre receptores purinérgicos metabotrópicos de tipo P2Y₂ y canales BKCa [64]. De manera similar se ha demostrado en células PC12 [96].

En la arteria umbilical humana no hay reportes bibliográficos que aborden este tema. En este trabajo de Tesis presentamos evidencias de que existe un acople funcional entre receptores purinérgicos ionotrópicos y el canal BKCa.

1.4. Objetivos

El **objetivo general** de este trabajo de Tesis Doctoral es contribuir al conocimiento y desarrollo de un área básica de importante impacto sobre la salud humana como lo es la fisiología vascular. Nos interesa aportar al conocimiento de los vasos humanos, por lo cual planteamos utilizar en este estudio la arteria umbilical humana (AUH), un vaso sanguíneo accesible, que se descarta luego del parto junto con la placenta, y que tiene un importante rol fisiológico en la regulación del flujo sanguíneo feto-placentario. Analizar las propiedades del músculo liso que integra la pared de esta arteria nos permite profundizar en el conocimiento de los factores endógenos que pueden regular el flujo de este lecho vascular.

Los **objetivos específicos** son:

- 1) en primer lugar, estudiar la respuesta que genera el ATP extracelular en las células de músculo liso de la AUH, caracterizando los cambios bioeléctricos que puede generar este agonista actuando a través de sus receptores ionotrópicos.
- 2) en segundo lugar, indagar si este agonista produce variaciones en la concentración del calcio intracelular y cuáles son las estructuras celulares que intervienen en la respuesta.
- 3) por último, analizar si existe un acople funcional entre receptores purinérgicos ionotrópicos y el canal de K^+ de alta conductancia sensible al voltaje y al Ca^{2+} intracelular, BKCa. Este canal es objeto de estudio de nuestro grupo de investigación y hemos caracterizado, en trabajos previos, sus propiedades electrofisiológicas e identificado su rol protagónico en la modulación del potencial de membrana de estas células.

Sección 2

Materiales y Métodos

2.1. Muestras de arteria umbilical humana. Obtención y disociación celular.

Para abordar el tema de estudio de esta Tesis, utilizamos la arteria umbilical humana (AUH), la cual tiene origen en la aorta fetal y forma parte de la circulación feto-placentaria. Tomando un segmento del cordón umbilical en el momento del parto es posible aislar este vaso sanguíneo, obteniendo así una muestra de tejido vascular humano. A partir del mismo, podemos aislar células musculares lisas (CML) en este caso utilizadas para el estudio de corrientes iónicas. Cabe destacar que esta arteria constituye un modelo experimental muy interesante para el estudio de la fisiología vascular, dado que permite, en un tejido humano, el estudio de receptores ionotrópicos y canales iónicos que participan en la regulación de la concentración de Ca^{2+} intracelular y que son poco conocidos en las CML vascular humano. Además, teniendo en cuenta la función de la AUH, permite estudiar los efectos de distintas condiciones fisiológicas, fisiopatológicas y farmacológicas, sobre una estructura fundamental en la regulación del flujo feto-placentario.

2.1.1. Obtención de la muestra

Utilizamos segmentos de AUH obtenidos a partir de cordones umbilicales provistos por el servicio de obstetricia del Instituto Central de Medicina y del Hospital Zonal Dr. Ricardo Gutiérrez ambos de la ciudad de La Plata. Los cordones utilizados provienen de parto vaginal o cesárea, de una población de madres sin enfermedades infecciosas, metabólicas ni cardiovasculares reportadas. El personal médico que asiste el parto corta un segmento de 10-15 centímetros de la parte medial del cordón umbilical. El resto del cordón umbilical es desechado junto con la placenta. El segmento de cordón umbilical se introduce en una solución de Krebs Ringer Bicarbonato

(KRB), con la siguiente composición (el número indica la concentración de cada compuesto expresada en mM): NaCl 130; KCl 4,7; Na₂HPO₄ 1,17; MgSO₄ 1,16; NaHCO₃ 24; CaCl₂ 2,5; pH ajustado a 7,4 con carbógeno (95% CO₂ + 5% O₂). La muestra se conserva en la solución KRB a 4°C hasta su utilización, dentro de las primeras 24 horas de ocurrido el parto.

En nuestro laboratorio se procede a la disección de la arteria umbilical, aislándola completamente del tejido conectivo circundante (gelatina de Wharton). Estos segmentos arteriales se utilizan inmediatamente para proceder a la disociación enzimática de las CML (figura 2.1.1).

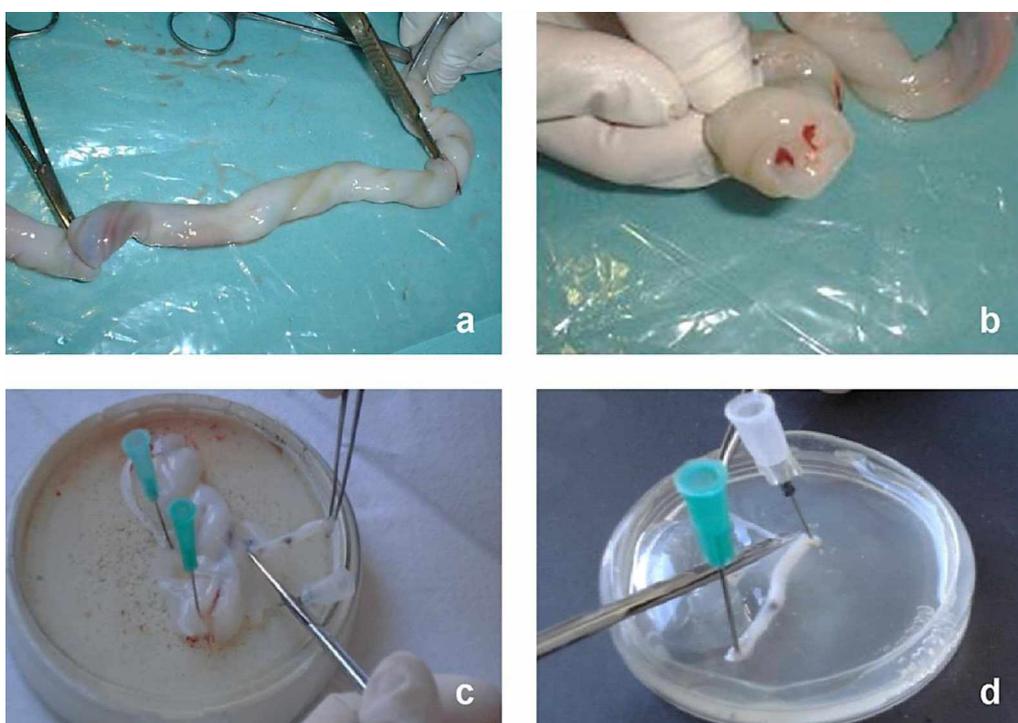


Figura 2.1.1. Fotografías tomadas en quirófano y en nuestro laboratorio. (a) y (b) corresponden la selección de un segmento de 10-15 cm de la porción medial de cordón umbilical. En (b) se observa un corte transversal donde pueden distinguirse 2 arterias umbilicales. (c) y (d) fueron tomadas en nuestro laboratorio y en ellas se muestra la limpieza del tejido conectivo circundante a la arteria umbilical y finalizando con la total disección de la arteria umbilical.

2.1.2. Disociación celular

La obtención de las CML aisladas de la AUH se realizó a partir del protocolo de disociación celular descrito por Klockner [97] y posteriormente modificado en nuestro laboratorio para minimizar la cantidad de enzima utilizada [65].

El método consiste en colocar un segmento arterial (20-40 mg), cortado en piezas de aproximadamente 2 x 2 mm, en una solución de disociación (SD) con la siguiente composición (el número indica la concentración de cada compuesto expresada en mM): ClNa 140; KH₂PO₄ 4,7; Cl₂Mg 1,2; HEPES 5; glucosa 6; pH ajustado a 7,4 con NaOH. Luego de 30 minutos se transfiere el tejido a un tubo conteniendo 1 ml de SD a la cual se le adiciona 2-3 mg de colagenasa tipo I. El tubo con el tejido permanece en un baño termostatzado a 35 °C con agitación suave durante 20-30 minutos. Durante ese período, cada 10 minutos, se realiza la dispersión del tejido con una pipeta Pasteur. Se extrae una alícuota de SD conteniendo las células aisladas que se van disociando del tejido y se centrifuga durante 3 minutos a 1000 rpm. El sobrenadante del tubo, que contiene SD con enzima, se vuelca nuevamente en el tubo que contiene tejido y se coloca nuevamente en baño termostatzado para continuar con la disociación. El precipitado del tubo, que contiene las CML, se resuspenden en SD sin enzima.

Las CML aisladas, y resuspendidas en SD, se colocan en cámaras de Petri de 3 ml, con fondo de vidrio, aptas para microscopio invertido. Y se mantienen a temperatura ambiente a 20-22 °C.

Las células se seleccionan por su aspecto fusiforme y relajado, para intentar lograr un sello de alta resistencia con los microelectrodos de *patch-clamp*, y se usan durante un período de 5 a 6 horas posterior a la disociación.

2.2. Registros electrofisiológicos en las células de músculo liso vascular aisladas de la arteria umbilical humana

La técnica de *patch-clamp* aplicada en modo de fijación de voltaje (más conocida en inglés como *voltage-clamp*) permite medir corrientes iónicas de transmembrana manteniendo el potencial de la membrana celular en valores fijos. Mientras que si se aplica en el modo de fijación de corriente (en inglés, *current-clamp*) es posible medir la variación de potencial de membrana (sin estímulo o aplicando un estímulo fijo de corriente). Es, por lo tanto, la técnica ideal para estudiar en tiempo real los eventos bioeléctricos que se producen a nivel celular debido a la actividad de canales iónicos y receptores ionotrópicos. Estudiando estos fenómenos en condiciones adecuadas para cada caso es posible identificar los iones que transportan la corriente, la magnitud de las mismas, la cinética, su sensibilidad al voltaje y/o estímulos de diferente tipo, y su perfil farmacológico. Además tiene gran versatilidad, dado que las diferentes configuraciones en las que se puede utilizar esta técnica, permiten abordar el estudio electrofisiológico de toda la población de canales y/o receptores ionotrópicos presentes en la membrana celular, de alguna subpoblación de interés, o de un único canal o receptor.

La técnica consiste en la aproximación de una pipeta de vidrio a la superficie de la membrana de la célula elegida, utilizando para este fin un micromanipulador. Seguidamente se aplica una succión desde la pipeta, estableciendo un sello de alta resistencia de aproximadamente 10 G Ω (en inglés, *Giga-seal*) entre el vidrio de la misma y la membrana celular.

La pipeta de vidrio, la cual es descartable y se utiliza una por cada célula, se coloca en un dispositivo (conocido en inglés como *holder*) que tiene un alambre de plata, el cual se sumerge en la solución que contiene la pipeta

de vidrio, formando un electrodo de Ag/AgCl. Este dispositivo está conectado físicamente a un amplificador operacional, el cual en el modo de fijación de voltaje (*voltage clamp*) permite fijar el voltaje celular al valor deseado y registrar la corriente celular. Se utilizan pipetas de vidrio WPI PG52165-4 (*World Precision Instruments*), fabricándose en el momento de realizar los experimentos con un equipo de calentamiento y estiramiento controlado (*Micropipette puller PP-83, Narishige Scientific Instrument*).

En la configuración denominada de célula completa (WC del inglés *whole cell*) se registran corrientes macroscópicas representativas de la totalidad de canales iónicos o receptores ionotrópicos presentes en la membrana celular, mientras que en las configuraciones denominadas de canal único (SC del inglés *single channel*) en sus variantes de *cell attached* (CA), *inside out* (IO) y *outside out* (OO) es posible registrar la corriente de un solo canal iónico.

En la figura 2.2.1 se presenta un esquema con las distintas configuraciones utilizadas en esta tesis:

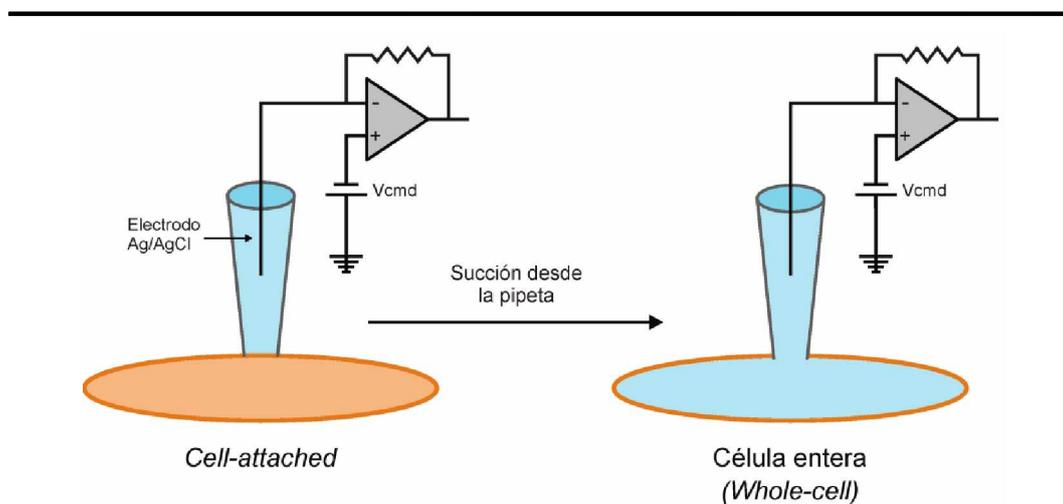


Figura 2.2.1. Configuraciones de patch clamp que se utilizaron en los registros de *patch clamp*. El esquema eléctrico mostrado hace referencia a las características del amplificador operacional utilizado. Vcmd: voltaje establecido externamente.

En la configuración de CA se mantiene la integridad de la célula, de manera que tanto la solución de la pipeta (SP) como la del baño (SB) están en contacto con la cara extracelular de la membrana. Esta configuración permite registrar las corrientes de los canales iónicos presentes en la porción de membrana bajo la punta de la pipeta (en inglés, *patch*) al formar el sello de alta resistencia. Además, en las condiciones de CA se conservan todas las interacciones y regulaciones intracelulares de la célula sellada.

En nuestro caso utilizamos pipetas de entre 2-4 M Ω de resistencia, cuya punta tiene un área de aproximadamente 1,5 μm^2 . La resolución de esta técnica permite registrar la corriente iónica durante las aperturas de los canales en forma individual, los cuales se observan como saltos discretos del orden de los picoAmperes (pA, 10^{-12} Amperes) de corriente.

A partir de la configuración de CA, se puede lograr el pasaje a la configuración de WC (figura 2.2.1), sólo que en este caso se realiza una segunda presión negativa (succión) desde la pipeta, que logra retirar la porción de membrana sellada. De esta manera la solución de la pipeta dializa la célula y se establece una conexión eléctrica entre el electrodo (en contacto con la solución de la pipeta) y el interior intracelular (ver esquema en la figura 2.2.1). Esta configuración representa un buen modelo para el estudio de la población completa de canales iónicos y/o receptores ionotrópicos presentes en la membrana celular.

Utilizando soluciones adecuadas para cada caso, se pueden obtener condiciones de registro donde la célula se encuentre en una situación similar a la fisiológica.

Observamos las células con un microscopio invertido (Televal 3 - Zeiss Jena), dentro de una caja de Faraday para filtrar los ruidos eléctricos del

ambiente. La señal de corriente iónica fue registrada en función del tiempo con un amplificador *Axopatch 200A* (*Axon Instruments*) y se filtró adecuadamente con un filtro de tipo *Bessel* de 4 polos a una frecuencia de 2 kHz. Se digitalizó con una plaqueta digitalizadora *Digidata 1200* (*Axon Instruments*) con una frecuencia de muestreo de 16 kHz en los registros de corriente en las configuraciones de CA, y de 20 kHz en los registros de corrientes macroscópicas en la configuración de WC.

Las soluciones ensayadas fueron perfundidas por gravedad, a una velocidad aproximada de 1 ml/min, con una pipeta multivías colocada en la proximidad de la célula investigada. Las distintas drogas ensayadas fueron agregadas a las soluciones utilizadas en cada uno de los protocolos y, en los casos que correspondiera, a la solución extracelular que se utiliza en la condición control se le agrega el solvente en el cual se disolvió la droga.

Luego de ensayar un protocolo en una célula, se reemplazó la cámara de Petri experimental por otra conteniendo una nueva alícuota de células.

Todos los experimentos electrofisiológicos fueron realizados a temperatura ambiente, 20-22 °C.

2.3. Registros y metodología de análisis de las corrientes macroscópicas medidas en configuración de célula completa (*whole cell*)

2.3.1. Registros de la corriente evocada por ATP extracelular en configuración de célula completa (*whole cell*)

En este trabajo se analizaron las corrientes macroscópicas evocadas por la aplicación de distintas concentraciones de ATP extracelular (ATPe) manteniendo durante todo el experimento un valor de potencial de membrana de -50 mV. En estas condiciones experimentales, la activación de receptores purinérgicos ionotrópicos (P2X) funcionales se observará como una corriente entrante catiónica con características cinéticas típicas de uno o varios subtipos de esta familia de receptores.

Se utilizaron las siguientes soluciones extracelular y de pipeta, de composición iónica similar a las fisiológicas:

- Solución Extracelular (SE) (el número indica la concentración de cada compuesto expresada en mM): NaCl 150; KCl 5,4; CaCl₂ 2,5; MgCl₂ 1,2; glucosa 6; HEPES 5; pH ajustado a 7,4 con NaOH.
- Solución de la pipeta - *whole cell* (SP-WC) (el número indica la concentración de cada compuesto expresada en mM): KCl 130; ácido etilenglicoltetraacético (EGTA, del inglés *ethylene glycol tetraacetic acid*) 0,1; HEPES 20; pH ajustado a 7,4 con KOH.

El ATP se agregó a la SE, hasta alcanzar la concentración necesaria para cada experimento planteado. Se trabajó con ATPNa₂ pesado en el momento cada día de experimento, para evitar la degradación del mismo. En

aquellos casos donde además se probó el efecto de suramina (inhibidor de los receptores ionotrópicos P2X), la misma también se preparó en el día del experimento.

La identidad de los iones que llevan la corriente evocada por ATPe, se evaluó utilizando la misma solución de la pipeta (SP) descrita en el párrafo anterior y se modificó la solución extracelular. Se utilizaron dos soluciones extracelulares diferentes:

- SE 0Na⁺ (el número indica la concentración de cada compuesto expresada en mM): colina Cl 150; KCl 5,4; CaCl₂ 2,5; MgCl₂ 1,2; glucosa 6; HEPES 5; pH ajustado a 7,4 con KOH. Esta solución tiene la misma osmolaridad que la solución control SE reemplazando el Na⁺ por el ion colina, no permeante a través de los receptores purinérgicos.
- SE 0Ca²⁺ (el número indica la concentración de cada compuesto expresada en mM): NaCl 150; KCl 5,4; EGTA 1; MgCl₂ 1,2; glucosa 6; HEPES 5; pH ajustado a 7,4 con NaOH. Esta solución tiene la misma osmolaridad que la solución control SE pero se omitió el agregado de CaCl₂ y se agregó EGTA en una concentración 1 mM, de manera de obtener una concentración final estimada de Ca²⁺ libre menor a 4.10⁻⁹ M. Este valor fue calculado con el programa libre MaxChelator [98] para una concentración nominal de Ca²⁺ contaminante estimada en 10 μM de Ca²⁺.

Análisis de los registros de la corriente macroscópicas evocada por ATPe

En la mayoría de las células ensayadas, en respuesta al agregado de ATP se observó una corriente iónica como la que se presenta en la figura 2.3.1.

En cada una de ellas se analizó la magnitud o intensidad de la corriente y la cinética de decaimiento de la corriente coincidente con la desensibilización que ocurre a nivel del receptor.

Para obtener la magnitud o intensidad de la corriente se midió la amplitud de la misma desde la línea de base (nivel de corriente al potencial fijado en las condiciones de registro en -50 mV) hasta el nivel máximo de corriente evocada por ATPe (corriente al pico). La corriente tiene signo negativo como se espera para una corriente entrante de cationes en función de las convenciones de la técnica de *patch-clamp*. Este valor de corriente se expresó en unidades de corriente de picoAmperes (pA).

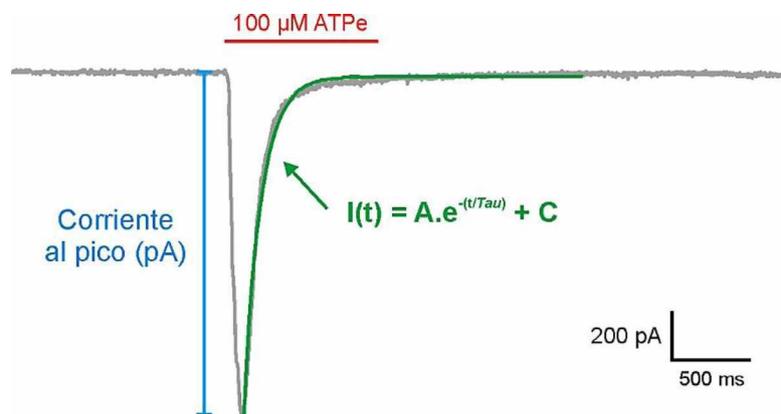


Figura 2.3.1. Registro típico en configuración WC de corriente purinérgica mediada por P2X, evocado por aplicación de 100 μ M de ATP extracelular. Se indica en la figura los parámetros que fueron evaluados en esta tesis: corriente al pico y constante de tiempo Tau, obtenida del ajuste exponencial del proceso de desensibilización.

La cinética del proceso de desensibilización se cuantifica a partir del ajuste del decaimiento de la corriente (desde el pico hasta la línea de base), con una función exponencial simple:

$$I(t) = A \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} + C$$

Donde $I(t)$ representa el valor de la corriente, a un tiempo t . Los valores A y C son constantes del ajuste de la corriente y τ es la constante de tiempo, que representa el tiempo transcurrido hasta disminuir un 63% la corriente máxima alcanzada. Por lo tanto se utiliza como parámetro del proceso de desensibilización del receptor en contacto con ATPe, indicando la cinética de la transición desde el estado activado al desensibilizado.

El valor de τ en particular permite sugerir el subtipo de receptor P2X que podría ser responsable de esta corriente en la AUH, ya que existen diferencias significativas en la cinética de desensibilización en los distintos subtipos de receptores P2X (ver *Sección 1. Introducción*).

2.3.2. Registros de la corriente mediada por el canal BKCa en configuración de célula completa (*whole cell*)

Para estudiar el efecto que produce la activación de la corriente purinérgica sobre la actividad del canal BKCa, en configuración WC, se utilizaron las mismas soluciones extracelular (SE) e intracelular (SP-WC) descritas en el punto 2.3.1.

Nuestro grupo ha caracterizado ampliamente las propiedades electrofisiológicas de la corriente mediada por este canal en las CML de la AUH, la dependencia del voltaje y la presencia de ruido son algunas de las características típicas de este tipo de corriente.

Para el protocolo de rampa se partió de un potencial de mantenimiento de -50 mV y previo a la rampa se realizó un pulso a +80 mV de 500 milisegundos (ms). Esta duración garantizó que al inicio de la rampa el canal

BKCa estuviese en estado estacionario a ese potencial. Luego se procedió a la realización de una rampa de 2 segundos desde +80 mV hasta -80 mV. Y finalizó volviendo al potencial de mantenimiento (-50mV) por 500 ms (figura 2.3.2). Se optó por realizar una rampa hiperpolarizante debido a que la cinética de deactivación del canal es más rápida que la cinética de activación. Y la relación de cambio de voltaje de la rampa (0.08 mV/ms) lo suficientemente lenta para evitar una distorsión debido a la cinética de deactivación, como previamente hemos demostrado [92].

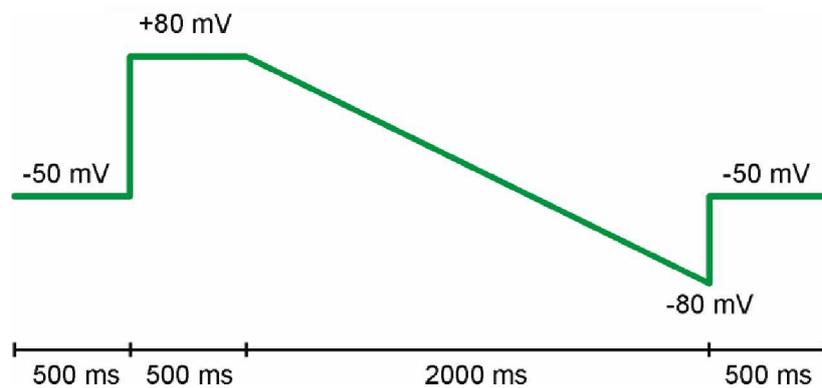


Figura 2.3.2. Esquema del protocolo de rampa de voltaje utilizado para el registro de la actividad del canal BKCa. Se indican los voltajes y los tiempos establecidos para el mismo.

Del análisis de las corrientes evocadas por la rampa de voltaje en las condiciones control antes y después del agregado de 100 μ M ATP se obtuvo el valor de la corriente total evocada por la rampa de voltaje a distintos valores de potencial y el valor de potencial al cual la corriente se hace cero (potencial de reversión, E_{rev}). En estas condiciones de registro de la corriente macroscópica (soluciones intra y extracelulares similares a las fisiológicas) el valor de E_{rev} es indicativo del valor de potencial de membrana de reposo de la célula.

2.4. Registros y metodología de análisis de las corrientes de canal único en configuración *cell attached*

Con el objetivo de estudiar los efectos que produce la activación de los receptores purinérgicos sobre la probabilidad de apertura (P_o) y conductancia del canal BKCa, se realizaron registros de canal único, en configuración de cell attached (CA) de las corrientes mediadas por este canal presente en las CML aisladas de la AUH [65].

2.4.1. Registros de las corrientes de canal único mediadas por el canal BKCa en configuración *cell attached*

Una vez obtenido el sello de alta resistencia se comprobó la presencia del canal BKCa en el *patch* mediante la medida de la conductancia unitaria del mismo. Este canal fue previamente caracterizado por nuestro grupo en idénticas condiciones experimentales.

Se utilizaron las siguientes soluciones iónicas:

- Solución de la pipeta - Canal Unico (SP-CU) (el número indica la concentración de cada compuesto expresada en mM): KCl 140; CaCl₂ 1; MgCl₂ 0,5; glucosa 6; HEPES 10; pH ajustado a 7,4 con KOH.
- Solución Extracelular (SE) (el número indica la concentración de cada compuesto expresada en mM): NaCl 150; KCl 5,4; CaCl₂ 2,5; MgCl₂ 1,2; glucosa 6; HEPES 5; pH ajustado a 7,4 con NaOH. Esta solución es idéntica a la utilizada solución extracelular utilizada en los protocolos de WC.

- SE 0Ca^{2+} (el número indica la concentración de cada compuesto expresada en mM): NaCl 150; KCl 5,4; EGTA 1; MgCl_2 1,2; glucosa 6; HEPES 5; pH ajustado a 7,4 con NaOH. Esta solución tiene la misma osmolaridad que la solución control SE pero se omitió el agregado de CaCl_2 y se agregó EGTA, un quelante de Ca^{2+} para reducir completamente su concentración. Su composición es idéntica a la SE 0Ca^{2+} utilizada utilizada en los protocolos de WC.

Para analizar si existe acoplamiento funcional entre los receptores purinérgicos y el canal BKCa, se registró la actividad basal del canal en condiciones control y luego del agregado de $100\ \mu\text{M}$ ATPe, fijando el valor del potencial de membrana a $0\ \text{mV}$. En cada condición se registró la actividad del canal por lo menos 1 minuto para garantizar la estabilidad de las condiciones de registro. El mismo protocolo experimental se realizó utilizando una solución SE sin calcio extracelular (SE 0Ca^{2+}).

2.4.2. Análisis de los registros de las corrientes de canal único mediadas por el canal BKCa en configuración *cell attached*

La actividad de un canal iónico se cuantifica en términos de probabilidad de apertura (P_o) del canal. La misma puede ser modificada por numerosos factores como el potencial de membrana, sustancias químicas, interacción proteína-proteína, entre tantos otros. La P_o se define como la relación del tiempo que un canal pasa en el estado abierto dividido por el tiempo total (tiempo en el estado abierto más tiempo en el estado cerrado). En la mayoría de los experimentos la probabilidad de apertura se estima con el parámetro $N P_o$, donde N es el número total de canales (de igual valor de amplitud) presentes en el *patch*, y P_o es la probabilidad de apertura individual del canal. Para calcular este parámetro se idealizaron los registros de corriente

de canal único según el criterio de 50% de la amplitud de corriente como valor umbral y a partir de ellos se obtuvo el valor de NPo, según la siguiente fórmula:

$$NPo = \frac{\sum_1^n j \cdot t_j}{T}$$

En donde T es la duración del registro, t_j es el tiempo de permanencia con $j=1, 2, 3...n$ canales abiertos. Este valor debe ser calculado una vez que la Po del canal alcanzó el estado estacionario. Para confirmar este requisito se generaron gráficos de estabilidad de NPo en los cuales se representan los valores de NPo calculados en intervalos de 5 segundos en función del tiempo del registro de canal único. A partir de los mismos podemos confirmar que la actividad del canal no está variando en el tiempo de registro (en condiciones control), como también detectar a partir de qué punto se llega a un nuevo estado estacionario al someter al canal a un estímulo o una inhibición.

2.5. Medida de cambios en la concentración intracelular de calcio mediante técnicas fluorimétricas

Los ensayos de determinación de la concentración de Ca^{2+} intracelular se realizaron en el laboratorio del Prof. Franco Tanzi, en el Departamento de Ciencias Fisiológicas y Farmacológicas de la Universidad de Pavia, Italia, con quien nuestro laboratorio mantiene una estrecha colaboración.

Para estimar el nivel de Ca^{2+} citoplasmático se utilizó una técnica microfluorimétrica, cuyo fundamento se basa en el empleo de la molécula indicadora Fura-2, con propiedades fluorescente dependientes de la unión con el Ca^{2+} , la cual experimenta un corrimiento en su espectro de absorción dependiendo de su unión al Ca^{2+} (figura 2.4.1).

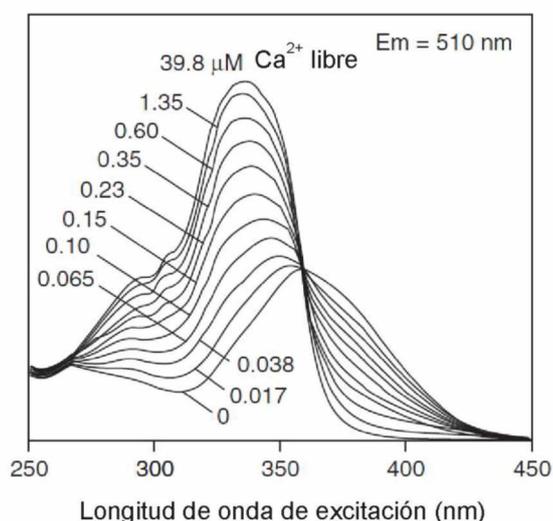


Figura 2.4.1. Espectro de absorción (o excitación) del Fura-2, medido a distintas concentraciones de Ca^{2+} libre. Se observa que existe un corrimiento de la longitud de onda de máxima absorción de fura-2, desplazándose desde los 363 nm, para la forma no unida al Ca^{2+} , hacia los 335 nm para la forma unida al Ca^{2+} . Modificado de *Molecular Probes - Invitrogen* [99].

El Fura-2 fluoresce emitiendo luz a una longitud de onda de 510 nm, presentando máxima excitación a 363 nm para la forma libre y 335 nm para la forma unida al Ca^{2+} . A fines experimentales, se selecciona la longitud de onda de 380 nm para cuantificar la forma libre y 340 nm para la forma unida al Ca^{2+} .

En estos experimentos se trabajo con segmentos de arteria umbilical obtenidos de muestras de cordones umbilicales provistos por el Dr. R. Spinillo del Hospital San Mateo de Pavia, Italia.

Los segmentos arteriales se limpiaron del tejido conectivo circundante y se prepararon anillos de aproximadamente 2 mm de ancho a los que en forma mecánica se les removió el endotelio, posteriormente se abrieron para obtener segmentos rectangulares. Estos segmentos se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente y al reparo de la luz en una solución extracelular (SE), cuya composición se detalló en la sección 2.3.1, y a la que se agregó Fura-2 en su forma de acetoximetil éster: Fura-2-AM a una concentración de 16 μM . Luego de este tiempo se lavó con la solución SE a fin de remover el exceso de Fura-2-AM. Esta sustancia permea la membrana celular concentrándose en el citoplasma celular gracias a la actividad de esterases que la desesterifican y así el Fura-2 no es capaz atravesar las membranas por lo que no se la encuentra en el interior de organoides como el retículo sarcoplásmico o la mitocondria. De esta forma durante los experimentos, los cambios en la concentración de Ca^{2+} que se registran corresponden al citoplasma de las células cargadas. El preparado se excita alternativamente con las dos longitudes de onda (340 y 380 nm) y se registra la intensidad de luz emitida a 510 nm en cada caso. Luego se utiliza el cociente de intensidades como indicador de la concentración citoplasmática de Ca^{2+} .

Los experimentos se realizaron fijando el segmento vascular con pequeñas agujas al fondo de una placa de Petri que contenía una silicona para ese fin. Esta placa fue luego montada en un microscopio de epifluorescencia (*Zeiss, Axiolab*) equipado con una lámpara de mercurio de 100 W. El preparado se visualizó gracias a un objetivo de inmersión en agua (*Zeiss 63X Achromplan*). La luz con la que se excitó fue filtrada a través de un filtro infrarrojo, un filtro neutro y un filtro de longitud de onda de 340 o de 380 nm, (*Chroma Technology, Brattleboro*) los cuales se cambian en forma alternada cada 2 segundos con una rueda de filtros (*Lambda 10, Sutter Instrument*). La luz emitida fue filtrada para seleccionar la de 510 nm antes de ser colectada por una cámara de alta sensibilidad (*Extended-ISIS Camera, Photonic Science, Millham, Reino Unido*). En la figura 2.4.2 se esquematiza la disposición de los elementos del equipo.

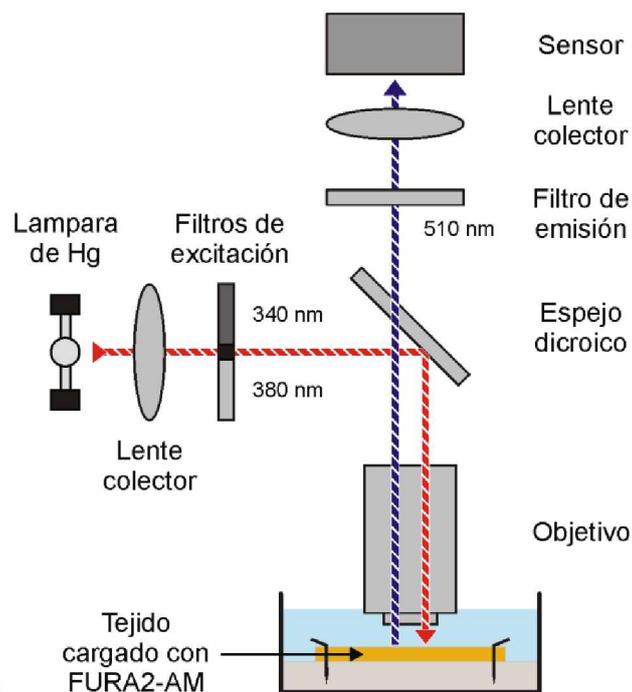


Figura 2.4.2. Esquema de la disposición de los elementos utilizados en el equipo de medición de Ca^{2+} intracelular por medidas fluorimétricas.

Con un programa desarrollado en el laboratorio se controlaron la cámara, los filtros y el obturador y se midió la fluorescencia de un número discreto de regiones de interés (ROIs, del inglés *regions of interest*) que correspondieron a más de una célula de músculo liso (figura 2.4.3).

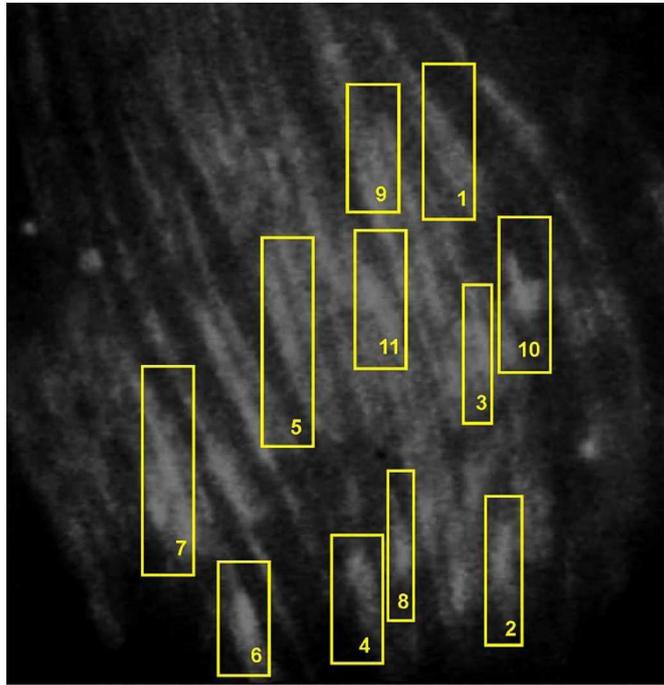


Figura 2.4.3. Captura de un experimento de medida de Ca^{2+} intracelular, donde se muestra las áreas de interés (ROIs) escogidas para cuantificar de ellas la relación de fluorescencia F340/F380.

Las soluciones se aplicaron con pipetas Pasteur volcándolas desde el objetivo del microscopio y se removieron gracias a una bomba de vacío conectada *ad hoc*.

La composición de soluciones utilizadas es idéntica a las utilizadas en los registros electrofisiológicos y respeta la nomenclatura usada. Las soluciones utilizadas con drogas e indicadores fueron preparadas en el día del experimento y descartadas al finalizar el mismo, para garantizar que no existiese degradación con el paso de los días.

2.6. Análisis estadístico de los datos

Los resultados fueron expresados como la media \pm error *standard* de la misma. Se realizaron prueba t de Student para comparar entre 2 grupos, mientras que la comparación entre múltiples grupos se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA seguido de un test de *Holm-Sidack*).

Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas en los casos en que el valor de p fue menor a 0,05.

Composiciones de las soluciones utilizadas - compendio

Krebs Ringer Bicarbonato (KRB)

Droga	[mM]
NaCl	130
KCl	4.7
Na ₂ HPO ₄	1.17
MgSO ₄	1.16
NaHCO ₃	24
CaCl ₂	2.5

pH ajustado a 7,4 con gas carbógeno
(95% CO₂ + 5% O₂).

Solución de disociación (SD)

Droga	[mM]
NaCl	140
KH ₂ PO ₄	4.7
MgCl ₂	1.2
HEPES	5
Glucosa	6

pH ajustado a 7,4 con NaOH

Solución extracelular (SE)

Droga	[mM]
NaCl	150
KCl	5.4
MgCl ₂	1.2
CaCl ₂	2.5
Glucosa	6
HEPES	5
pH ajustado a 7,4 NaOH	

Solución extracelular sin sodio (SE 0Na⁺)

Droga	[mM]
Cloruro de colina	150
KCl	5.4
MgCl ₂	1.2
CaCl ₂	2.5
Glucosa	6
HEPES	5
pH ajustado a 7,4 KOH	

Solución extracelular sin calcio (SE 0Ca²⁺)

Droga	[mM]
NaCl	150
KCl	5.4
MgCl ₂	1.2
EGTA	1
Glucosa	6
HEPES	5
pH ajustado a 7,4 NaOH	

Solución de pipeta - *whole cell* (SP-WC)

Droga	[mM]
KCl	130
EGTA	0.1
HEPES	20
pH ajustado a 7,4 KOH	

Solución de pipeta - Canal Único (SP-CU)

Droga	[mM]
KCl	140
MgCl ₂	0.5
CaCl ₂	1
Glucosa	6
HEPES	5
pH ajustado a 7,4 KOH	

Sección 3

Resultados

3.1. Caracterización electrofisiológica de los receptores purinérgicos ionotrópicos de tipo P2X en células de músculo liso de la arteria umbilical humana

En las células de músculo liso (CML) de la arteria umbilical humana (AUH), la expresión de distintos subtipos de receptores P2X ha sido reportada por *Bo y col.* en el año 1998 [90] empleando técnicas inmunohistoquímicas y diferenciación farmacológica. Posteriormente, en el año 2003, *Valdecantos y col.* [91] amplía esta búsqueda, hacia otros vasos feto-placentarios, y establece la presencia de ARNm de distintos P2X por RT-PCR. Los subtipos detectados han sido los P2X 1, 4, 5, 6 y 7.

Nuestro trabajo pone en evidencia la presencia funcional de este tipo de receptores purinérgicos inotrópicos P2X, probablemente del subtipo P2X₁, en las CML disociadas enzimáticamente de la AUH y su rol en la regulación del Ca²⁺ intracelular.

3.1.1. Activación de corrientes purinérgicas a partir del agregado de ATP extracelular en distintas concentraciones

Utilizando la técnica de *patch clamp* observamos que en este tipo celular el agregado de adenosín trifosfato en forma extracelular (ATPe) y a distintas concentraciones evoca, en todos los casos, una corriente entrante, despolarizante y transitoria (figura 3.1.1). El registro de esta corriente se realizó en configuración de célula entera (WC, del inglés *whole cell*), en condiciones iónicas intra y extracelulares similares a las condiciones fisiológicas y fijando el voltaje a -50 mV, valor de potencial de membrana de reposo que presenta este tipo celular [100][101].

El procedimiento experimental consistió en: (ver mayores detalles en *Sección 2- Materiales y Métodos*)

- a) suspender las células disociadas en solución extracelular (SE) colocar alícuotas de esta suspensión en placas de Petri con fondo de vidrio y esperar a que las células se adhieran a la superficie de vidrio.
- b) colocar una placa de Petri bajo microscopio. En nuestro caso utilizamos un microscopio invertido. Agregar solución extracelular SE, elegir una célula que se mantenga bien adherida al vidrio y colocar la vía de perfusión cerca de la célula elegida, para que el cambio de soluciones se vea rápidamente reflejado en la activación de la corriente operada por ligando. En estas condiciones se realizó el sello de alta resistencia (configuración *cell attached*) y el posterior pasaje a configuración de WC.
- c) una vez en WC, se esperó un tiempo de 3 a 5 minutos, para alcanzar una condición estable de registro con perfusión constante de SE. Es importante mantener el flujo de perfusión abierto con el fin de evitar posibles artefactos y ruidos en el registro eléctrico debido al inicio de la perfusión.
- d) cierre de la perfusión de SE y apertura de la perfusión de SE con ATP. Para cada agregado de ATPe se utilizó una única célula de cada placa.

El primer objetivo de esta serie experimental fue encontrar una concentración de ATP, capaz de activar el receptor P2X, en un rango de valores que las células eventualmente pudieran enfrentarse, sea en condiciones fisiológicas o fisiopatológicas [85][79].

Los resultados ilustrados en la figura 3.1.1, muestran que el ATPe induce una corriente catiónica entrante (hacia el interior celular) que alcanza un valor de corriente máximo (pico) e inmediatamente, aún en presencia del ligando, decae hasta el valor de corriente inicial, debido a un proceso de desensibilización del receptor, propio de los receptores P2X₁ y P2X₃ [58].

Como se muestra en los registros típicos seleccionados en la figura 3.1.1, y en los valores medios de corriente y de constante de tiempo de desensibilización (*Tau*) representados en el gráfico de barras, la magnitud y la cinética de la corriente dependen de la concentración de ATPe. Esta corriente ocurre en forma inmediata a la aplicación del ATPe, siendo la concentración de 100 μ M la que evoca las corrientes con mayor reproducibilidad.

Además observamos que luego de evocada la corriente con un primer estímulo con ATPe y realizando un lavado del mismo durante 12 a 15 minutos (dependiendo de la posibilidad de mantener las condiciones de registro de WC), la aplicación de un segundo estímulo no evoca respuesta (4 de 16 células) o produce una corriente cuya magnitud es significativamente menor (en 12 de 16 células), figura 3.1.2. Este resultado muestra que la recuperación del estado desensibilizado de estos receptores es un proceso lento. Otra característica típica de los receptores P2X [102].

Estos registros constituyen la primera observación funcional de corrientes iónicas evocadas por ATPe en CML vascular humano.

Las características cinéticas de la corriente observada nos sugieren que el subtipo de receptor P2X que media esta corriente es del subtipo P2X₁, el cual puede presentarse como homotrímico, o bien conformar heterotrímeros junto con otros subtipos, pero con una preponderancia del componente P2X₁.

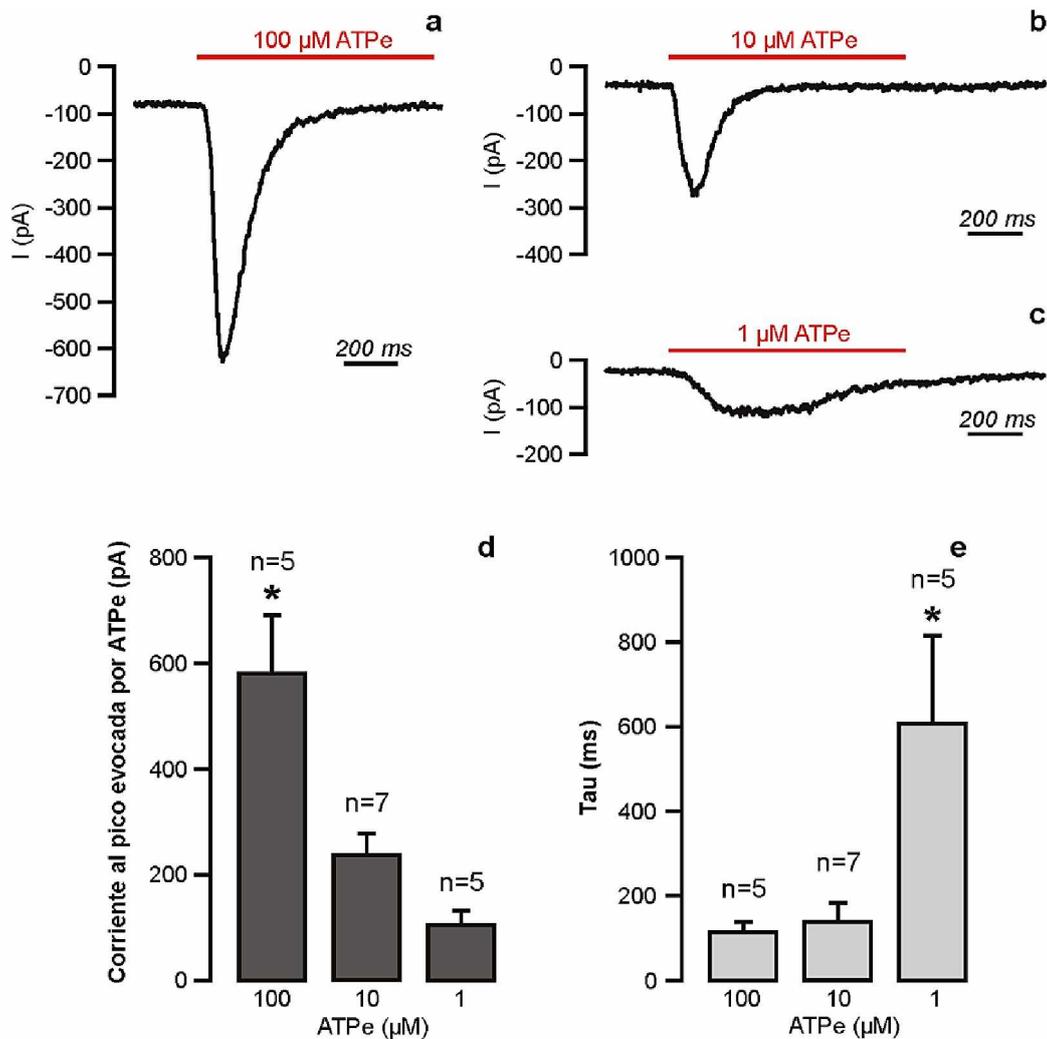


Figura 3.1.1. Corrientes macroscópicas evocadas por el agregado de ATP desde el lado extracelular, en configuración WC en CML de AUH. Registros típicos de corrientes al aplicar distintas concentraciones de ATPe **a**: 100 μM, **b**: 10 μM y **c**: 1 μM en solución extracelular control (SE). El potencial de registro se mantiene constante en un valor de -50 mV. **d**: valores medios de la corriente al pico, evocadas en las condiciones indicadas en a (n=5), b (n=7) y c (n=5), junto con sus respectivos errores standard de la media (ESM). **e**: valores medios de la constante temporal de desensibilización (*Tau*) en las condiciones indicadas en a (n=5), b (n=7) y c (n=5), junto con sus respectivos ESM. El símbolo * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los valores, por comparación múltiple (Análisis de varianza de una vía -ANOVA- y test de Holm-Sidak).

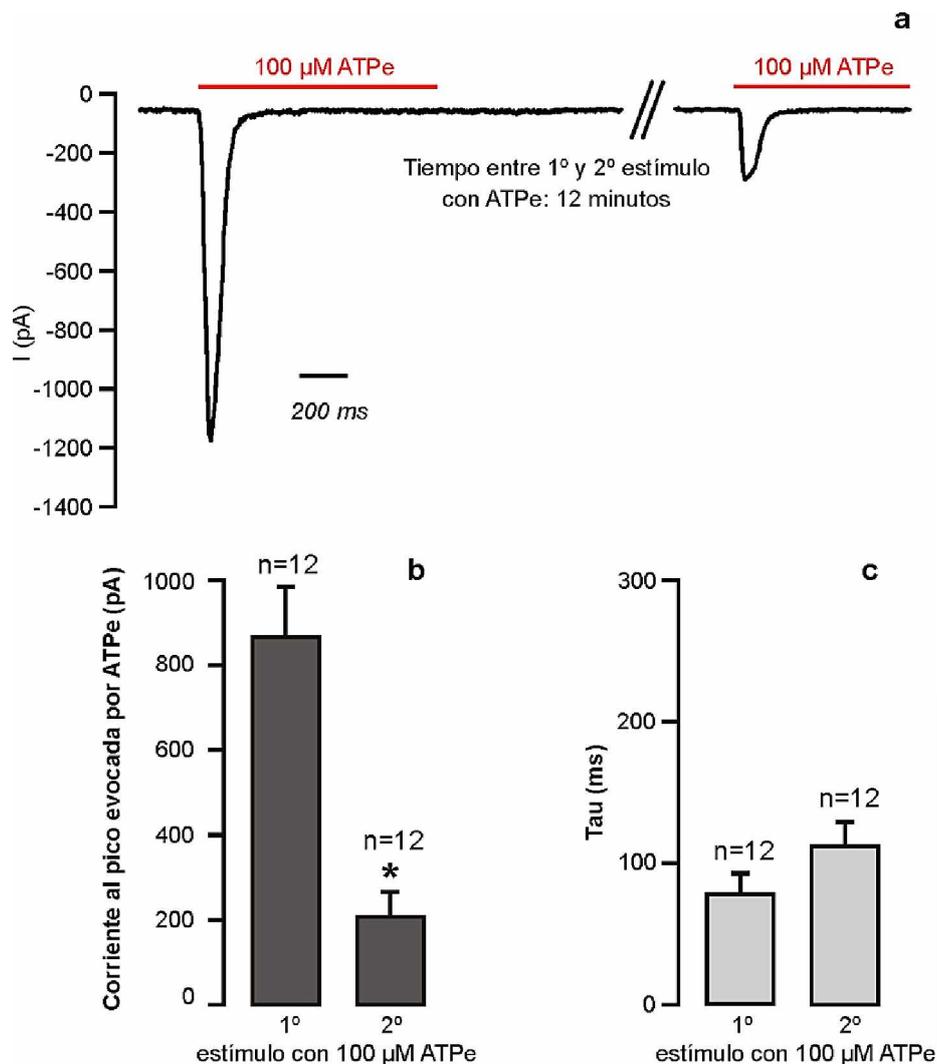


Figura 3.1.2. Corrientes macroscópicas evocadas por el agregado de ATP desde el lado extracelular, en configuración WC en CML de AUH. **a:** Registros típicos de corrientes al aplicar 100 μM de ATPe en solución extracelular control (SE). El potencial de registro se mantiene constante en un valor de -50 mV. **b:** valores medios de la corriente al pico, junto con sus respectivos errores standard de la media (ESM), obtenidos en el primer estímulo con ATPe (n=12) y un segundo estímulo con ATPe (n=12), con un lavado de 12 minutos con SE entre aplicaciones. **c:** valores medios de la constante temporal de desensibilización (*Tau*) en las condiciones indicadas en b, junto con sus respectivos ESM. El símbolo * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los valores, por prueba t de Student.

3.1.2. Inhibición de corrientes purinérgicas por suramina y zinc

En segundo lugar realizamos la caracterización farmacológica de la corriente evocada por ATPe, utilizando como inhibidores de la corriente a la suramina en concentraciones 100 y 300 μM , y el Zn^{2+} a una concentración de 100 μM , ambos inhibidores fueron agregados en la solución extracelular 3 minutos antes de la aplicación del estímulo con 100 μM de ATPe, y además fueron mantenidos durante el estímulo. La suramina es un antagonista de los receptores purinérgicos de tipo P2X, ampliamente utilizado para poner en evidencia esta subfamilia de receptores purinérgicos [103]. Por otro lado el Zn^{2+} , si bien inhibe corrientes iónicas a través de otros tipos de canales iónicos, en este caso se utiliza también para identificar esta corriente ya que su acción se está probando selectivamente sobre la corriente evocada por ATPe. Se conoce que dentro de los receptores P2X, el Zn^{2+} tiene efecto inhibitor solo sobre los P2X₁, y sobre el resto de los receptores P2X tiene un efecto ambiguo, pudiendo activar o no modificar la actividad de los mismos [104].

Los resultados presentados en la figura 3.1.3, muestran que ambas drogas, aplicadas desde el lado extracelular, producen inhibición de la corriente evocada por 100 μM de ATPe. En una concentración de 100 μM , tanto la suramina como el Zn^{2+} , disminuyen significativamente el valor de la corriente máxima alcanzada. Solo para el caso de la suramina, esta disminución de corriente se vio acompañada además de un aumento significativo de la *Tau*. A una concentración de 300 μM , la suramina provocó la inhibición total de la corriente evocada por 100 μM de ATPe.

Los resultados de bloqueo por suramina y Zn^{2+} , en las concentraciones ensayadas, nos permiten reforzar nuestra idea de que el receptor P2X subtipo 1 es el principal responsable de mediar la corriente evocada por ATPe en las CML de AUH.

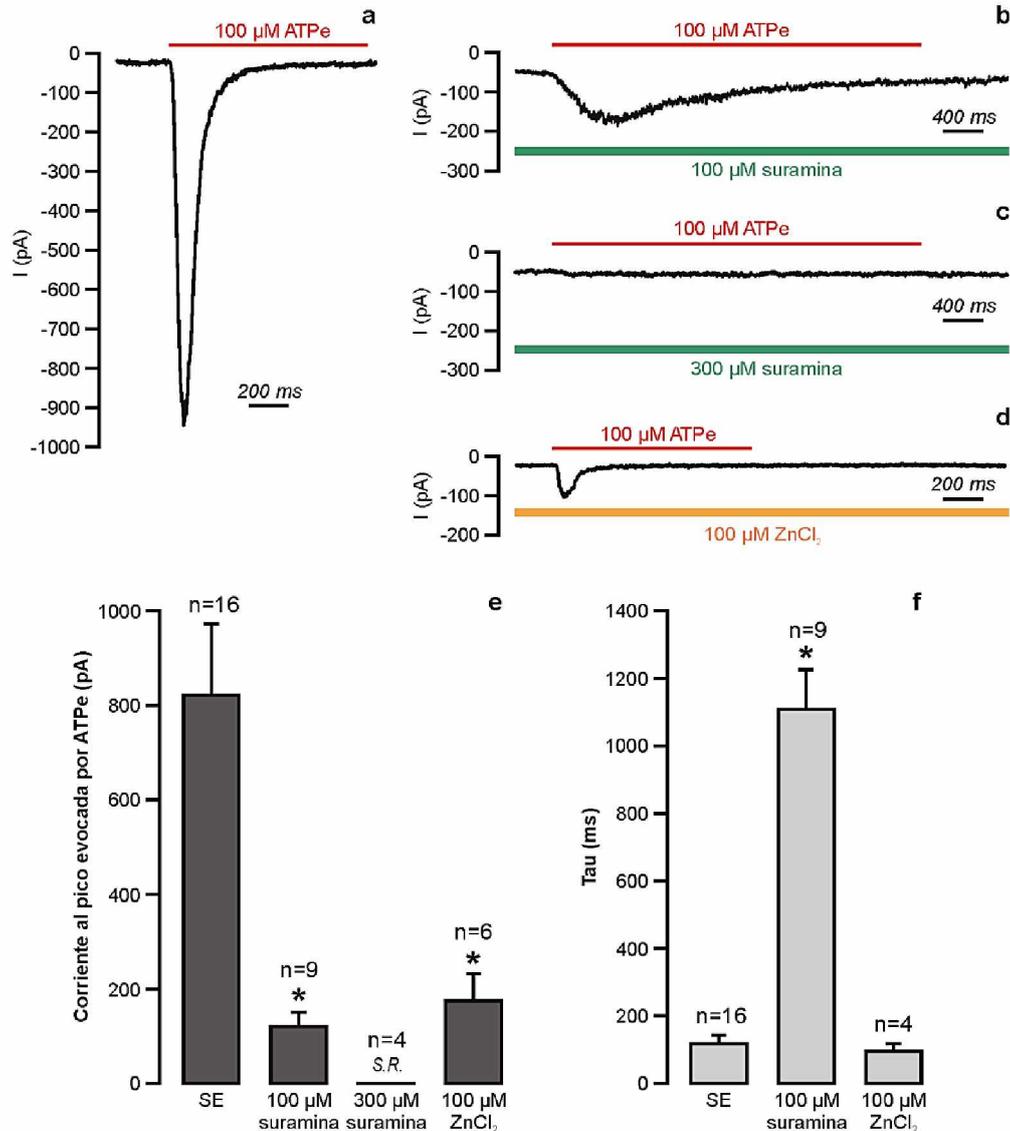


Figura 3.1.3. Corrientes macroscópicas evocadas por el agregado de 100 μM ATPe desde el lado extracelular, en configuración WC en células de músculo liso de la arteria umbilical humana (AUH). Registro típicos de corriente en **a**: solución extracelular control (SE), y con el agregado de **b**: 100 μM de suramina, **c**: 300 μM de suramina, **d**: 100 μM de ZnCl_2 . El potencial de registro se mantiene constante a -50 mV. **e**: valores medios de la corriente al pico evocadas en las condiciones indicadas en a (n=16), b (n=9), c (n=4) y d (n=6), junto con sus respectivos errores standard de la media (ESM). **f**: valores medios de la constante de tiempo de desensibilización (*Tau*) en las condiciones indicadas en a (n=16), b (n=9) y d (n=6), junto con sus respectivos ESM. El símbolo * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a la condición SE, por comparación múltiple (Análisis de varianza de una vía -ANOVA- y test de Holm-Sidak). S.R.: Sin respuesta

3.1.3. Participación de los iones sodio y calcio en la corriente evocada por ATP extracelular

Como parte de la caracterización de los receptores P2X presentes en las CML de AUH, investigamos la participación de los iones Na^+ y Ca^{2+} en la corriente activada por la aplicación de $100 \mu\text{M}$ ATPe.

Con este objetivo, planteamos dos protocolos distintos modificando la composición de la solución extracelular:

- Protocolo 1 - Condición 0Na^+ : sustitución completa de los iones Na^+ de la solución extracelular por N-metil-glucamina ($\text{SE } 0\text{Na}^+$)
- Protocolo 2 - Condición 0Ca^{2+} : solución extracelular normal (SE) sin agregado de iones Ca^{2+} ($\text{SE } 0\text{Ca}^{2+}$) adicionando EGTA en una concentración 1 mM , de manera de obtener una concentración final estimada de Ca^{2+} libre menor a $4 \cdot 10^{-9} \text{ M}$. Este valor fue calculado con el programa libre MaxChelator [98] para una concentración nominal de Ca^{2+} contaminante estimada en $10 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} .

En ambos protocolos se comienza trabajando en SE normal. Es en esta condición que se llega hasta la configuración WC y una vez alcanzada la misma, se reemplaza la SE por la solución correspondiente a cada protocolo, $\text{SE } 0\text{Na}^+$ o $\text{SE } 0\text{Ca}^{2+}$.

Se mantiene el preparado en la solución correspondiente por lo menos 3 minutos, de manera de garantizar que toda la solución SE inicial de la placa de Petri utilizada se sustituya por la nueva $\text{SE } 0\text{Na}^+$ o $\text{SE } 0\text{Ca}^{2+}$. Una vez pasado este tiempo, se cierra la vía de perfusión correspondiente a la $\text{SE } 0\text{Na}^+$ o la $\text{SE } 0\text{Ca}^{2+}$, y se abre inmediatamente la vía de perfusión que contiene SE

0Na⁺ con 100 μM ATP o SE 0Ca²⁺ con 100 μM ATP, según corresponda al protocolo iniciado. De esta forma, se evoca la corriente purinérgica por el agregado de ATPe en la condición iónica modificada, evaluando en cada caso si se verifican cambios en las características de la corriente.

Los resultados expuestos en la figura 3.1.4 muestran una reducción significativa de la corriente al pico evocada por ATPe tanto en condiciones de 0Ca²⁺ como de 0Na⁺, con respecto a la situación control en SE normal. Además la reducción generada por ausencia de Na⁺ es significativamente menor con respecto a la situación 0Ca²⁺.

En cuanto a la cinética de desensibilización, calculada a partir del valor de *Tau*, la misma no fue afectada significativamente por el reemplazo de ninguno de los dos iones evaluados.

En base a estos resultados observamos que la corriente evocada por ATPe, registrada a valores cercanos al potencial de membrana de reposo de este tipo celular, es una corriente despolarizante principalmente llevada por los iones Na⁺ y Ca²⁺, tal como se espera para un receptor catiónico no selectivo. La diferencia observada en la corriente evocada en las dos condiciones evaluadas denota una mayor relevancia del Na⁺ como ion responsable de la misma.

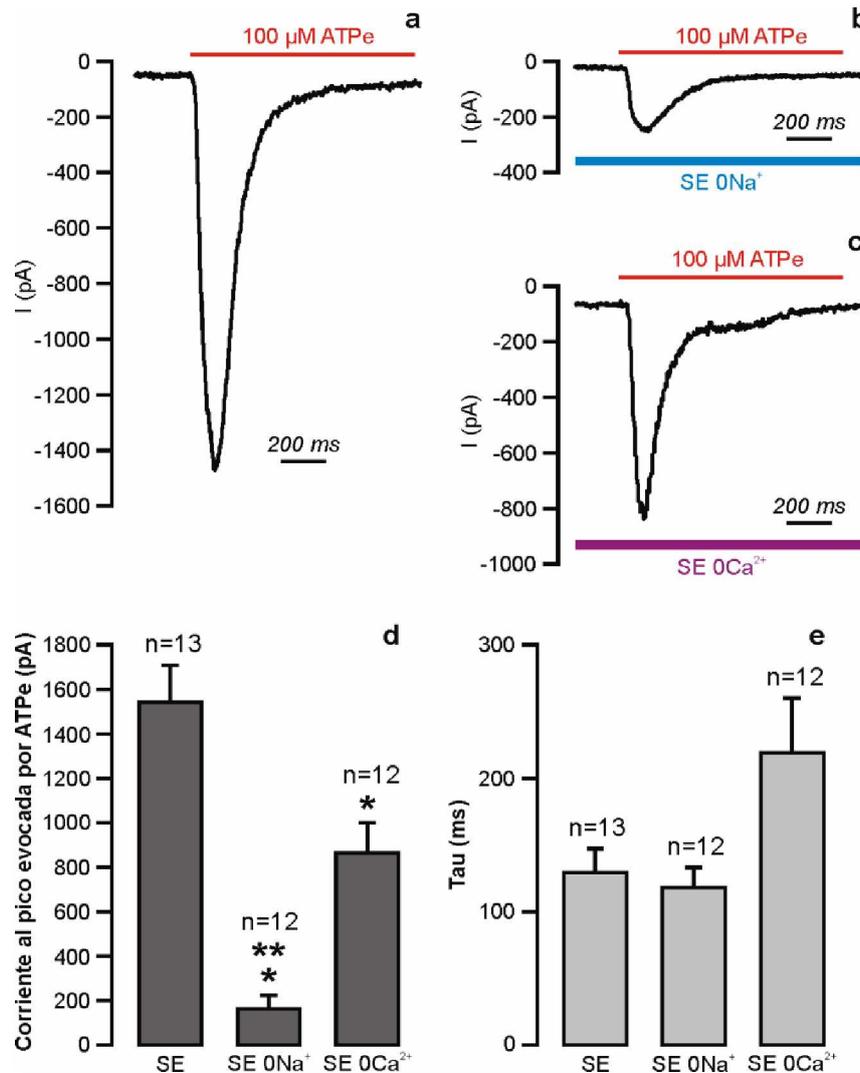


Figura 3.1.4. Corrientes macroscópicas evocadas por el agregado de 100 μM ATP desde el lado extracelular, en configuración WC en CML de la AUH. Registro típico de corriente en **a**: solución extracelular (SE), **b**: solución extracelular sin sodio (SE 0Na⁺), **c**: solución extracelular sin calcio con EGTA 1 mM (SE 0Ca²⁺). El potencial de registro se mantiene constante a -50 mV. **d**: valores medios de la corriente al pico evocadas en las condiciones indicadas en a (n=13), b (n=12) y c (n=12), junto con sus respectivos errores standard de la media (ESM). **e**: valores medios de la constante temporal de desensibilización (*Tau*) en las condiciones indicadas en a (n=13), b (n=12) y c (n=12), junto con sus respectivos ESM. El símbolo * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control en SE, por comparación múltiple (Análisis de varianza de una vía -ANOVA- y test de Holm-Sidak). El símbolo ** indica diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al valor de SE 0Ca²⁺ (Análisis de varianza de una vía -ANOVA- y test de Holm-Sidak).

3.2. Regulación del calcio intracelular a partir de la activación de receptores purinérgicos P2X de las células de músculo liso de la arteria umbilical humana

Tal como observamos mediante el estudio electrofisiológico descrito en la sección 3.1, en la corriente evocada por ATPe, el influjo de Ca^{2+} contribuye significativamente en la magnitud de dicha corriente. Teniendo en cuenta que los cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} participan en la regulación del estado contráctil de las CML, es fisiológicamente relevante estudiar si la entrada de Ca^{2+} inducida por la activación de los receptores purinérgicos P2X produce cambios en la concentración global citosólica de este tipo celular. Para estudiar este aspecto se utilizaron segmentos intactos de AUH. En esta preparación las CML se encuentran formando parte del tejido vascular, presentado la ventaja de estudiar este efecto en condiciones histológicas similares a las fisiológicas.

La técnica, los procedimientos experimentales y la composición iónica de las soluciones utilizadas se encuentran descritos en la *Sección 2 Materiales y Métodos*. A continuación se expone brevemente el procedimiento que se siguió en esta serie experimental:

- a. Se aisló un segmento de arteria umbilical, de aproximadamente 5 cm de largo, separándolo cuidadosamente de la gelatina de Wharton que rodea el tejido vascular. Se realizó luego un corte longitudinal de la arteria y se raspó la cara luminal, pasando suavemente el borde de una tijera, con el fin de eliminar el endotelio vascular. A continuación se cortó el tejido en segmentos más pequeños, de aproximadamente 5 mm de largo. Todas estas maniobras fueron realizadas en una cámara de Petri con solución SE.

- b. Los segmentos arteriales se incuban en oscuridad, por un tiempo total de 4 horas, en SE a la cual se le agregó el compuesto fluorimétrico Fura-2AM, en una concentración final de 16 μM . Previo al comienzo de los experimentos, se realiza el lavado de los segmentos arteriales con SE (sin Fura-2AM).
- c. Finalmente los segmentos son sujetados a una cámara de Petri que contiene un fondo plástico, utilizando para ello agujas finas modificadas en el laboratorio.

La muestra se colocó en un microscopio de fluorescencia directo y fue excitada en forma alternada, cada 2 segundos, con luz de longitud de onda de 340 nm y 380 nm. Esto permite aprovechar una singularidad fluorescente del Fura-2, ya que la longitud de onda de máxima excitación depende de su estado de unión al Ca^{2+} (380 nm para la forma libre de Ca^{2+} y 340 nm para la forma unida al Ca^{2+}). La luz emitida, proveniente de las dos formas, se cuantifica a 510 nm. Utilizando un software adecuado, seleccionamos las áreas de interés (ROIs, del inglés *Regions of Interest*) que contienen como mínimo una CML. El mismo software permite el seguimiento del experimento en directo mostrando en pantalla la relación de fluorescencia F340/F380, la cual consiste en la fluorescencia emitida a 510 nm proveniente de excitación a 340 nm y a 380 nm, registrada alternativamente. Esta relación F340/F380 es registrada como medida del cambio de la concentración de Ca^{2+} intracelular.

3.2.1. Cambios de concentración de Ca^{2+} intracelular inducidos por el agregado de ATP extracelular y su dependencia con la concentración de Ca^{2+} extracelular. Rol del retículo sarcoplásmico.

Una vez estabilizadas las condiciones experimentales, en las cuales la señal que mide el Ca^{2+} intracelular (F_{340}/F_{380}) presenta un valor estable en la solución control SE, se cambia rápidamente la SE por una SE con $100 \mu\text{M}$ de ATP. Inmediatamente se observa un cambio brusco en la señal como se ilustra en la figura 3.2.2.a, donde se puede notar que el agregado de ATP genera un aumento transitorio de Ca^{2+} intracelular, retornando a los niveles iniciales en un tiempo aproximado de 2 minutos.

El mismo protocolo experimental se repitió utilizando $\alpha\beta$ -metil-ATP ($\alpha\beta\text{meATP}$), un análogo del ATP que activa selectivamente receptores purinérgicos de tipo P2X. En la figura 3.2.1 se presenta un registro representativo de estos experimentos que indican la presencia de receptores de tipo P2X en las CML de la AUH en concordancia con los resultados electrofisiológicos descritos en la sección anterior.

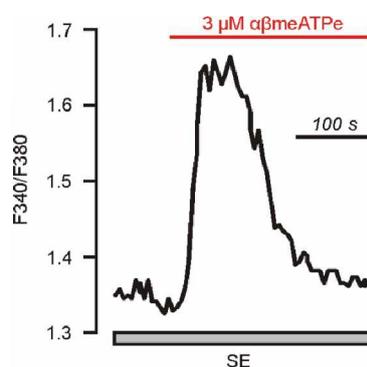


Figura 3.2.1. Registro típico del cambio en la concentración de calcio intracelular al aplicar $3 \mu\text{M}$ de $\alpha\beta\text{meATP}$ sobre células de músculo liso de la arteria umbilical humana. Cuantificación de los cambios de calcio intracelular partir de la relación de fluorescencia de Fura-2AM a 340 nm y 380 nm. Observado en 41 ROIs.

Estos ensayos muestran que la activación del canal que habíamos observado mediante la medición de la corriente iónica en las CML aisladas de la AUH, produce un aumento significativo de la concentración de Ca^{2+} libre a nivel intracelular,

Para ahondar en los mecanismos involucrados en este fenómeno, se repitió el ensayo estimulando el preparado con 100 μM de ATPe en condiciones de ausencia completa del Ca^{2+} extracelular (SE 0Ca^{2+}). Una vez estabilizada la señal de Ca^{2+} intracelular en las condiciones SE 0Ca^{2+} , se cambia la solución externa por una SE 0Ca^{2+} con 100 μM de ATP. El agregado de ATPe no provocó un cambio en la concentración de Ca^{2+} intracelular (figura 3.2.2.b), evidenciando que el influjo de Ca^{2+} extracelular es necesario para inducir el aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular observado en la serie experimental anteriormente descrita.

Otro punto fundamental en la regulación del Ca^{2+} intracelular es determinar si el influjo de Ca^{2+} , que produce la unión del ATPe a los receptores P2X, tiene la capacidad de inducir la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. Este mecanismo, que se denomina liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} , en general potencia el efecto del influjo de Ca^{2+} como parte de la cascada de señalización intracelular de numerosos ligandos extracelulares. Con este fin, el ensayo se repitió idéntico a la situación inicial (SE con 100 μM de ATP) pero, en este caso, los segmentos arteriales fueron previamente expuestos a 10 μM de ácido ciclopiazónico (CPA), por un período de 12 minutos. Esta sustancia es un inhibidor específico de la bomba $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$ del retículo sarcoplásmico (SERCA, del inglés *sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*) la cual genera la depleción del Ca^{2+} almacenado en el retículo sarcoplásmico. El consecuente aumento transitorio del Ca^{2+} intracelular que produce esta sustancia se puede observar en la parte inicial del registro de la señal de Ca^{2+} que se presenta en la figura 3.2.1.c. Seguidamente se agregó 100

μM de ATP (SE con $10 \mu\text{M}$ de CPA y $100 \mu\text{M}$ de ATP) observando que el ATPe en estas condiciones genera un aumento del Ca^{2+} intracelular de una magnitud significativamente inferior al aumento observado en las CML sin tratamiento previo con CPA (figura 3.2.1.d).

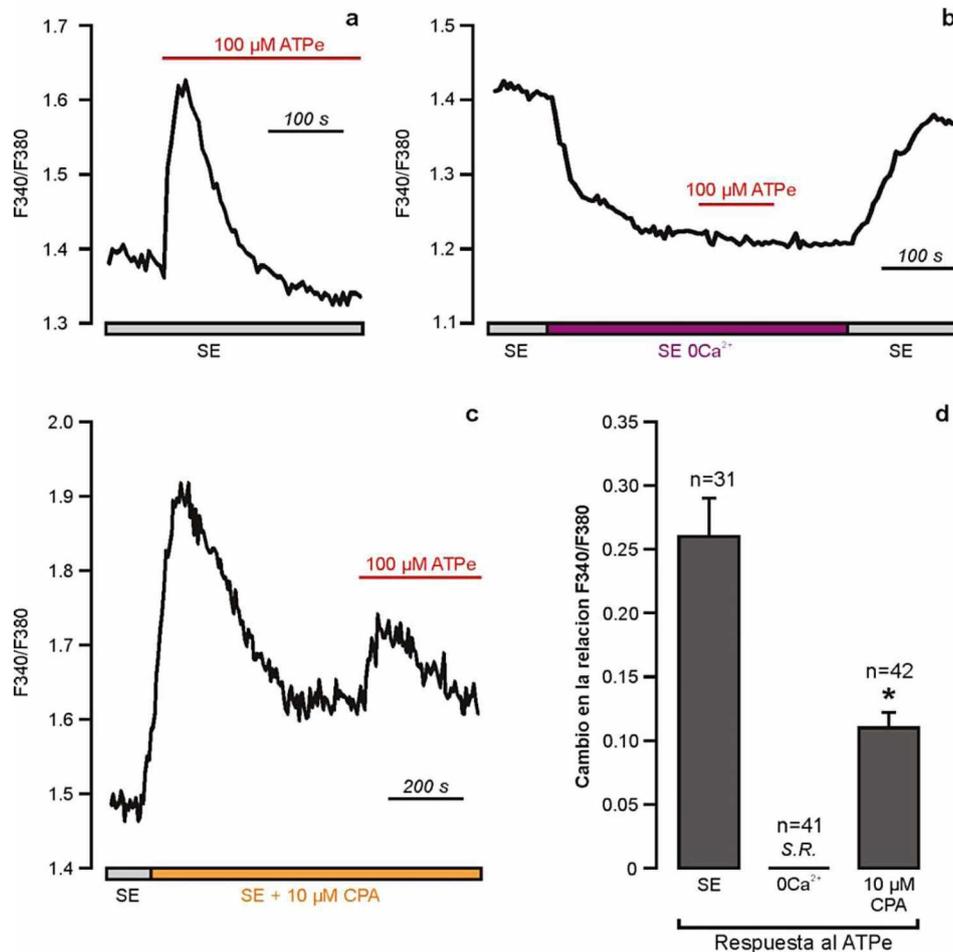


Figura 3.2.2. Medidas de la concentración de calcio intracelular en CML de la AUH, a partir de la relación de fluorescencia de Fura-2AM a 340 nm y 380 nm. Cambios inducidos por $100 \mu\text{M}$ de ATPe en **a**: solución extracelular (SE). **b**: solución extracelular sin calcio ($\text{SE } 0\text{Ca}^{2+}$). **c**: SE con $10 \mu\text{M}$ de CPA. **d**: valores medios de los cambios en la relación F340/F380 en las condiciones indicadas en a ($n=31$), b ($n=41$) y c ($n=42$), junto con sus respectivos errores standard de la media (ESM). El símbolo * indica diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las medidas con respecto al control en SE, por comparación múltiple (Análisis de varianza de una vía -ANOVA- junto a test de Holm-Sidak). S.R.: Sin Respuesta.

Estos resultados ofrecen evidencia que, tanto el Ca^{2+} extracelular como el Ca^{2+} almacenado en el retículo sarcoplásmico, contribuyen al aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular inducido por la aplicación de ATPe. Es importante notar que la unión del ATPe a su receptor, induce liberación de Ca^{2+} del retículo en forma indirecta, a través del mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} , como fue demostrado en la serie experimental donde al eliminar completamente el Ca^{2+} extracelular, el ATPe no generó cambios en los niveles de calcio intracelular.

Por lo tanto podemos concluir que el aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, generado por la aplicación de ATPe, es un fenómeno que depende del Ca^{2+} extracelular, y que el influjo de este ion produce la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico, aumentando aún más la concentración de Ca^{2+} intracelular.

3.2.2. Valoración del rol de los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje secundario a la activación de receptores P2X

En los experimentos de *patch-clamp* vimos que en la respuesta al ATPe, se produce un influjo de Na^+ y Ca^{2+} a las CML. De esta corriente, el influjo de Ca^{2+} es determinante para iniciar la señalización intracelular y el aumento de Ca^{2+} intracelular. Sin embargo, a partir de la caracterización de las distintas estructuras que participan en la regulación del Ca^{2+} intracelular que nuestro grupo ha realizado en estudios precedentes [105], sabemos que en las CML de la AUH, los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje son estructuras que pueden mediar un influjo de Ca^{2+} . La actividad de los mismos puede modificarse por la despolarización celular. Por lo tanto, se evaluó la posibilidad de que la activación de la corriente purinérgica modifique la actividad de estas

estructuras contribuyendo al aumento de Ca^{2+} observado. El siguiente ensayo tuvo como objetivo indagar esta posibilidad:

Una vez estabilizada la señal que mide la concentración de Ca^{2+} intracelular en las condiciones de SE control, se agregó 10 μM verapamilo (SE con 10 μM verapamilo), 5 minutos antes de la estimulación con ATPe. El verapamilo es un inhibidor de los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje. Como se puede observar en la figura 3.2.3, el verapamilo induce una disminución de la señal de Ca^{2+} intracelular, sugiriendo una inhibición de un influjo basal de Ca^{2+} . Cuando la señal se estabilizó en esta nueva condición, se cambia rápidamente la SE con 10 μM verapamilo por una SE con 100 μM de ATP y 10 μM verapamilo. Inmediatamente se observa un cambio brusco en la señal de Ca^{2+} intracelular, similar a los que se muestran en la figura 3.2.1, indicando que el agregado de 100 μM de ATPe, en presencia del inhibidor de los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje, genera un aumento transitorio de Ca^{2+} intracelular, retornando el mismo a los niveles iniciales en un tiempo de aproximadamente 2 minutos. Se observó que el aumento de Ca^{2+} intracelular al pico de la señal F340/F380 es significativamente menor que el obtenido para la situación control en SE (figura 3.2.3.c). Este ensayo permitió poner en evidencia que los canales de calcio Ca^{2+} sensibles al voltaje contribuyen a la respuesta que el ATPe produce en las CML de la AUH. La activación de estos canales podría deberse a la despolarización producida por la corriente catiónica purinérgica como se discutirá posteriormente en la Sección 4.

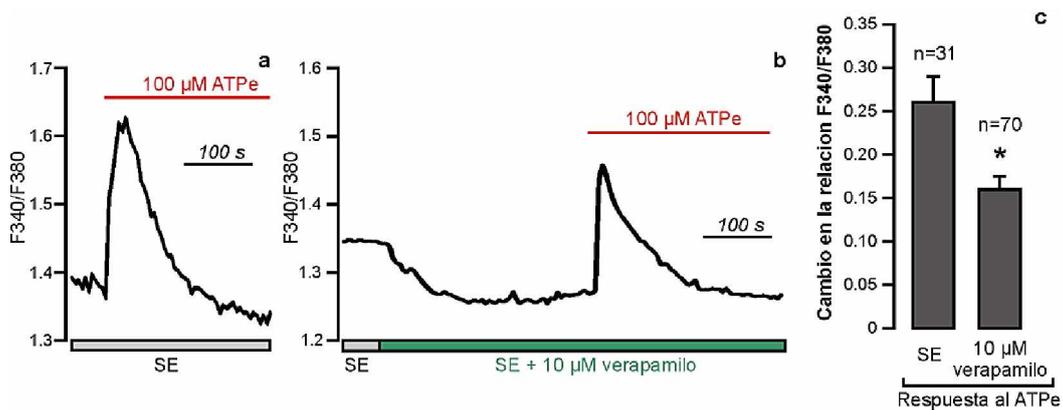


Figura 3.2.3. Medida de la concentración de calcio intracelular en CML de la AUH a partir de la relación de fluorescencia de Fura-2AM a 340 nm y 380 nm. Cambio inducido por 100 μM de ATPe en **a:** solución extracelular (SE). **b:** en solución extracelular SE con 10 μM de verapamilo, **c:** valores medios de los cambios en la relación F340/F380 evaluados en el pico de la señal, en las condiciones indicadas en a (n=31) y b (n=70) junto con sus respectivos errores standard de la media (ESM). El símbolo * indica diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las medidas con respecto al control en SE normal, por comparación múltiple (Análisis de varianza de una vía -ANOVA- junto a test de Holm-Sidak).

3.3. Interacción funcional entre canales P2X y canal BKCa

Para evocar la corriente de K^+ , se aplicó una rampa de voltaje que permite realizar un cambio continuo del voltaje de la membrana celular. Como se detalló en la *Sección 2 - Materiales y métodos*, la rampa parte desde un potencial de mantenimiento de -50 mV, por un período de 50 ms. Luego se despolariza la célula en forma instantánea hasta un valor de +80 mV, el cual se mantiene durante 500 milisegundos (ms) y desde allí se comienza a disminuir el voltaje hasta llegar a un valor de -80 mV, en un período de 2 segundos. Finalmente, se vuelve en forma instantánea al valor de potencial de mantenimiento y se mantiene durante 500 ms. Este protocolo de voltaje nos permitió observar la corriente de K^+ antes, durante y después del agregado de ATPe. La rampa tiene una duración suficiente para poder estimular con ATPe mientras se está evocando la corriente de K^+ y así poder registrar las dos corrientes simultáneamente (figura 3.3.1). En este protocolo es muy importante tener en cuenta que la fuerza impulsora para la corriente evocada por ATPe no va a ser constante durante la rampa y por lo tanto la magnitud y dirección de la corriente dependerá del momento en que se aplique el ATPe. En la figura 3.3.1 se muestra un registro típico de corriente donde el ATPe se aplica cuando la rampa está fijando el potencial de la membrana en valores menores que 0 mV favorables para la entrada de cationes (en este caso Na^+ y Ca^{2+}).

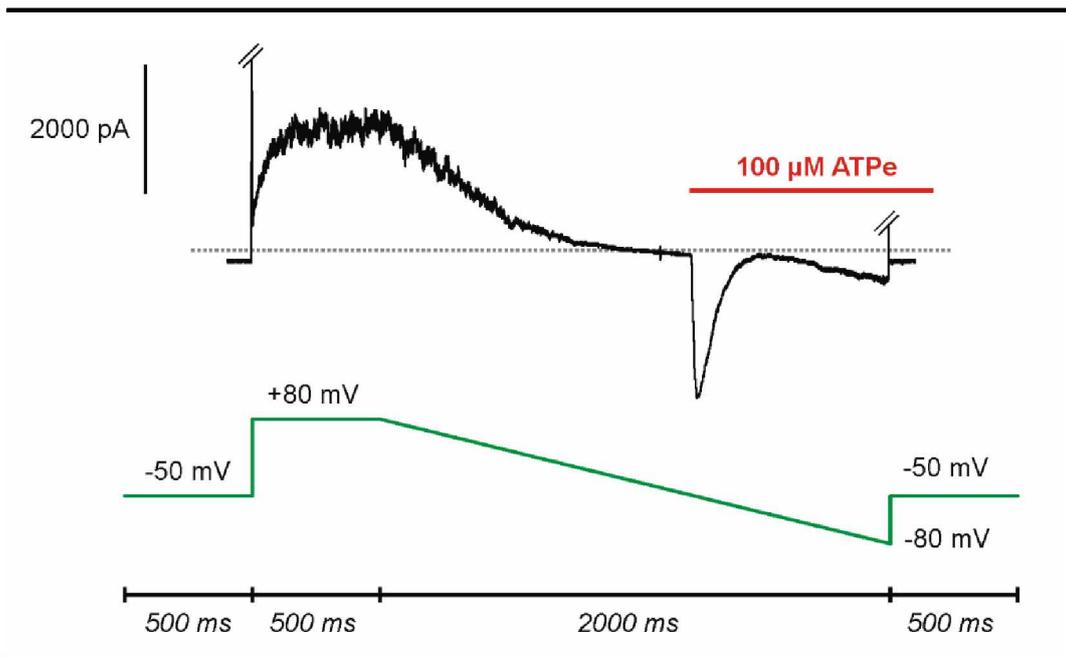


Figura 3.3.1. Registro típico de corriente de K^+ en WC (panel superior en color negro), obtenido a través de un protocolo de rampa de voltaje (panel inferior en color verde). En el registro se muestra el momento exacto donde se aplica el ATPe, y se observa que en esas condiciones se puede identificar la corriente purinérgica a través de los receptores P2X.

En la figura 3.3.2 se puede observar la curva típica corriente vs voltaje (I-V) obtenida de un registro de rampa (figura 3.3.2.a) y la curva I-V media construida a partir de todas las células ensayadas, en condiciones control y luego del agregado de $100 \mu\text{M}$ de ATPe (figura 3.3.2.b), post-activación de la corriente catiónica purinérgica.

En el gráfico de barras de la figura 3.3.2 se representan los valores medios del potencial de reversión (E_{rev}) obtenido para cada caso. El análisis de la curva I-V muestra una corriente principalmente saliente con rectificación a los potenciales despolarizados típica de canales de K^+ sensibles al voltaje. Como se puede observar el ATPe aumenta significativamente la corriente saliente, mientras que el E_{rev} se hace más negativo. Podemos inferir entonces

que el influjo de calcio debido a la activación de los receptores purinérgicos produce la activación de los canales BKCa e hiperpolariza la CML.

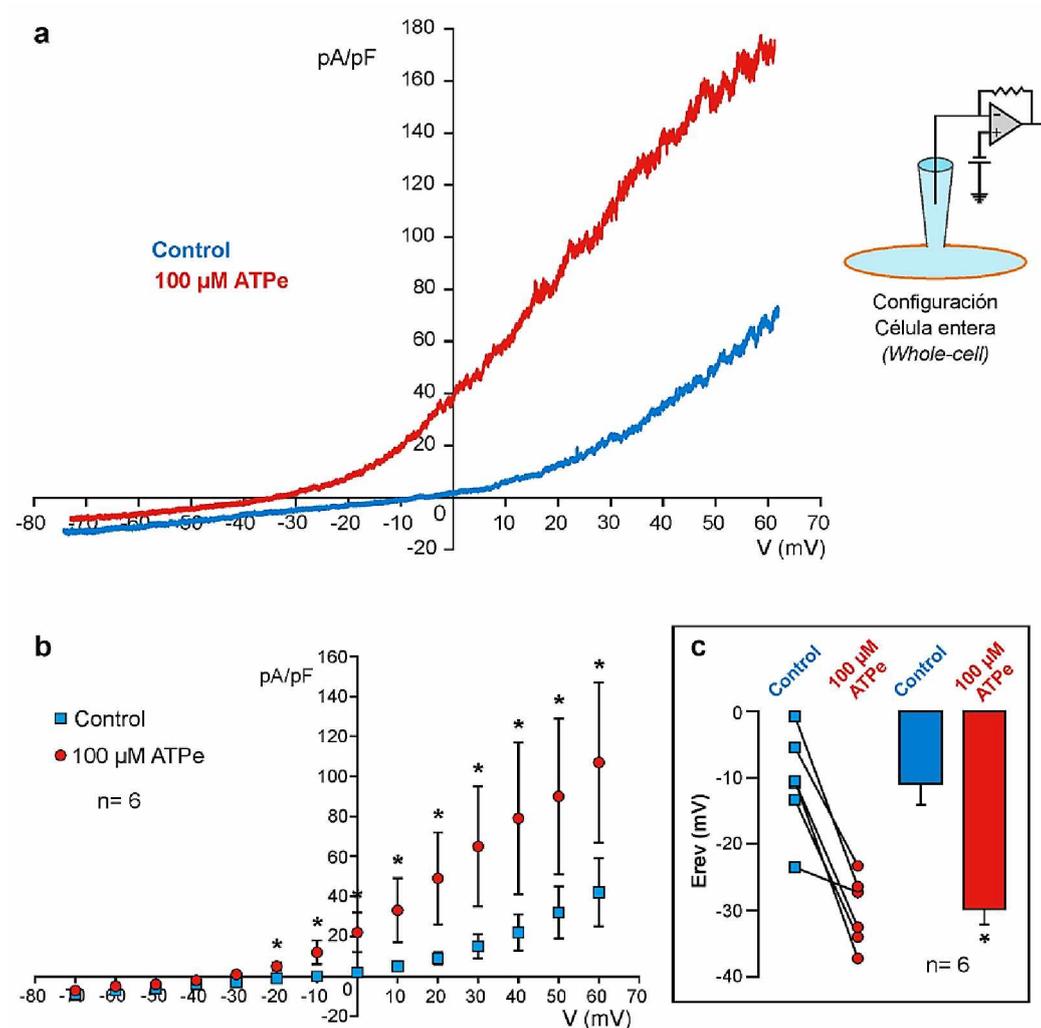


Figura 3.3.2. (a) Curva típica corriente vs voltaje (I-V) obtenidas de un registro de rampa. (b) Curvas corriente media vs voltaje (I-V media), construidas a partir de los valores de corriente a valores de voltaje seleccionados (-70 a +70 mV, con saltos de 10 mV), y sus respectivos errores standard de la media (ESM) (c) Valores de potencial de reversión (Erev) en situación control SE y posterior a la aplicación de 100 μ M de ATPe. Se muestran los valores individuales para cada una de las células estudiadas y los valores medios con sus respectivos ESM. El símbolo * indica diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las medidas con respecto al control en SE, por test de Student de valores apareados.

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo por el cual la corriente purinérgica activa el canal BKCa, realizamos los siguientes experimentos en configuración *cell attached* (CA), donde podemos observar las propiedades del canal BKCa a nivel de canal único en condiciones donde se conserva la integridad celular. Además en esta configuración el ATPe no entra en contacto directo con el canal BKCa, ya que el ATP se agrega en la solución que perfunde a la célula mientras que el canal estudiado queda en el área de membrana bajo la pipeta de *patch*. De esta manera su región extracelular está en contacto con la solución de la pipeta (libre de ATP), mientras que su región intracelular se contacta con el medio citosólico.

La figura 3.3.3.a muestra un registro típico de la corriente del canal BKCa. En las condiciones control, en SE, presenta un valor de NPo, que aumenta significativamente ante el agregado de 100 μM de ATPe (figura 3.3.3a,b,c). Como se puede notar claramente, el aumento de Po es transitorio, y un segundo estímulo con ATPe, luego de un lavado con SE durante 10 minutos, no genera cambio en la NPo del canal (figura 3.3.3.a panel izquierdo). Se puede inferir que la ausencia del efecto sobre la NPo, en este segundo estímulo con ATPe, es debido a que el receptor purinérgico se ha desensibilizado.

A fin de valorar el rol del Ca^{2+} extracelular en la respuesta descrita anteriormente, el estímulo con ATPe se realiza en condiciones de ausencia de Ca^{2+} extracelular (SE 0Ca^{2+}). En la figura 3.3.3.d se muestra un registro típico de este experimento, donde se puede observar que la NPo baja a un valor de 0 en condiciones SE 0Ca^{2+} y no sufre ninguna modificación al agregar ATPe.

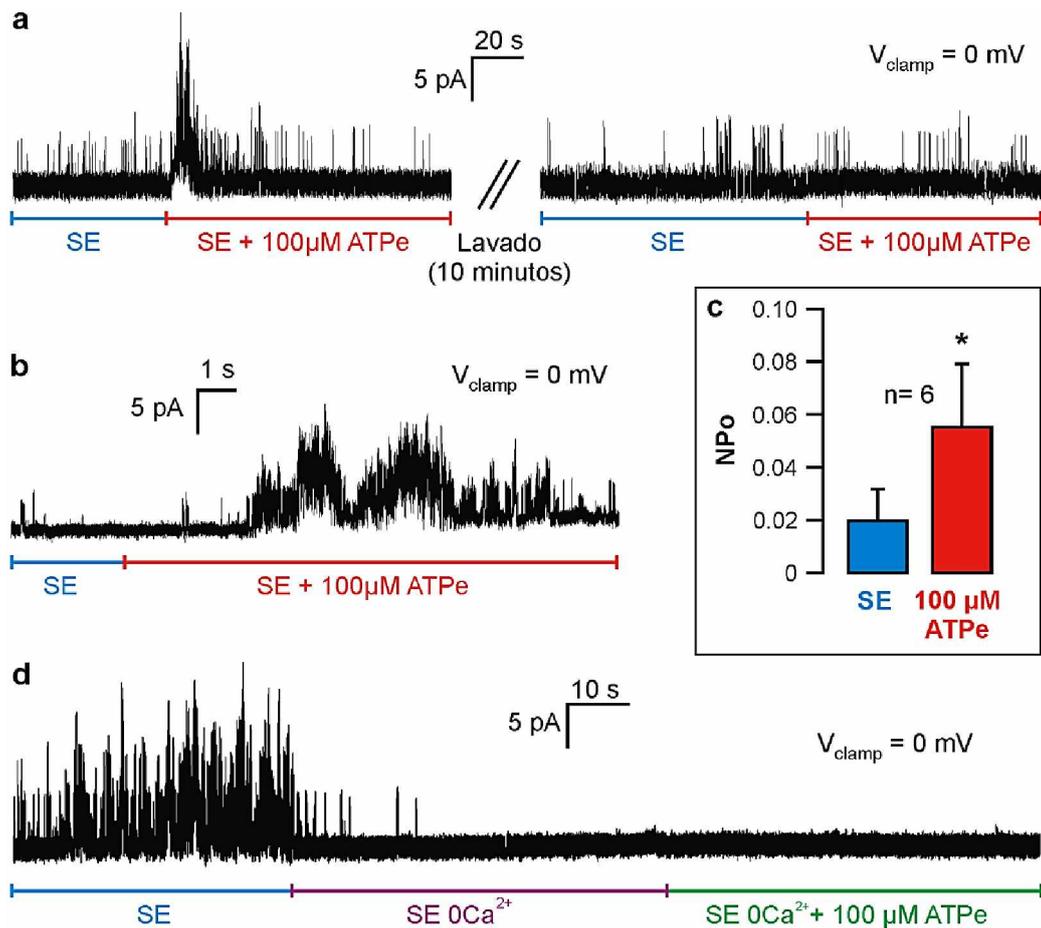


Figura 3.3.3. Registros típicos de corriente de BKCa, en (a) solución extracelular SE y luego del agregado de 100 μM de ATPe; y segundo estímulo con 100 μM de ATPe luego de un período de lavado de 10 minutos con SE. (b) registro con escala temporal aumentada, que permite observar en detalle el aumento de actividad de BKCa observado en (a). (c) Valores medios de NPo en condición SE y luego del primer estímulo con 100 μM de ATPe, y sus respectivos errores standard de la media (ESM), calculados en $n=6$ células. (d) Actividad del canal BKCa, donde se observa un descenso de la NPo a 0 al retirar el Ca^{2+} de la solución extracelular, y posterior estímulo con 100 μM ATPe en las condiciones SE 0Ca²⁺. El símbolo * indica diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las medidas con respecto al control en SE, por test de Student de valores apareados.

Sección 4

Discusión y Conclusiones finales

En los vasos sanguíneos, el receptor purinérgico de tipo P2X₁ se encuentra expresado preferentemente en las células de musculo liso que forman la túnica media de los mismos. Estas células, en función de su grado de contracción determinan el diámetro del vaso sanguíneo, factor fundamental en la regulación de la presión arterial.

En el año 1998, el grupo liderado por el Dr. G. Burnstock, referente internacional en el campo de estudio de los receptores purinérgicos, demostró que el receptor purinérgico de tipo P2X₁ es el que se encuentra mayoritariamente expresado en las células de musculo liso (CML) de la arteria umbilical humana (AUH), y que el ATP extracelular (ATPe) genera, en el segmento arterial, una contracción transitoria dependiente de la concentración [90]. Sin embargo la evolución en este tema fue muy escasa. En el año 2003, Valdecantos y colaboradores confirman el resultado precedente, en el marco de un trabajo más extenso que analiza también vasos placentarios y reportan la presencia del ARNm de otros subtipos de receptores P2X (P2X₄, P2X₅, P2X₆ y P2X₇), pero no profundizan sobre el rol funcional de estos receptores [91].

En este trabajo registramos por primera vez las corrientes iónicas inducidas por ATPe en las CML aisladas de la AUH, analizamos la identidad de los iones que median dicha corriente, sus propiedades cinéticas, su perfil farmacológico y su rol en la regulación del Ca²⁺ intracelular manteniendo el tejido muscular intacto. Además, iniciamos el estudio de identificación de posibles acoplamientos funcionales del receptor purinérgico con otras estructuras de membrana. En particular nos focalizamos en el impacto que la corriente evocada por el ATPe puede tener sobre la actividad de un canal iónico sensible al Ca²⁺ intracelular de gran importancia en el musculo liso: el canal de K⁺ de alta conductancia de tipo BKCa.

Nuestros datos muestran que el ATPe induce una corriente catiónica no selectiva, transportada por Na^+ y Ca^{2+} , que se activa inmediatamente luego del agregado de ATPe y decae rápidamente, aún en presencia del agonista, mostrando un rápido proceso de desensibilización del receptor. En cuanto al perfil farmacológico de esta corriente, hemos observado que suramina produce una inhibición completa de la corriente mientras que el ion divalente Zn^{2+} la inhibe parcialmente. Estos datos están en concordancia con la sensibilidad de la corriente evocada por receptores purinérgicos de tipo P2X_1 [104].

Se ha reportado que las corrientes iónicas mediadas por receptores P2X_1 expresados en sistema heterólogo, presentan una cinética de activación y desensibilización muy rápida, comparada con el resto de los receptores P2X , y que su recuperación del estado desensibilizado es lento, mayor a 5 minutos [106]. La cinética del proceso de desensibilización, refleja la velocidad con la que el receptor ionotrópico transita del estado activado al estado desensibilizado. Los estudios dirigidos a comprender los mecanismos moleculares que controlan el proceso de desensibilización de este tipo de receptor purinérgico no han sido aún completamente dilucidados. Actualmente se sabe que participa en este mecanismo el dominio intracelular del segmento TM1 del receptor y que podrían estar involucradas interacciones con otras proteínas o mensajeros intracelulares [107].

En nuestros experimentos observamos que las corrientes, en forma homogénea, presentan una rápida cinética de activación y desensibilización, y un lento proceso (mayor a 10 minutos) de recuperación parcial del estado desensibilizado. Si bien este tiempo se encuentra en el rango del tiempo de recuperación reportado en la literatura, no podemos descartar que las condiciones experimentales de registro en *whole cell*, interfieran en este proceso, por ejemplo por la pérdida de factores intracelulares.

El curso temporal de la respuesta al ATPe, es fundamental en el proceso de señalización del receptor ya que determina el tiempo que dura el efecto despolarizante de la corriente catiónica y el influjo de calcio. Además, en estos receptores, el proceso de recuperación del estado desensibilizado, al ser relativamente lento, otorga la posibilidad a la célula, de generar una respuesta transitoria aun enfrentando una concentración sostenida de ATP. Esta característica se observó claramente en los experimentos de *cell attached* (ver más abajo).

Comparando las características temporales de la corriente inducida por ATPe que hemos medido en las CML de la AUH, con aquellas reportadas en la literatura para los distintos tipos de receptores P2X, podemos sugerir que el receptor ionotrópico purinérgico que media la corriente en este tipo celular es el subtipo P2X₁. En la introducción de esta Tesis se presentan las propiedades cinéticas de cada uno de los siete subtipos de esta familia, y como se puede observar en nuestros registros, la cinética de activación y desensibilización de la corriente es reproducible en las células ensayadas y muy similar a la registrada en un sistema de expresión heterólogo para receptores homotriméricos de tipo P2X₁. Esto indicaría la presencia de una población mayoritaria de receptores P2X₁ homotriméricos en este tipo celular [58]. Sin embargo algunos trabajos discuten un interesante punto funcional que surge de analizar las propiedades de las corrientes iónicas evocadas por distintas composiciones de heterotrimeros de receptores P2X. Y sugieren que hay algunas subunidades que pueden integrar la estructura del receptor, pero que no le confieren propiedades cinéticas ni farmacológicas particulares a las corrientes mediadas por el receptor, considerándose subunidades silentes en este sentido, pero tal vez otorgándole otras características aún no analizadas [108][109]. Teniendo en cuenta estos datos bibliográficos y sabiendo que, tal como describimos más arriba, en las CML de la AUH además del receptor de tipo P2X₁, se ha detectado el ARNm de otros subtipos de receptores P2X [91],

no podemos excluir que el ATPe pueda activar heterotrímeros formados por combinaciones de subunidades P2X₁ con otras subunidades de otros subtipos de receptores P2X.

Este trabajo explora un importante aspecto funcional de la activación de este receptor purinérgico: su rol en la modulación del Ca²⁺ intracelular. Demostramos que el ATPe produce un aumento significativo en la concentración intracelular de Ca²⁺ en las CML de la AUH, estudiadas en condiciones donde el tejido mantiene la integridad de la túnica media vascular. Demostramos además que este incremento involucra un influjo de Ca²⁺ mediado directamente por los receptores ionotrópicos, sumado a la liberación de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico. Este resultado se reproduce cuando el tejido se estimula extracelularmente con α,β -metil-ATP, un análogo del ATP que activa selectivamente a los receptores P2X, demostrando que la activación de los mismos está involucrada en el aumento de Ca²⁺ intracelular evocado por el ATPe.

Observamos que la entrada de Ca²⁺ desde el espacio extracelular es un paso necesario para producir el aumento de Ca²⁺ intracelular y que la liberación de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico, probablemente por un mecanismo de liberación de Ca²⁺ inducido por Ca²⁺, contribuye a dicho aumento. De hecho, cuando el estímulo con ATPe se induce en células donde previamente se ha deplecionado de Ca²⁺ el retículo sarcoplásmico, la respuesta disminuye significativamente. Esto además aporta evidencia sobre el tipo de receptores purinérgicos involucrados en la respuesta al ATPe, descartando la posibilidad que la misma sea mediada por receptores de tipo P2Y. Las respuestas a la activación de estos receptores metabotrópicos no dependen del Ca²⁺ extracelular.

Por otro lado, es de esperar que la corriente de Na^+ y Ca^{2+} evocada por ATPe, genere una despolarización transitoria de la membrana celular, activando canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje (canales Ca_v) presentes en esta arteria [105], sumando una entrada de Ca^{2+} a la misma. Los experimentos realizados en presencia de verapamilo, un inhibidor de los canales Ca_v , muestran que en estas condiciones el ATPe aumenta el Ca^{2+} intracelular, pero en menor magnitud que en las condiciones control, indicando la presencia de una entrada de Ca^{2+} adicional mediada por los canales Ca_v sensibles a la despolarización.

Estos resultados en su conjunto muestran que el influjo de Ca^{2+} mediado por receptores purinérgicos P2X_1 es suficiente para producir un aumento de Ca^{2+} intracelular. Y que este incremento se potencia por la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico y por la activación de canales Ca_v .

Hemos indagado también si el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, inducido por el ATPe, es capaz de producir un efecto hiperpolarizante que pueda generar relajación del vaso sanguíneo, en oposición a la contracción producida por el aumento de Ca^{2+} . Se ha demostrado en otros vasos sanguíneos, que la activación de receptores de membrana que generan aumentos locales o globales de Ca^{2+} intracelular, activan al canal de K^+ de tipo BKCa [110]. En presencia de aumentos globales del Ca^{2+} intracelular, esta activación disminuiría el grado de contracción generada por un estímulo netamente contráctil, mientras que en los aumentos locales del Ca^{2+} se cree que el mismo sólo logra activar al canal BKCa, con poco efecto sobre el aparato contráctil, dando lugar a la hiperpolarización de la membrana celular, y vasorelajación.

De esta manera, la contracción transitoria que el ATPe induce en la AUH, la cual es independiente del endotelio vascular [90], podría ser el resultado de un balance entre dos fenómenos, uno contráctil y otro relajante, operando en simultáneo o separados temporalmente. Es importante señalar que en todos los casos reportados, la contracción que induce el ATPe es transitoria, atribuyendo la fase de relajación a la desensibilización del receptor. Sin embargo otros procesos celulares, como el que hemos reportado en esta Tesis, podrían contribuir a esta respuesta.

Los experimentos electrofisiológicos que realizamos para explorar este tema mostraron que el canal BKCa se activa cuando se estimula la célula con ATPe. Los experimentos de *patch clamp* en configuración *whole cell*, muestran que la corriente macroscópica mediada por el canal BKCa aumenta inmediatamente después de evocada la corriente catiónica inducida por ATPe y que, consecuentemente con la activación del canal de K⁺, la célula se hiperpolariza. En base al conocimiento del funcionamiento de este canal en las CML vascular, esta activación puede ser interpretada como resultado del aumento de Ca²⁺ en zonas cercanas al sensor de Ca²⁺ del canal BKCa (extremo C terminal intracelular) debido al ingreso de Ca²⁺ extracelular (por el receptor purinérgico y/o por los canales Cav) más la liberación de Ca²⁺ por el retículo sarcoplásmico. Como el canal BKCa es sensible al Ca²⁺ y al voltaje, la despolarización transitoria que induce la corriente catiónica purinérgica también puede contribuir a la activación del canal. Un efecto directo del ATPe sobre el canal BKCa no puede excluirse en estas condiciones experimentales.

Los experimentos de *patch clamp* de canal único, en configuración de *cell attached*, nos permitieron profundizar el mecanismo por el cual la corriente purinérgica activa al canal BKCa, en condiciones donde se conserva la integridad celular manteniendo el contenido citosólico intacto y además nos permite descartar un efecto directo del ATPe sobre el canal BKCa, ya que en

esta configuración esta sustancia no está en contacto con la cara extracelular del canal bajo la pipeta de *patch*, sino solo con el resto de la membrana celular.

Estos resultados nos permitieron poner en evidencia que el aumento en la actividad del canal BKCa es posterior al agregado de ATPe y reproduce el curso temporal de la corriente purinérgica y del aumento de Ca^{2+} . Al estimular la célula con ATPe se observa un inmediato aumento de la probabilidad de apertura del canal, luego decae y no se vuelve a observar ante el agregado de un segundo estímulo con ATPe, coherente con el hecho de que el receptor purinérgico se encuentra desensibilizado.

Si el ATPe se agrega en ausencia de Ca^{2+} extracelular, el canal BKCa no se activa, demostrando que es determinante el ingreso de Ca^{2+} para iniciar o generar el aumento de Ca^{2+} intracelular necesario para la activación del canal BKCa. Este resultado también pone en evidencia que, la corriente entrante purinérgica mediada solo por el Na^+ , en ausencia de Ca^{2+} extracelular, no modifica directamente la actividad del canal BKCa. Sin embargo en condiciones fisiológicas, y como mencionamos anteriormente, no podemos descartar que la actividad del canal BKCa sea potenciada por la despolarización que ocurre a partir de la activación de los receptores P2X, ya que el canal BKCa es también modulado por voltaje.

En base a estos resultados es posible especular acerca del posible rol fisiológico que podría tener este acoplamiento funcional de receptores P2X y el canal BKCa en las CML vascular *in vivo*. El ATP liberado en forma autocrina o paracrina, o co-liberado localmente por las terminales autónomas (en los vasos sanguíneos que son inervados), podría generar un efecto hiperpolarizante transitorio ejerciendo una influencia inhibitoria sobre otras vías de señalización vasoconstrictoras, y por lo tanto producir en el vaso sanguíneo un estado de

menor excitabilidad que contribuya al control de la regulación de su diámetro y finalmente de la presión arterial.

Finalmente, y a modo de resumen, se describen en el siguiente esquema los hallazgos de esta Tesis que aportan al conocimiento de la fisiología vascular y en particular al rol funcional que tienen los receptores purinérgicos ionotrópicos en las células de músculo liso de la arteria umbilical humana.

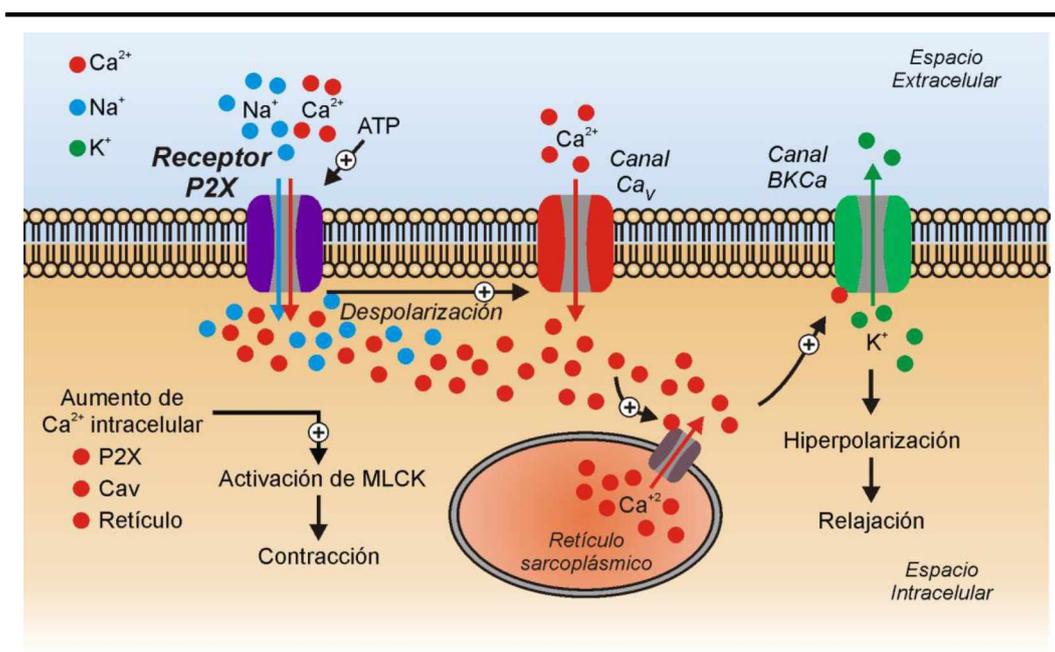


Figura 4.1. Esquema que resume los resultados obtenidos y las posibles relaciones fisiológicas establecidas entre las estructuras estudiadas en la presente Tesis Doctoral.

Sección 5

Bibliografía

-
- [1] G. Burnstock, "Purinergetic nerves.," *Pharmacol. Rev.*, vol. 24, no. 3, pp. 509–81, Sep. 1972.
 - [2] G. Burnstock, G. Campbell, M. Bennett, and M. E. Holman, "Innervation of the guinea-pig taenia coli: Are there intrinsic inhibitory nerves which are distinct from sympathetic nerves?," *Int. J. Neuropharmacol.*, vol. 3, pp. 163–166, 1964.
 - [3] G. Burnstock, G. Campbell, D. Satchell, and 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.*, vol. 40, no. 4, pp. 668–88, Dec. 1970.
 - [4] J. Hughes and J. R. Vane, "An analysis of the responses of the isolated portal vein of the rabbit to electrical stimulation and to drugs.," *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, vol. 30, pp. 46–66, 1967.
 - [5] G. Burnstock, "Evolution of the autonomic innervation of visceral and cardiovascular systems in vertebrates.," *Pharmacol. Rev.*, vol. 21, no. 308, pp. 247–324, 1969.
 - [6] D. R. Ballard, F. M. Abboud, and H. E. Mayer, "Release of a humoral vasodilator substance during neurogenic vasodilatation.," *Am. J. Physiol.*, vol. 219, no. 5, pp. 1451–1457, 1970.
 - [7] G. B. Chesher and R. H. Thorp, "The atropine-resistance of the response to intrinsic nerve stimulation of the guinea-pig bladder.," *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, vol. 25, pp. 288–294, 1965.
 - [8] G. B. Chesher, "Differentiation of receptors for exogenous and endogenous acetylcholine in the urinary bladder," *Agents Actions*, vol. 1, pp. 128–132, 1970.
 - [9] J. C. Eccles, *The Physiology of Synapses*. Springer Berlin Heidelberg, 1964, p. 316.
 - [10] C. Su, J. A. Bevan, and G. Burnstock, "[³H]adenosine triphosphate: release during stimulation of enteric nerves.," *Science*, vol. 173, no. 12, pp. 336–338, 1971.

-
- [11] G. Burnstock, "Do some nerve cells release more than one transmitter?," *Neuroscience*, vol. 1, no. 1976, pp. 239–248, 1976.
- [12] G. Burnstock, "Purinergetic receptors," *J. theor. Biol.*, vol. 62, pp. 491–503, 1976.
- [13] G. Burnstock, *A basis for distinguishing two types of purinergetic receptor*. Raven Press, 1978, pp. 107–118.
- [14] D. van Calker, M. Müller, and B. Hamprecht, "Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells.," *J. Neurochem.*, vol. 33, pp. 999–1005, 1979.
- [15] G. Burnstock and C. Kennedy, "Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?," *Gen. Pharmacol.*, vol. 16, no. 5, pp. 433–440, Jan. 1985.
- [16] F. Libert, M. Parmentier, A. Lefort, C. Dinsart, J. Van Sande, C. Maenhaut, M. J. Simons, J. E. Dumont, and G. Vassart, "Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family.," *Science*, vol. 244, no. November 1988, pp. 569–572, 1989.
- [17] F. Libert, E. Passage, M. Parmentier, M. J. Simons, G. Vassart, and M. G. Mattei, "Chromosomal mapping of A1 and A2 adenosine receptors, VIP receptor, and a new subtype of serotonin receptor.," *Genomics*, vol. 11, pp. 225–227, 1991.
- [18] F. Libert, S. N. Schiffmann, A. Lefort, M. Parmentier, C. Gérard, J. E. Dumont, J. J. Vanderhaeghen, and G. Vassart, "The orphan receptor cDNA RDC7 encodes an A1 adenosine receptor.," *EMBO J.*, vol. 10, no. 7, pp. 1677–1682, 1991.
- [19] K. D. Lustig, A. K. Shiau, A. J. Brake, and D. Julius, "Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 90, no. June, pp. 5113–5117, 1993.
- [20] T. E. Webb, J. Simon, B. J. Krishek, a N. Bateson, T. G. Smart, B. F. King, G. Burnstock, and E. a Barnard, "Cloning and functional

- expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor.," *FEBS Lett.*, vol. 324, no. 2, pp. 219–225, 1993.
- [21] S. Valera, N. Hussy, R. J. Evans, N. Adami, R. a North, A. Surprenant, and G. Buell, "A new class of ligand-gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP.," *Nature*, vol. 371, pp. 516–519, 1994.
- [22] A. J. Brake, M. J. Wagenbach, and D. Julius, "New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor," *Nature*, vol. 371, no. 6497, pp. 519–523, Oct. 1994.
- [23] B. B. Fredholm, A. P. IJzerman, K. a Jacobson, K. N. Klotz, and J. Linden, "International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors.," *Pharmacol. Rev.*, vol. 53, no. 4, pp. 527–552, 2001.
- [24] B. S. Khakh, G. Burnstock, C. Kennedy, B. F. King, R. a North, P. Séguéla, M. Voigt, and P. P. Humphrey, "International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits.," *Pharmacol. Rev.*, vol. 53, no. 1, pp. 107–118, 2001.
- [25] M. P. Abbracchio, G. Burnstock, J.-M. Boeynaems, E. a Barnard, J. L. Boyer, C. Kennedy, G. E. Knight, M. Fumagalli, C. Gachet, K. a Jacobson, and G. a Weisman, "International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy.," *Pharmacol. Rev.*, vol. 58, no. 3, pp. 281–341, 2006.
- [26] B. B. Fredholm, M. P. Abbracchio, G. Burnstock, J. W. Daly, T. K. Harden, K. A. Jacobson, P. Leff, and M. Williams, "Nomenclature and classification of purinoceptors.," *Pharmacol. Rev.*, vol. 46, pp. 143–156, 1994.
- [27] E. R. Lazarowski, J. I. Sesma, L. Seminario-Vidal, and S. M. Kreda, *Molecular Mechanisms of Purine and Pyrimidine Nucleotide Release*, 1st ed., vol. 61. Elsevier Inc., 2011, pp. 221–261.
- [28] V.-P. Jaakola, M. T. Griffith, M. A. Hanson, V. Cherezov, E. Y. T. Chien, J. R. Lane, A. P. Ijzerman, and R. C. Stevens, "The 2.6

- angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist.," *Science*, vol. 322, no. 2, pp. 1211–1217, 2008.
- [29] G. Burnstock, "Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future.," *BioEssays*, vol. 34, no. 3, pp. 218–25, Mar. 2012.
- [30] "Adenosine receptors," *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology*, 2014. [Online]. Available: <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=3>.
- [31] M. Uhlen, L. Fagerberg, B. M. Hallstrom, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, A. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjostedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C. A. Szigartyo, J. Odeberg, D. Djureinovic, J. O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P.-H. P. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J. M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von Heijne, J. Nielsen, F. Ponten, M. Uhlén, L. Fagerberg, B. M. Hallström, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, Å. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjöstedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C. A. Szigartyo, J. Odeberg, D. Djureinovic, J. O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P.-H. P. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J. M. Schwenk, M. Hamsten, K. Von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. Von Heijne, J. Nielsen, and F. Pontén, "Tissue-based map of the human proteome," *Science (80-.)*, vol. 347, pp. 1260419–1260419, 2015.
- [32] I. Feoktistov, A. E. Goldstein, S. Ryzhov, D. Zeng, L. Belardinelli, T. Voyno-Yasenetskaya, and I. Biaggioni, "Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: Role of A2B receptors in angiogenic factor regulation," *Circ. Res.*, vol. 90, pp. 531–538, 2002.
- [33] A. Sato, K. Terata, H. Miura, K. Toyama, F. R. Loberiza, O. a Hatoum, T. Saito, I. Sakuma, and D. D. Gutterman, "Mechanism of vasodilation to adenosine in coronary arterioles from patients with heart disease.," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 288, pp. H1633–H1640, 2005.

- [34] M. V. Donoso, R. López, R. Miranda, R. Briones, and J. P. Huidobro-Toro, "A2B adenosine receptor mediates human chorionic vasoconstriction and signals through arachidonic acid cascade," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 288, pp. H2439–H2449, 2005.
- [35] J. P. Headrick, K. J. Ashton, R. B. Rose-Meyer, and J. N. Peart, "Cardiovascular adenosine receptors: Expression, actions and interactions," *Pharmacol. Ther.*, vol. 140, no. 1, pp. 92–111, 2013.
- [36] P. Smits, S. B. Williams, D. E. Lipson, P. Banitt, G. A. Rongen, and M. A. Creager, "Endothelial Release of Nitric Oxide Contributes to the Vasodilator Effect of Adenosine in Humans," *Circulation*, vol. 92, no. 8, pp. 2135–2141, Oct. 1995.
- [37] M. B. Grant, R. W. Tarnuzzer, S. Caballero, M. J. Ozeck, M. I. Davis, P. E. Spoerri, I. Feoktistov, I. Biaggioni, J. C. Shryock, and L. Belardinelli, "Adenosine receptor activation induces vascular endothelial growth factor in human retinal endothelial cells," *Circ. Res.*, vol. 85, pp. 699–706, 1999.
- [38] E. A. Barnard, G. Burnstock, and T. E. Webb, "G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: A new receptor family," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 15, pp. 67–70, 1994.
- [39] G. Burnstock, M.-P. Abbracchio, J.-M. Boeynaems, J. L. Boyer, S. Ceruti, M. Fumagalli, C. Gachet, R. G. Humphries, K. A. Jacobson, C. Kennedy, B. F. King, D. Lecca, G. A. Miras-Portugal, Maria Teresa Weisman, and R. Hills, "P2Y receptors. Introduction," *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology*, 2013. [Online]. Available: <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyIntroductionForward?familyId=52>.
- [40] L. Wang, L. Karlsson, S. Moses, A. Hultgårdh-Nilsson, M. Andersson, C. Borna, T. Gudbjartsson, S. Jern, and D. Erlinge, "P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells," *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 40, no. 6, pp. 841–53, Dec. 2002.
- [41] M. Shalev, F. Staerman, H. Allain, B. Lobel, and B. Saiag, "Stimulation of P2y purinoceptors induces, via nitric oxide production, endothelium-

- dependent relaxation of human isolated corpus cavernosum,” *J. Urol.*, vol. 161, no. March, pp. 955–959, 1999.
- [42] A. Raqeeb, J. Sheng, N. Ao, and A. P. Braun, “Purinergic P2Y2 receptors mediate rapid Ca(2+) mobilization, membrane hyperpolarization and nitric oxide production in human vascular endothelial cells,” *Cell Calcium*, vol. 49, pp. 240–248, 2011.
- [43] M. Malmsjö, D. Erlinge, E. D. Högestätt, and P. M. Zygmunt, “Endothelial P2Y receptors induce hyperpolarisation of vascular smooth muscle by release of endothelium-derived hyperpolarising factor,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 364, pp. 169–173, 1999.
- [44] A.-K. Wihlborg, M. Malmsjö, A. Eyjolfsson, R. Gustafsson, K. Jacobson, and D. Erlinge, “Extracellular nucleotides induce vasodilatation in human arteries via prostaglandins, nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarising factor,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 138, pp. 1451–1458, 2003.
- [45] S. Buvinic, M. I. Poblete, M. V. Donoso, A. M. Delpiano, R. Briones, R. Miranda, and J. P. Huidobro-Toro, “P2Y1 and P2Y2 receptor distribution varies along the human placental vascular tree: role of nucleotides in vascular tone regulation,” *J. Physiol.*, vol. 573, no. Pt 2, pp. 427–43, Jun. 2006.
- [46] V. Ralevic and G. Burnstock, “Receptors for purines and pyrimidines,” *Pharmacol. Rev.*, vol. 50, no. 3, pp. 413–92, Sep. 1998.
- [47] G. Burnstock, “Dual control of vascular tone and remodelling by ATP released from nerves and endothelial cells,” *Pharmacol. Rep.*, vol. 60, no. 1, pp. 12–20, 2008.
- [48] D. Erlinge, “Extracellular ATP: a growth factor for vascular smooth muscle cells,” *Gen. Pharmacol.*, vol. 31, no. 1, pp. 1–8, Jul. 1998.
- [49] A. Newbolt, R. Stoop, C. Virginio, A. Surprenant, R. A. North, G. Buell, and F. Rassendren, “Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor),” *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 24, pp. 15177–82, Jun. 1998.

-
- [50] G. E. Torres, T. M. Egan, and M. M. Voigt, "Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 10, pp. 6653–6659, 1999.
- [51] K. Kaczmarek-Hájek, E. Lörinczi, R. Hausmann, and A. Nicke, "Molecular and functional properties of P2X receptors--recent progress and persisting challenges.," *Purinergic Signal.*, vol. 8, no. 3, pp. 375–417, Sep. 2012.
- [52] M. Hattori and E. Gouaux, "Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors.," *Nature*, vol. 485, no. 7397, pp. 207–12, May 2012.
- [53] F. Rassendren, G. Buell, A. Newbolt, R. A. North, and A. Surprenant, "Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor," *EMBO J.*, vol. 16, no. 12, pp. 3446–3454, 1997.
- [54] T. Kawate, J. C. Michel, W. T. Birdsong, and E. Gouaux, "Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state.," *Nature*, vol. 460, no. 7255, pp. 592–8, Jul. 2009.
- [55] J. a Roberts, C. Vial, H. R. Digby, K. C. Agboh, H. Wen, A. Atterbury-Thomas, and R. J. Evans, "Molecular properties of P2X receptors.," *Pflugers Arch.*, vol. 452, no. 5, pp. 486–500, Aug. 2006.
- [56] D. S. K. Samways, B. S. Khakh, S. Dutertre, and T. M. Egan, "Preferential use of unobstructed lateral portals as the access route to the pore of human ATP-gated ion channels (P2X receptors).," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, pp. 13800–13805, 2011.
- [57] R. J. Evans, C. Lewis, C. Virginio, K. Lundstrom, G. Buell, A. Surprenant, and R. a North, "Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells.," *J. Physiol.*, vol. 497 (Pt 2, pp. 413–22, Dec. 1996.
- [58] R. A. North, "Molecular physiology of P2X receptors.," *Physiol. Rev.*, vol. 82, no. 4, pp. 1013–67, Oct. 2002.
- [59] M. B. Rokic and S. S. Stojilkovic, "Two open states of P2X receptor channels.," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 7, no. November, p. 215, 2013.

-
- [60] “P2X receptors,” *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology*, 2014. [Online]. Available: <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=77>.
- [61] G. Burnstock, “Purinergetic regulation of vascular tone and remodelling,” *Auton. Autacoid Pharmacol.*, vol. 29, no. 3, pp. 63–72, Jul. 2009.
- [62] G. Burnstock and V. Ralevic, “Purinergetic signaling and blood vessels in health and disease,” *Pharmacol. Rev.*, vol. 66, no. 1, pp. 102–92, Jan. 2014.
- [63] T. Hafting and O. Sand, “Purinergetic activation of BK channels in clonal kidney cells (Vero cells),” *Acta Physiol. Scand.*, vol. 170, pp. 99–109, 2000.
- [64] D. Strøbaek, P. Christophersen, S. Dissing, and S. P. Olesen, “ATP activates K and Cl channels via purinoceptor-mediated release of Ca²⁺ in human coronary artery smooth muscle,” *Am. J. Physiol.*, vol. 271, pp. C1463–C1471, 1996.
- [65] V. Milesi, J. Raingo, A. Rebolledo, and A. O. Grassi De Gende, “Potassium channels in human umbilical artery cells,” *J. Soc. Gynecol. Investig.*, vol. 10, pp. 339–346, 2003.
- [66] P. Martín, A. Rebolledo, A. R. R. Palomo, M. Moncada, L. Piccinini, and V. Milesi, “Diversity of potassium channels in human umbilical artery smooth muscle cells: a review of their roles in human umbilical artery contraction,” *Reprod. Sci.*, vol. 21, no. 4, pp. 432–41, Apr. 2014.
- [67] S. B. Fox and T. Y. Khong, “Lack of innervation of human umbilical cord. An immunohistological and histochemical study,” *Placenta*, vol. 11, pp. 59–62, 1990.
- [68] B. Pansky, *Review of Medical Embryology*. Macmillan USA, 1982, p. 527.
- [69] T. W. Sadler and J. Langman, *Langman’s Medical Embryology*, 12th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

-
- [70] T. Todros, S. L. Adamson, C. Guiot, E. Bankowski, L. Raio, E. Di Naro, and H. Schneider, "Umbilical cord and fetal growth--a workshop report.," *Placenta*, vol. 23 Suppl A. pp. S130–S132, 2002.
- [71] A. Sexton, M. Turmaine, W. Q. Cai, and G. Burnstock, "A study of the ultrastructure of developing human umbilical vessels.," *J. Anat.*, vol. 188 (Pt 1, pp. 75–85, 1996.
- [72] K. Takechi, Y. Kuwabara, and M. Mizuno, "Ultrastructural and immunohistochemical studies of Wharton's jelly umbilical cord cells.," *Placenta*, vol. 14, pp. 235–245, 1993.
- [73] A. Somlyo, "Ultrastructure of Vascular Smooth Muscle," in *Comprehensive Physiology*, vol. 4, 2011, pp. 33–67.
- [74] F. T. Ashton, A. V Somlyo, and A. P. Somlyo, "The contractile apparatus of vascular smooth muscle: intermediate high voltage stereo electron microscopy.," *J. Mol. Biol.*, vol. 98, pp. 17–29, 1975.
- [75] P. Cooke, "Organization of contractile fibers in smooth muscle.," *Cell Muscle Motil.*, vol. 3, pp. 57–77, 1983.
- [76] J. T. Stull, P. J. Gallagher, B. P. Herring, and K. E. Kamm, "Vascular smooth muscle contractile elements. Cellular regulation.," *Hypertension*, vol. 17, pp. 723–732, 1991.
- [77] B. G. Allen and M. P. Walsh, "The biochemical basis of the regulation of smooth-muscle contraction," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 19. pp. 362–368, 1994.
- [78] F. Meng, W. To, J. Kirkman-Brown, P. Kumar, and Y. Gu, "Calcium oscillations induced by ATP in human umbilical cord smooth muscle cells.," *J. Cell. Physiol.*, vol. 213, no. 1, pp. 79–87, Oct. 2007.
- [79] J. Sikora, S. N. Orlov, K. Furuya, and R. Grygorczyk, "Hemolysis is a primary ATP-release mechanism in human erythrocytes.," *Blood*, vol. 124, no. 13, pp. 2150–7, Sep. 2014.

- [80] P. Bodin, D. Bailey, and G. Burnstock, "Increased flow-induced ATP release from isolated vascular endothelial cells but not smooth muscle cells," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 103, pp. 1203–1205, 1991.
- [81] P. Bodin and G. Burnstock, "Increased release of ATP from endothelial cells during acute inflammation," *Inflamm. Res.*, vol. 47, pp. 351–354, 1998.
- [82] E. R. Lazarowski, R. C. Boucher, and T. K. Harden, "Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules.," *Mol. Pharmacol.*, vol. 64, no. 4, pp. 785–795, 2003.
- [83] G. R. Bergfeld and T. Forrester, "Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia.," *Cardiovasc. Res.*, vol. 26, no. 1, pp. 40–7, Jan. 1992.
- [84] N. Montalbetti, M. F. Leal Denis, O. P. Pignataros, E. Kobatake, E. R. Lazarowski, and P. J. Schwarzbaum, "Homeostasis of extracellular ATP in human erythrocytes," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 44, pp. 38397–38407, 2011.
- [85] G. V. Born and M. A. Kratzer, "Source and concentration of extracellular adenosine triphosphate during haemostasis in rats, rabbits and man.," *J. Physiol.*, vol. 354, pp. 419–429, 1984.
- [86] U. Goetz, M. Da Prada, and A. Pletscher, "Adenine-, guanine- and uridine-5'-phosphonucleotides in blood platelets and storage organelles of various species.," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 178, no. 1, pp. 210–215, 1971.
- [87] J. D. Pearson and J. L. Gordon, "Vascular endothelial and smooth muscle cells in culture selectively release adenine nucleotides.," *Nature*, vol. 281, pp. 384–386, 1979.
- [88] A. W. Lohman, M. Billaud, and B. E. Isakson, "Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall.," *Cardiovasc. Res.*, vol. 95, no. 3, pp. 269–80, Aug. 2012.

-
- [89] N. J. Robinson, M. Wareing, N. K. Hudson, R. T. Blankley, P. N. Baker, J. D. Aplin, and I. P. Crocker, "Oxygen and the liberation of placental factors responsible for vascular compromise.," *Lab. Invest.*, vol. 88, no. December 2007, pp. 293–305, 2008.
- [90] X. Bo, A. Sexton, Z. Xiang, S. L. Nori, and G. Burnstock, "Pharmacological and histochemical evidence for P2X receptors in human umbilical vessels," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 353, no. 1, pp. 59–65, Jul. 1998.
- [91] P. Valdecantos, R. Briones, P. Moya, A. Germain, and J. P. Huidobro-Toro, "Pharmacological identification of P2X1, P2X4 and P2X7 nucleotide receptors in the smooth muscles of human umbilical cord and chorionic blood vessels.," *Placenta*, vol. 24, no. 1, pp. 17–26, Jan. 2003.
- [92] P. Martín, M. Moncada, N. Enrique, A. Asuaje, J. M. Valdez Capuccino, C. Gonzalez, and V. Milesi, "Arachidonic acid activation of BKCa (Slo1) channels associated to the β 1-subunit in human vascular smooth muscle cells.," *Pflugers Arch.*, vol. 466, no. 9, pp. 1779–92, Sep. 2014.
- [93] G. F. Contreras, K. Castillo, N. Enrique, W. Carrasquel-Ursulaez, J. P. Castillo, V. Milesi, A. Neely, O. Alvarez, G. Ferreira, C. González, and R. Latorre, "A BK (Slo1) channel journey from molecule to physiology.," *Channels (Austin)*, vol. 7, no. 6, pp. 442–58, 2013.
- [94] Z. Zhang, M. Li, R. Lu, A. Alioua, E. Stefani, and L. Toro, "The Angiotensin II Type 1 Receptor (AT1R) Closely Interacts with Large Conductance Voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ (BK) Channels and Inhibits Their Activity Independent of G-protein Activation," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 37, pp. 25678–25689, 2014.
- [95] M. Li, Y. Tanaka, A. Alioua, Y. Wu, R. Lu, P. Kundu, E. Sanchez-Pastor, J. Marijic, E. Stefani, and L. Toro, "Thromboxane A2 receptor and MaxiK-channel intimate interaction supports channel trans-inhibition independent of G-protein activation.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, pp. 19096–19101, 2010.

-
- [96] F. Fujii, J. Kimura, and C. Tase, "Ca(2+)-activated K⁺ current induced by external ATP in PC12 cells," *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, vol. 26, no. 1, pp. 39–47, Jan. 1999.
- [97] U. Klöckner, "Intracellular calcium ions activate a low-conductance chloride channel in smooth-muscle cells isolated from human mesenteric artery.," *Pflugers Arch.*, vol. 424, pp. 231–237, 1993.
- [98] C. Patton, "MaxChelator." [Online]. Available: <http://web.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>.
- [99] Invitrogen, "Fura and Indo Ratiometric Calcium Indicators." 2011.
- [100] V. Milesi, E. A. Aiello, A. Rebolledo, A. Gomez Alvis, and A. O. Grassi de Gende, "Role of a Ca²⁺-activated K⁺ current in the maintenance of resting membrane potential of isolated, human, saphenous vein smooth muscle cells.," *Pflugers Arch.*, vol. 437, pp. 455–461, 1999.
- [101] J. A. Yang and G. W. He, "Surgical preparation abolishes endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated hyperpolarization in the human saphenous vein," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 63, no. 96, pp. 429–433, 1997.
- [102] J. Rettinger and G. Schmalzing, "Activation and desensitization of the recombinant P2X₁ receptor at nanomolar ATP concentrations.," *J. Gen. Physiol.*, vol. 121, no. 5, pp. 451–61, May 2003.
- [103] R. A. North and A. Surprenant, "Pharmacology of cloned P2X receptors.," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 40, pp. 563–80, Jan. 2000.
- [104] J. R. Gever, D. a Cockayne, M. P. Dillon, G. Burnstock, and A. P. D. W. Ford, "Pharmacology of P2X channels.," *Pflugers Arch.*, vol. 452, no. 5, pp. 513–37, Aug. 2006.
- [105] S. Salemme, A. Rebolledo, F. Speroni, S. Petruccelli, and V. Milesi, "L, P-/Q- and T-type Ca²⁺ channels in smooth muscle cells from human umbilical artery.," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 20, pp. 55–64, 2007.
- [106] C. J. Lewis and R. J. Evans, "Lack of run-down of smooth muscle P2X receptor currents recorded with the amphotericin permeabilized patch

- technique, physiological and pharmacological characterization of the properties of mesenteric artery P2X receptor ion channels,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 131, no. 8, pp. 1659–66, Dec. 2000.
- [107] C. Vial, J. a Roberts, and R. J. Evans, “Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels,” *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 25, no. 9, pp. 487–93, Sep. 2004.
- [108] J. Robertson, M. G. Rae, and E. G. Rowan, “Characterization of a P2x-purinoceptor in cultured neurones of the rat dorsal root ganglia,” *Br J Pharmacol.*, pp. 951–956, 1996.
- [109] B. D. Grubb and R. J. Evans, “Characterization of cultured dorsal root ganglion neuron P2X receptors,” vol. 11, no. July 1998, pp. 149–154, 1999.
- [110] G. C. Wellman, D. J. Nathan, C. M. Saundry, G. Perez, A. D. Bonev, P. L. Penar, B. I. Tranmer, and M. T. Nelson, “Ca²⁺ sparks and their function in human cerebral arteries,” *Stroke*, pp. 802–809, 2002.