



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas
Mención Ciencias Fisiológicas

TESIS DOCTORAL

LIPOPOLISACARIDO AFECTA EL TRANSPORTE MUCOCILIAR
ALTERANDO EL MECANISMO DE LIBERACIÓN DE ATP QUE
REGULA LA ACTIVIDAD CILIAR EN LAS VÍAS RESPIRATORIAS
DE RATÓN.

Por

Daniela Verónica Carreño Bustos

Tutor: Manuel Villalón Bravo

Santiago, Mayo 2014



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas
Mención Ciencias Fisiológicas

**LIPOPOLISACARIDO AFECTA EL TRANSPORTE MUCOCILIAR
ALTERANDO EL MECANISMO DE LIBERACIÓN DE ATP QUE
REGULA LA ACTIVIDAD CILIAR EN LAS VÍAS
RESPIRATORIAS DE RATÓN.**

TEIS ENTREGADA A LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA
DE CHILE PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLOGICAS CON MENCIÓN EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS.

Daniela Verónica Carreño Bustos

Tutor: Manuel Villalón Bravo

MAYO 2014



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
Facultad de Ciencias Biológicas

LA DEFENSA FINAL DE LA TESIS DOCTORAL TITULADA:

“Lipopolisacarido afecta el transporte mucociliar alterando el mecanismo de liberación de ATP que regula la actividad ciliar en las vías respiratorias de ratón”

Presentada con fecha de hoy por la candidata a Doctor en Ciencias Biológicas Mención Ciencias Fisiológicas.

DANIELA VERONICA CARREÑO BUSTOS

Ha sido aprobada por el Tribunal Examinador, constituido por los profesores abajo firmantes, calificándose el trabajo realizado, el manuscrito sometido y la defensa oral con nota _____(_____)

Dra. Francica Bronfman C
 Jefa Mención Ciencias Fisiológicas
 Facultad de Ciencias Biológicas-PUC

Dr. Juan A. Correa M.
 Decano
 Facultad de Ciencias Biológicas-PUC

Dr. Manuel Villalón
 Director de Tesis
 Facultad de Ciencias Biológicas-PUC

Dr. Claudio Acuña
 Profesor Invitado
 Universidad de Santiago

Dr. Mauricio Boric
 Miembro Comité de Tesis
 Facultad de Ciencias Biológicas-PUC

Dr. Juan Pablo García-Huidobro
 Miembro Comité de Tesis
 Facultad de Ciencias Biológicas-PUC

Esta tesis está dedicada

A mis padres y hermano, porque sin ellos nada de esto sería posible

A mi madrina Sofía, por su preocupación, amor y apoyo constante

A mi abuelita Rosa, por acompañarme siempre

Y a mi esposo Rodrigo, por su inmenso amor.

And in the end, the love you take is equal to the love you make

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi tutor Manuel Villalón, por haberme dado la oportunidad de ingresar a su laboratorio cuando apenas sabía pipetear. Gracias por haberme dado la oportunidad de formarme en un laboratorio rodeado de buena gente, de las cuales aprendí no tan solo sobre ciencia sino sobre la vida y gracias por haber sido un tutor preocupado por la persona y por los logros científicos.

A todo el laboratorio Villalón, por enseñarme tanto. A todos sus ex miembros: Cecilia Brañes, Marisol Espinosa, Trinidad Sánchez, Alejandra Pérez, Ángela Court, María Gracia Gervasi, Magaly Monsalve y a sus miembros actuales: Mariana Ríos, Karla Droguett, Carolina Oses y Carmen Llados, muchas gracias por todo.

Especialmente quiero agradecer a Mariana Ríos y Karla Droguett, por sus constantes correcciones, apoyo y especialmente por su amistad y cariño. Debo confesar que en el último tiempo no me quería graduar para seguir estando en la oficina en su compañía. También quiero agradecer a Carmen Llados por todo el apoyo, cariño y por ser la mamá de mis cultivos.

Quiero agradecer a Marilen Ortiz por todo lo enseñado y a mis viejtas, por tantos tecitos compartidos.

Agradezco al profesor Juan Carlos Sáez, por la amable donación de los ratones knockout para Panx1 y por sus certeras observaciones en la defensa de mi proyecto de tesis.

A Francisca Bronfman, jefa del programa y a todos los miembros de mi comisión: Claudio Acuña, Mauricio Boric y Juan Pablo García-Huidobro por sus correcciones y aportes que hicieron que esta tesis fuese mejor.

Al profesor Noam Cohen, por recibirme en su laboratorio en la Universidad de Pensilvania. Muchas gracias por toda la buena disposición de su laboratorio. A Roció, Joaquín y a toda su familia por recibirme y hacerme sentir en mi hogar.

A todo el quinto piso de fisiología, por su buena onda y buena disposición que hacen del quinto piso una familia. Especialmente a los miembros de los laboratorios Moreno y Owen. A Marcela Carrasco por toda la ayuda y su buena disposición.

Agradecer a mis padres José y Verónica, a quienes debo todo lo que soy y seré. Si no fuera por sus constantes desafíos y motivación nada de esto sería posible.

A mi hermano Gabriel, primos, tíos, sobrinas y amigos, por el cariño entregado a lo largo de los años.

A mi esposo Rodrigo por la compañía y por hacerme feliz a lo largo de este camino compartido. Here, there and everywhere.

Al financiamiento gracias al cual pude realizar mi tesis, especialmente a la Vicerrectoría de investigación de la PUC, Conicyt y a la Facultad de Ciencias Biológicas.

INDICE DE MATERIAS

	Pagina
TITULO	I
APROBACION COMITÉ TESIS	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
INDICE DE MATERIAS	VI
INDICE DE FIGURAS	IX
ABREVIATURAS	XI
I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	3
III. INTRODUCCIÓN	5
1. Anatomía y fisiología del epitelio respiratorio.	5
2. Transporte mucociliar y frecuencia de batido ciliar en el epitelio respiratorio.	6
3. Mecanismo de regulación de la FBC en el epitelio respiratorio: participación de ATP extracelular.	7
4. Contaminantes ambientales y actividad ciliar en las vías respiratorias.	11
5. LPS, componente de la pared bacteriana.	12
5.1 Características generales y estructura	12
5.2 LPS, vías de acción	13
IV. HIPÓTESIS	20
V. OBJETIVO GENERAL	20
IV.i Objetivos específicos	20
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	21
i) MATERIALES	21

ii) METODOS.....	21
1. Animales	21
2. Cultivos Primarios de epitelio respiratorio de ratón	22
3. Determinación de la frecuencia de batido ciliar	23
4. Medición de movimiento de microesferas en epitelio de tráquea	24
5. Administración intranasal de LPS	25
6. Western Blot	25
7. Ensayo liberación ATP	26
8. Ensayo captación colorante	27
9. Determinación de los niveles de calcio libre intracelular	27
10. Inmunofluorescencia	28
11. Extracción de ARN y RT-PCR	30
12. Microscopía electrónica de Barrido (MEB)	31
13. Análisis de los datos	32
VII. RESULTADOS	33
1. Caracterización cultivos primarios de epitelio respiratorio de ratón.	33
2. LPS induce un incremento en la FBC, en células ciliadas del epitelio respiratorio.	35
3. LPS induce un incremento en el transporte mucociliar de microesferas en tráquea de ratón.	37
4. Efecto de LPS sobre la liberación de ATP	39
I) LPS induce secreción de ATP en las células ciliadas de epitelio respiratorio.	39
II) ATP liberado induce incrementos en la FBC en células ciliadas del epitelio respiratorio	41
5. Participación de la vía de señalización TLR en el incremento de la FBC inducido por LPS, en células ciliadas del epitelio respiratorio.	44
I) Expresión de canales TLR4 en células ciliadas de la tráquea de ratón.	44
II) Bloqueador de la activación de NF- κ B, no altera el efecto de LPS sobre la FBC en las células ciliadas respiratorias.	47

III) Activación de NF- κ B no participa en el incremento de FBC inducido por LPS.	49
IV) Interleucina-8 no modifica la FBC de células ciliadas de cultivos primarios.	51
6. Participación del receptor P2X7 y Panexina 1 en el aumento de la FBC inducido por LPS, en las células ciliadas del epitelio respiratorio.	53
I) Expresión de canales purinérgicos y Panexina 1 en células ciliadas del epitelio respiratorio.	53
II) Antagonistas de canales purinérgicos, previenen el incremento en la FBC inducido por LPS, en células ciliadas del epitelio respiratorio.	56
III) <i>knockout</i> e inhibidores de Panx1, previenen el incremento en la FBC inducido por LPS, en células ciliadas del epitelio respiratorio.	59
IV) Antagonistas de canales purinérgicos previenen incrementos en la concentración extracelular de ATP inducido por LPS, en células ciliadas del epitelio respiratorio.	64
V) Inhibidores de panexina 1, previenen aumentos en la concentración extracelular de ATP inducido por LPS, en células ciliadas del epitelio respiratorio.	67
7. Participación de la vía de señalización mediada por los receptores P2Y2 en el incremento de la FBC inducido por LPS, en las células ciliadas del epitelio respiratorio.	69
I) Inhibidor selectivo de la proteína quinasa C previene el aumento en la FBC inducido por LPS, en células ciliadas del epitelio respiratorio.	70
II) Ca ²⁺ intracelular participa en el incremento de la FBC inducido por LPS, en células ciliadas del epitelio respiratorio.	72
III) Óxido nítrico, está involucrado en el aumento en la FBC inducido por LPS, en células ciliadas del epitelio respiratorio.	78
8. Modelo	82
VIII. DISCUSIÓN	83
IX. CONCLUSIONES	94
X. BIBLIOGRAFÍA	95

INDICE DE FIGURAS

	Paginas
Figura 1. Caracterización cultivos y técnica para la determinación frecuencia de batido ciliar.	34
Figura 2. LPS incrementa la FBC en cultivos primarios de tráquea de ratón.	32
Figura 3. LPS incrementa la velocidad de desplazamiento de microesferas en tráqueas de ratón.	38
Figura 4. LPS induce secreción de ATP en cultivos primarios de tráquea de ratón.	40
Figura 5. Apirasa reduce la FBC inducida por LPS, en cultivos primarios de tráquea de ratón.	43
Figura 6. Expresión de receptores TLR4, en tejido de tráquea y en cultivos primarios de tráquea de ratón.	46
Figura 7. Dexametasona no altera el incremento de la FBC inducido por LPS en cultivos primarios de tráquea de ratón.	48
Figura 8. PDTC no altera el efecto de LPS sobre el incremento de la FBC en cultivos primarios de tráquea de ratón.	50
Figura 9. Interleucina-8 no afecta la FBC en cultivos primarios de tráquea de ratón.	52
Figura 10. Expresión de receptores P2X7 en cultivos primarios de células ciliadas de epitelio respiratorio.	54
Figura 11. Expresión de panexina 1 en epitelio de tráquea de ratón.	55
Figura 12. Antagonistas de canales purinérgicos, Suramina, oATP y KN62 bloquean la FBC inducida por LPS.	58
Figura 13. LPS no incrementa la FBC en cultivos primarios de ratones <i>knockout</i> de Panx1.	61
Figura 14. Inhibidores de Panx1, probenecid y carbenoxolona bloquean la FBC, en cultivos primarios de células ciliadas de epitelio respiratorio.	62
Figura 15. LPS induce captación de BrEt en cultivos primarios de células ciliadas de epitelio respiratorio.	63

Figura 16. Antagonistas de P2X7R afectan la secreción de ATP inducida por LPS.	66
Figura 17. Inhibidores de Panx1 afectan la liberación de ATP estimulada por LPS.	68
Figura 18. Bloqueo de la proteína cinasa C, reduce el efecto de LPS sobre la FBC.	71
Figura 19. Bapta-AM, quelador de Ca^{2+} intracelular afecta el incremento de la FBC inducido por LPS.	75
Figura 20. Inhibidor de la Calcio-Calmodulina, W-7 reduce el efecto de LPS sobre la FBC.	76
Figura 21. LPS no modifica los niveles de Ca^{2+} libre intracelular, en cultivos primarios de células ciliadas de epitelio respiratorio.	77
Figura 22. Inhibidor de la óxido nítrico sintasa, L-NAME, previene el aumento en la FBC inducido por LPS.	80
Figura 23. Inhibidor de PKG, KT 5823 previene el aumento en la FBC inducido por LPS.	81
Figura 24. Modelo de señalización y acción de LPS sobre la FBC en cultivos primarios de células ciliadas de epitelio respiratorio.	82

ABREVIATURAS

ABC: Área bajo la curva

ATP: Adenosin trifosfato

BrEt: Bromuro de etidio

Ca²⁺: Calcio

cAMP: Adenosina 3'5' monofosfato sódico

CBX: Carbenoxolona

DMSO: Dimetil Sulfóxido

FBC: Frecuencia de Batido Ciliar

GAPDH: Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa

IP₃: Inositol 1, 4,5 trifosfato

LPS: Lipopolisacarido

Mes: Microesferas de poliestireno

mRNA: RNA mensajero

NF-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NOS: Óxido nítrico sintasa

NO: Óxido Nítrico

oATP: ATP oxidado.

P2Y2: receptor purinérgico del tipo Y2

Panx1: Panexina 1

PBS: Tampón fosfato salino

PKA: Proteína cinasa A

PKC: Proteína cinasa C

PKG: Proteína cinasa G

PLC: Fosfolipasa C

RT-PCR: Transcripción reversa de reacción en cadena de polimerasa

SDS: Dodecil sulfato de sodio

TCM: Transporte Mucociliar

TLR: Toll like receptors

I. RESUMEN

En el epitelio mucociliado, la eficiencia del transporte mucociliar (TMC) es determinada por la frecuencia de batido ciliar (FBC) y la actividad coordinada del movimiento de los cilios. Señales químicas producidas localmente por el epitelio como el adenosin trifosfato (ATP), pueden modificar la actividad ciliar del epitelio respiratorio, por su interacción con los receptores purinérgicos P2Y. Lipopolisacárido (LPS) un componente de la pared bacteriana, un conocido agente inflamatorio, cuyos efectos están mediados por el receptor TLR4, sin embargo hay poca evidencia sobre los efectos de LPS sobre la actividad ciliar y los mecanismos de liberación de ATP en epitelio respiratorio.

Para estudiar el efecto de LPS en la actividad ciliar y las vías de señalización involucradas, utilizamos cultivos primarios de epitelio ciliado de tráquea de ratón. La FBC fue determinada mediante videomicroscopía y el ATP extracelular fue medido mediante el ensayo de luciferina luciferasa, en condiciones control y en presencia de fármacos antagonistas e inhibidores de las distintas vías de señalización. También determinamos la velocidad de transporte mucociliar por el movimiento de las microesferas sobre el epitelio de la tráquea.

En este estudio, determinamos que LPS incrementa la FBC y la velocidad de transporte de las microesferas. El incremento en la FBC está asociado a un incremento en ATP extracelular. El incremento de la FBC fue bloqueado mediante el uso de apirasa, enzima que hidroliza el ATP extracelular.

La participación de la vía de señalización TLR fue evaluado en el efecto de LPS sobre la FBC. Mediante PCR e inmunofluorescencia detectamos la expresión del receptor TLR4 en los cultivos primarios. Antagonistas de NF- κ B no lograron bloquear el incremento de la FBC inducido por LPS, sugiriendo que la activación de este factor de transcripción no participa en el incremento de la FBC.

Usando antagonistas de receptores purinérgicos P2X7 (P2X7R) y Panexina 1 (Panx1), determinamos que ambos participan en el mecanismo de liberación de ATP inducido por LPS. Adicionalmente, establecimos mediante el ensayo de captación de colorante, que LPS induce apertura de Panx1. Un quelante de Ca^{2+} , BAPTA-AM bloquea el incremento en la FBC y la liberación de ATP inducido por LPS. Antagonistas específicos de la vía de señalización P2Y, bloquean el incremento en la FBC inducido por LPS. Estos resultados sugieren que LPS induce liberación de ATP al extracelular por un mecanismo que involucra la participación de Panx1 y P2X7R y luego este ATP activa la vía de señalización mediada por la vía de señalización P2Y.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que LPS es una señal química que participa en la regulación de la actividad del batido ciliar, aumentando la FBC y la velocidad del transporte mucociliar en células ciliadas de tráquea de ratón. Estos resultados dan evidencias del mecanismo por el cual factores ambientales pueden inducir una respuesta fisiológica funcional que afecta el clearance mucociliar.

II. ABSTRAC

In mucociliary epithelium, the effectiveness of mucociliary transport (MCT) is determined by the ciliary beat frequency (CBF) and the coordinated activity of the cilium movements. Chemical signals produced locally by the epithelia as adenosine triphosphate (ATP) can modify respiratory epithelial ciliary activity, by its interaction with P2Y purinergic receptors. Lipopolysaccharide (LPS), a component of the bacterial cell wall, is a known inflammatory agent whose effects are mediated by the TLR4 receptor however; there are no evidence about the effect of LPS on ciliary activity and on ATP release mechanism in respiratory epithelium.

To study the effect of LPS on ciliary activity and its signaling pathways, we used primary cultures of ciliated epithelium cells from mouse trachea. CBF was determined by videomicroscopy and extracellular ATP was measured by luciferin luciferase assay under control conditions and in the presence of antagonist and inhibitors of different pathways. We also determined mucociliary transport velocity by measuring the microsphere movement on the trachea ciliary epithelium.

In this study, we determined that LPS increased CBF and the velocity of microsphere. The increment in CBF is associated to an increase in extracellular ATP. CBF increase was blocked by apyrase, an enzyme that hydrolyzed extracellular ATP.

The involvement of TLR signaling pathway was evaluated in the effect of LPS on CBF. Using PCR and immunofluorescence, we detected the expression of TLR4 receptors in primary cultures. Antagonists of NF- κ B failed to block the increase of CBF induced by LPS, suggesting that the activation of this transcription factor does not participate in the CBF increment.

Using (P2X7R) and Pannexin 1 (Panx1) antagonists we determined that both participated in the ATP release mechanism induced by LPS. Additionally, we established by dye uptake assay, that LPS induced Panx1 opening. A Ca^{2+} chelator, BAPTA-AM, blocked the CBF increase and ATP release induced by LPS. Specific antagonists of P2Y pathway blocked CBF increase induced by LPS. These results suggest that LPS induces ATP released into the extracellular through a mechanism involving Panx1 and P2X7R and then ATP activates the signaling pathway mediated by the purinergic pathway P2Y.

In conclusion, our results demonstrated that LPS is a chemical signal that is involved in regulating ciliary beating activity by increasing CBF and the mucociliary transport velocity in the mouse trachea ciliated cells. These results provide evidence of the mechanism by which environmental factors can induce a physiological response that affects functional mucociliary clearance.

III. INTRODUCCION

1. Anatomía y fisiología del epitelio respiratorio.

Las vías respiratorias están recubiertas por una capa denominada mucosa, la cual toma contacto con el aire inspirado y está formado por un epitelio pseudoestratificado que contiene células ciliadas y secretoras de moco, dispuestas en una sola capa. Bajo la capa de mucosa, se observa una capa conjuntiva o lámina propia muy vascularizada (Jeffery y cols., 1997) que posee glándulas secretoras mixtas que liberan su contenido glicoproteico hacia el lumen aéreo formando el moco.

Durante la inspiración, el epitelio de las vías aérea representa un sitio primario para el ingreso y depósito de microorganismos potencialmente patógenos para el cuerpo. El contacto con organismos como bacterias, hongos, virus así como también con contaminantes, humo de cigarro y aero-alérgenos, entre otros es parte del funcionamiento habitual de este epitelio. Sin embargo, un complejo sistema de defensa son las barreras epiteliales, que funcionan activamente contra las infecciones (Diamond y cols., 2000).

El movimiento sincrónico de los cilios de las células ciliadas desplaza el moco hacia la faringe, donde se deglute o se expectora mediante fenómenos como estornudos o tos. Las secreciones nasales atrapan mecánicamente a los microorganismos, ejercen una acción antimicrobiana y previenen la unión de los patógenos a las células del tracto respiratorio superior. Este es el mecanismo básico de defensa del tracto respiratorio y se conoce como clearance mucociliar o transporte mucociliar (TMC) (Cohen y cols., 2006).

2. Transporte mucociliar y frecuencia de batido ciliar en el epitelio respiratorio.

El TMC es un componente esencial del sistema respiratorio y está diseñado para remover de las vías aéreas el moco, siendo el primer mecanismo de defensa frente a las partículas inhaladas que quedan depositadas en él. Esencialmente, dos factores determinan la velocidad y eficiencia del TMC sobre la superficie del epitelio: La frecuencia de batido ciliar (FBC) y la actividad coordinada de los cilios (Cohen y cols., 2006).

En el epitelio respiratorio, especialmente en la tráquea, las células ciliadas son más abundantes (80%) que las secretoras (20%) y presentan una FBC basal espontánea, la cual se ha reportado que varía de 6 a 15 Hz dependiendo de la especie y la localización anatómica del epitelio ciliado en estudio (Nakahari y cols., 2007). En cultivos de epitelio ciliado nasal humano la FBC basal está en el rango de los 9 Hz (Morse y cols., 2001) y en cultivos de epitelio respiratorio de ratón la FBC se encuentra en el rango de los 13 Hz.

La velocidad de transporte mucociliar se determina predominantemente por la FBC que está regulado por factores extrínsecos e intrínsecos, tales como la viscosidad del moco (Van der Baan y cols., 2000). Cuando hay inflamación, la mucosa respiratoria típicamente responde aumentando la cantidad de moco secretado, debido a las células caliciformes y la hiperplasia de la glándula submucosa y la hipertrofia, un fenómeno también conocido como hiperreactividad secretora (Rubin y cols., 2002). Además, la inflamación causa la pérdida de las células y la función ciliar, la destrucción de la capa

de agente tensioactivo por fosfolipasas las vías respiratorias, y la alteración de las propiedades biofísicas de la mucosidad (King y cols., 2002; Restrepo y cols., 2007). En el caso de pacientes asmáticos, una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, el TMC se ve alterado (Daviskas y cols., 2005). Esta disminución del TMC, conduce a acumulación de mucosidad en las vías respiratorias que causa la obstrucción, la colonización bacteriana e infecciones recurrentes.

Existe un relación entre la FBC y el TMC, se ha observado que un pequeño incremento en la FBC (16%) se traduce en un importante incremento en la velocidad de transporte mucociliar (56%) (Seybold y cols., 1990).

3. Mecanismo de regulación de la FBC en el epitelio respiratorio: participación de ATP extracelular.

Una importante herramienta para el estudio de las señales, estímulos y mecanismo de acción que regulan la actividad del batido ciliar, fue la introducción de un método que permite obtener monocapas de células ciliadas (Verdugo y cols., 1980). De esta manera, ha sido posible establecer como señales químicas producidas localmente por los epitelios, como el adenosin trifosfato (ATP) y el óxido nítrico (NO), pueden modificar la actividad ciliar del epitelio respiratorio (Hayashi y cols., 2005; Li y cols., 2000).

El ATP, descubierto en 1929 y que fue propuesto principalmente como el factor de transferencia de energía en la célula (Lipmann, y cols., 1941). Posteriormente, se ha demostrado su importancia y participación en otros procesos como la regulación de la actividad ciliar (Saano y cols., 1992). Evidencias experimentales han demostrado que las

células ciliadas respiratorias, específicamente de la tráquea de ratón, incrementan su FBC en respuesta a concentraciones micromolares de ATP en el medio extracelular (Hayashi y cols., 2005). Evidencias experimentales de nuestro laboratorio, muestran que las células ciliadas responden a concentraciones nanomolares de ATP con incrementos significativos en la FBC.

La concentración basal de ATP en el intracelular varía entre 3-10 mM (Beis y cols., 1975; Bours y cols., 2006), en cambio la concentración de ATP extracelular es aproximadamente 10 nM, en condiciones de reposo. Por lo tanto, cualquier evento que tenga efecto sobre la membrana plasmática o canales específicos, puede provocar la liberación de ATP desde la célula debido a un gradiente de concentración favorable. Se ha establecido que todas las células eucarióticas liberan ATP en condiciones normales y patológicas (Corriden y cols., 2010). En los epitelios mucociliados, el ATP puede provenir al menos de dos fuentes: 1) secreción por exocitosis de gránulos de células secretoras (Verdugo y cols., 1991; Okada y cols., 2013) y 2) liberación de ATP desde las propias células epiteliales (Button y cols., 2007; Schwiebert y cols., 2003). El ATP es liberado de las células epiteliales al espacio extracelular a través de distintos canales de membrana, dentro de los que se pueden citar: los canales reguladores de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC), receptores P2X7, conexinas y panexinas (Cotrina y cols., 1998; Suadicani y cols., 2006).

El hemicanal Panx1, está relacionado a la liberación de ATP desde distintos tipos celulares y tejidos (D'hondt y cols., 2011), como en los condrocitos donde la liberación

de ATP mediada por Panx1 controla la proliferación y diferenciación celular. La apertura del este canal en la membrana es mediado por diversos estímulos como despolarización de membrana (>-40 mV), estimulación mecánica e incrementos en las concentraciones intracelulares de Calcio (Ca^{2+}) (Bao y cols., 2004; Locovei y cols., 2006). Se ha observado que Panx1 media la liberación de ATP en condiciones de stress activado por condiciones hipotónicas en epitelio de tráquea de ratón, liberación que depende del canal TRPV4 y de incrementos en Ca^{2+} intracelular (Seminario-Vidal y cols., 2011).

Una vez que el ATP es liberado al medio extracelular es reconocido por receptores purinérgicos del tipo P2, los cuales median el incremento de la FBC en respuesta a ATP. Estos receptores están subdivididos en dos familias: P2X, los cuales son canales iónicos y los P2Y los cuales están acoplados a proteína G. Los receptores del tipo P2Y pueden ser estimulados por ATP y también por otros nucleótidos tales como ADP, UTP y UDP. En las células del epitelio nasal humano se ha descrito la presencia funcional de los receptores P2Y2, P2Y6 y P2Y11 (Kim y cols., 2004).

Luego de la unión con su ligando, el receptor P2Y2 activa a la proteína Gq, que activa la fosfolipasa C (PLC) incrementando los niveles de inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol, movilizandando Ca^{2+} de los almacenes intracelulares, activando a la proteína cinasa C (PKC), lo que media el incremento en la FBC (Barrera y cols., 2004). En cultivos de epitelio de tráquea de ratón se estableció que este movimiento de Ca^{2+} también activa la vía del NO, la cual induce la activación de la proteína cinasa G (PKG) (Uzlaner y cols., 1999).

Los receptores purinérgicos P2X, son canales catiónicos dependientes de ligando. Estos canales poseen 2 regiones transmembrana con un dominio largo en forma de loop extracelular, en el cual 10 residuos de cisteínas son altamente conservados. El segmento N y C terminal se ubican en el intracelular (Burnstock y cols., 2007). Los miembros de esta familia de receptores son 7: P2X1-P2X7, todos ellos responden a ATP. En las vías respiratorias se ha descrito la expresión de los receptores P2X4 y P2X7 (Kim y cols., 2004; Hayashi y cols., 2005; Ma y cols., 2006).

P2X7R posee características únicas dentro de su familia, una de ellas es ser el único receptor de la familia P2X que responde a otros estímulos además de ATP, como por ejemplo el péptido LL37 (Elsner y cols., 2004). La activación de P2X7R produce la apertura de un típico canal iónico, selectivo para cationes, entre los que se encuentra Ca^{2+} . Posterior a esto, ocurre la apertura de un poro más grande que dependiendo de la célula permite el ingreso de moléculas de hasta 900 Da, entre las que se pueden encontrar glutamato y colina (North y cols., 2002).

El aumento de Ca^{2+} inducido por ATP, que media el incremento en la FBC, puede provenir de almacenes intracelulares o de la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática, lo cual ocurre directamente o después de la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares. Este movimiento de Ca^{2+} , requiere la activación de PLC y participación de IP3 (Barrera y cols., 2004).

Se ha observado que estímulos mecánicos (Hansen y cols., 1993) y en respuesta a estrés hipoosmótico (Kawakami y cols., 2004) ocurre un incremento en la concentración de ATP extracelular, la cual media el incremento de la FBC. Recientemente se ha

establecido en macrófagos, microglías y en epitelio respiratorio (Ferrari y cols., 1997; Craddick y cols., 2012) que Lipopolisacárido (LPS) un componente de la pared de bacterias Gram negativas, provoca incrementos en la concentración de ATP extracelular, desconociéndose el mecanismo involucrado.

4. Contaminantes ambientales y actividad ciliar en las vías respiratorias.

Durante la inspiración muchos microorganismos y sustancias potencialmente dañinas quedan depositados en la superficie del tracto respiratorio. El primer mecanismo de defensa es el sistema inmune innato, quien es el encargado de proporcionar defensa inmediata contra la infección, siendo las barreras epiteliales un componente importante de esta respuesta (Diamond y cols., 2000).

En las vías respiratorias se ha observado que factores ambientales como partículas contaminantes, alérgenos, metales, gases, virus, bacterias, etc., alteran el TMC, ya sea por la alteración de la FBC o por cambios en la viscosidad del moco, lo cual puede incrementar los riesgos de infecciones. Por ejemplo, la exposición a SO₂ un gas contaminante, afecta la FBC y disminuye el TMC de manera dosis dependiente, en epitelio respiratorio ciliado de cobayo (Knorst y cols., 1994).

La exposición a contaminantes ambientales como las nano partículas produce inflamación de las vías respiratorias (Ferin y cols., 1992). Estudios epidemiológicos han indicado que la exposición a material particulado está ligado a incrementos en la mortalidad y a patologías respiratorias (Peters y cols., 1997, Abbey y cols., 1999).

Se ha observado que contaminantes de tipo bacteriano, como filtrados de cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pneumoniae* inhiben la FBC en el epitelio nasal humano (Wilson y cols., 1987, Feldman y cols., 1990), o con piocianina un compuesto redox producido por *Pseudomonas aeruginosa*, enlentece la FBC en el epitelio nasal humano, lo cual se asocia a una disminución de ATP intracelular, siendo ATP la energía esencial para el batido ciliar (Kanthakumar y cols., 1993). También se ha observado que citoquinas proinflamatorias, como interleuquina 1 β (IL-1 β) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α), incrementan la FBC en humanos, por un mecanismo dependiente de NO (Jain y cols., 1995, Rhee y cols., 1999, Alberty y cols., 2006). Dentro de los contaminantes ambientales habituales se encuentra LPS (Roy y cols., 2003), no existiendo evidencia hasta ahora de efectos de LPS a corto plazo con la FBC y el TMC, ni el mecanismo que podría estar involucrado.

5. LPS, componente de la pared bacteriana.

5.1 Características generales y estructura.

El LPS, también conocido como endotoxina, es un polímero complejo el cual forma parte mayoritaria de la membrana externa de bacterias Gram negativas, muchas de ellas relacionadas a enfermedades respiratorias: *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila* y *Pseudomonas aeruginosa*. El término endotoxina fue primeramente utilizado por el microbiólogo alemán Richard Pfeiffe, el cual lo utilizó para describir un componente de las bacterias que era capaz de producir fiebre y otros efectos inflamatorios (Beutler y cols., 2001).

La estructura del LPS puede dividirse en tres regiones: Lípido A, núcleo o región “core” y el antígeno O. Es un polímero complejo con restos de ácidos grasos como parte lipófila y cadenas características de oligosacáridos y polisacáridos. El Lípido A es altamente hidrofóbico y es la sección endotóxicamente activa del LPS. Está típicamente formado por un disacárido (β -D-GlcN-(1-6)- α -D-GlcN) que tiene dos grupos fosfatos en las posiciones 1 y 4', y posee dos unidades de N-acetilglucosamina unidas por enlace β a los carbonos 1 y 6. A esta estructura se le pueden unir hasta 4 cadenas de ácidos grasos, que varían en número, longitud y saturación. (Erridge y cols., 2002).

La región “core”, que es altamente conservada entre cepas y especies, consiste en una repetición y heptosa (Erridge y cols., 2002). El antígeno O está unido al núcleo oligosacárido y comprende el dominio más externo de la molécula de LPS, por lo que se encuentra expuesto en la superficie más externa de la célula bacteriana y como consecuencia es el objetivo de hexosas comunes como glucosa y galactosa, una serie de azúcares poco comunes como Kdo de reconocimiento por anticuerpos del huésped (Raetz y cols., 2002).

5.2 LPS, vías de acción.

El reconocimiento de la presencia de LPS por las células inmunes tales como monocitos, macrófagos y células epiteliales, ha evolucionado a lo largo de los milenios para proporcionar a los mamíferos un rápido sistema de reacción frente a infecciones Gram negativas. En 1999, Hoshino y cols, establecieron la importancia del receptor

TLR4 en el reconocimiento de LPS, en macrófagos y células B provenientes de ratones deficientes en TLR4.

TLR4, pertenece a la familia de receptores toll like receptors, quienes están involucrados en el reconocimiento de patógenos. La activación de su vía de señalización produce la liberación de citoquinas relacionadas con procesos inflamatorios como IL-8 y con el reclutamiento de otros componentes del sistema inmune. Las vías respiratorias expresan los receptores TLR y están funcionalmente activos (Sha y cols., 2004, Wang y cols., 2007).

La familia de los receptores TLR, es una familia de proteínas transmembrana cuyo dominio citoplasmático es llamada secuencia TIR por ser un dominio compartido con el receptor de Interleuquina 1 (IL-1R) (Imler y cols., 2004). El dominio TIR contiene tres regiones conservadas llamadas BOX 1, BOX 2 y BOX 3, las cuales están relacionadas con la interacción de los receptores TLR con sus adaptadores o con otros receptores TLR en el caso de receptores que oligomerizan inducidos por la interacción con el ligando, como TLR4 (Xu y cols., 2000). El dominio TIR también está presente en proteínas intracelulares, llamadas adaptadores porque se pueden enlazar a través de este dominio con los receptores TLR, con lo que se inicia la cascada de señalización.

LPS se une en el líquido extracelular a la proteína soluble fijadora de LPS (LBP), posteriormente este complejo LPS-LBP se une a CD14. Una vez que LPS se une a CD14, interactúa con MD-2, quien está físicamente asociado con TLR4 en la superficie celular y confiere la capacidad de respuesta a LPS. MD-2 es por lo tanto un enlace entre TLR4 y LPS (Shimazu y cols., 1999).

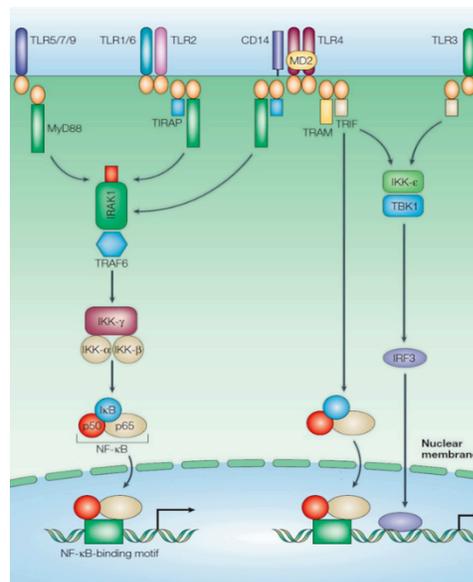
Una vez que ocurre el reconocimiento del ligando por el receptor, este interactúa con distintos adaptadores intracelulares. Los adaptadores principales (MyD88 y TICAM-1/TRIF) de la vía de señalización de los receptores TLR, juegan un rol fundamental en la señalización ya que definen que vía de señalización será activada, dependiendo de qué adaptador sea reclutado por cada receptor TLR.

El principal factor de transcripción activado por la vía de señalización de los receptores TLR es NF- κ B, formado principalmente por dos proteínas p50 y p65. NF- κ B, es un factor de transcripción, el cual se encuentra inhibido en el citoplasma de las células, por proteínas inhibitorias conocidas como I κ B, en el caso de la vía de señalización de los receptores TLR. El complejo inhibitorio de NF- κ B recibe el nombre de cinasas inhibitorias de NF- κ B (IKK) (Vallabhapurapu y cols., 2009). TAK1, una ubiquitina, fosforila a IKK y permite la separación de NF- κ B del complejo inhibitorio y así traslocar al núcleo donde se une e induce a sus genes blanco, que son responsable de la producción de interleuquinas relacionadas con la respuesta inflamatoria. Los niveles de NF- κ B fosforilado p-p65, son un indicador indirecto de su activación (Traenckner y cols., 1995). TAK1 puede interactuar con la cascada de las MAPKs activando dos proteínas principales (p38 y JNK), quienes activan al factor de transcripción AP-1, que al igual que NF- κ B, da lugar a la producción de citoquinas pro inflamatorias.

Dos grupos de investigadores, con pocos meses de diferencia, reportaron la presencia de un adaptador involucrado en la vía de la señalización de los receptores TLR, independiente de MyD88, que fue denominado TICAM-1 (Oshiumi y cols, 2003) y TRIF (Yamamoto y cols., 2002). Con el desarrollo de ratones deficientes en TRIF, se

estableció su importancia en las vías de señalización de TLR3 y TLR4 y en la producción de IFN- β . En ratones deficientes de MyD88 y de TRIF, se perdió la activación de NF- κ B, en respuesta al ligando de TLR4 (Yamamoto y cols., 2003).

Una vez activado el sistema con la unión del ligando, TRIF forma un complejo con una kinasa asociada a la familia de las TRAF (TBK1), con un homólogo de IKK (IKK ϵ) y con el factor 3 regulatorio de interferón (IRF3) o con el factor 7 regulatorio de interferón (IRF7), lo que conduce a la activación de IRF3 o de IRF7, quienes se dirigen al núcleo induciendo principalmente la producción de IFN- β (Fitzgerald y cols., 2003). En la vía de señalización de TLR3, TRIF activa a NF- κ B, debido a su unión al complejo TRAF6-TAK1-TAB2 y de este modo activa a IKK (Jiang y cols., 2004) (Ver Fig. 1).



Vía de señalización TLR (Akira y cols, 2004)

Existe otra familia de receptores que participan en el reconocimiento de patógenos intracelulares, la familia de receptores con dominio NOD: NLR. La familia NLR, está formada por receptores intracelulares que posee 23 miembros descritos en humanos y 34 en ratones (Bryant y cols., 2009).

Los receptores NLR pueden activar caspasas inflamatorias mediante la activación de inflamasomas o activar directamente a NF- κ B y de este modo activar la producción de citoquinas inflamatorias (Martinon y cols., 2007). Los inflamasomas son complejos multiproteicos de gran peso molecular (700 KDa) que están relacionados con la inducción de respuestas inflamatorias.

Existe información reciente que muestra que los inflamasomas también pueden ser activados por la vía de señalización TLR. Por ejemplo, la activación de TLR4 por LPS induce incrementos en los niveles del inflamasoma NLRP3 de manera dependiente de MyD88 (Embry y cols., 2011). Lo que relaciona la activación de la vía TLR no solo efectos mediados con la activación de NF- κ B.

Aparte de la vía de señalización mediada por TLR4, existe evidencia en la literatura que indica que LPS también tiene efectos medidos por la participación del receptor purinérgico P2X7 (Ferrari y cols., 1997).

Se ha observado que LPS induce liberación de ATP y producción de citoquinas luego de 24 horas de incubación. Este proceso estaría mediado por la activación de P2X7R, debido a que la liberación de ATP es inhibido con el antagonista específico de P2X7R, ATP oxidado (oATP) (Ferrari D y cols., 1997). También se ha observado incrementos en la liberación de ATP luego de la exposición a LPS, en periodos cortos de

exposición (Sha Q y cols., 2004). LPS además se ha visto relacionado con incrementos rápidos en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} en macrófagos (Seabra y cols., 1998), lo que podría estar relacionado con la activación y participación de los receptores P2X7.

Estudios recientes han demostrado que LPS interactúa directamente con P2X7R. En 2001, se estableció que P2X7R posee en su dominio C-terminal varios motivos aparentes de interacción proteína-proteína y proteína-lípido, dentro de los cuales destaca un sitio conservado de interacción con LPS, el cual, cuando es bloqueado impide que LPS inicie su cascada de señalización en macrófagos (Denlinger y cols., 2001). Pero recientemente se ha descrito que LPS puede modular la actividad de P2X7R. En el estudio realizado en células HEK293 que no expresan TLR4, LPS es incapaz de inducir alguna actividad relacionada con la activación de P2X7R (Leiva-Salcedo y cols., 2011).

La conversión de P2X7R desde un típico canal iónico a un poro que permite el ingreso de moléculas de gran tamaño (hasta 900 Da) luego de su activación (Di Virgilio y cols., 1995) ha sido motivo de estudio. Dentro de las hipótesis, se plantea que P2X7R podría activar a Panx1, la cual podría actuar como una vía de ingreso a estas moléculas más grandes y también como una vía de salida de moléculas como ATP (Kanneganti y cols., 2007).

Dentro de la evidencia que relaciona a Panx1 con P2X7R y la formación del poro, se ha observado que la inhibición de Panx1 bloquea la captación de colorante que se utiliza para evaluar la activación funcional del poro, pero no inhibe la corriente catiónica relacionada con la activación de P2X7R (Pelegrin y cols., 2006). Se propone a

Ca^{2+} como la señal que media la interacción entre P2X7R y Panx1, debido a que la apertura del poro es dependiente de incrementos Ca^{2+} (Faria y cols., 2005).

La interacción de LPS con P2X7R o la participación de inflamasomas activados por TLR4 podrían provocar la apertura de este canal por donde podría ingresar Ca^{2+} y así activar a Panx1, permitiendo su apertura y así mediar, la salida de ATP desde la célula. El incremento de ATP en el espacio extracelular podría relacionarse con efectos sobre la FBC. A pesar de la evidencia que relaciona a LPS con incrementos en los niveles intracelulares de Ca^{2+} y liberación de ATP, no se ha establecido en el epitelio respiratorio los efectos de LPS sobre el mecanismo de regulación de la FBC basal por ATP extracelular, ni la posible participación de P2X7R y Panx1 como el posible mecanismo de acción en epitelio respiratorio, por lo que planteamos:

IV. HIPÓTESIS

LPS aumenta la liberación de ATP mediada por Panx1-P2X7R, que controla la actividad ciliar en las vías respiratorias de ratón.

De acuerdo a la hipótesis, los objetivos son:

V. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el efecto de LPS sobre la liberación de ATP y la actividad ciliar en el epitelio respiratorio de ratón.

V.i OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar el efecto de LPS sobre la FBC en cultivos primarios de células ciliadas de epitelio respiratorio.
2. Determinar el efecto del LPS sobre el mecanismo de liberación de ATP en células ciliadas del epitelio respiratorio.
3. Estudiar las vías de señalización asociadas al efecto de LPS, en células ciliadas del epitelio respiratorio.

VI. MATERIALES Y METODOS

i) MATERIALES

Lipopolisacarido (*Escherichia coli* serotype 055:B5), Carbenoxolona, Suramina, ATP Oxidado, fueron obtenidos de Sigma Aldrich, Inc. (St. Louis MO, EEUU). GF109203X fue obtenido de Tocris Bioscience (MO, EEUU). Probenecid y BAPTA-AM, fueron obtenidos de Invitrogen (CA, EEUU). FURA 2-AM de Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

Todos los reactivos de cultivo celular fueron de grado ultrapuro: NaCl, KCl, Glucosa, NaHPO₄, NaH₂PO₄, KH₂PO₄ obtenidos de Merck (NJ, USA). MgCl₂, CaCl₂, antibióticos Neomicina y penicilina, vitaminas, Piruvato de sodio, aminoácidos esenciales y no esenciales, Rojo fenol y Hank's, fueron obtenidos de Sigma Aldrich, Inc. (MO, EEUU).

ii) METODOS

1. Animales:

Se utilizarón ratones machos adultos (6 a 8 semanas) de la cepa BALB/c, con un peso entre 25-35 gr, obtenidos del vivero de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los animales se mantuvieron bajo condiciones de iluminación (ciclos de luz-oscuridad de 14-10 horas respectivamente) y temperatura (23°-25°C) controladas. Los animales recibieron alimento y agua *ad libitum*. Todos los protocolos de manejo de animales utilizados en esta tesis, fueron aprobados por la Comisión de Bioética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

2. Cultivos primarios de epitelio respiratorio de ratón:

Los experimentos fueron realizados en cultivos primarios de células ciliadas de tráquea de ratones BALB/c. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y las tráqueas fueron removidas y posteriormente lavadas con DMEM-F12 suplementado con antibióticos (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomocina, 100 U/mL penicilina G, 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anfotericina B) para remover la sangre del tejido. Luego, el tejido se colocó en una solución de DMEN-F12 suplementado con antibióticos y pronasa 0.05% durante 30 minutos a 37°C y 5% CO₂. El tejido fue transferido a una solución de DMEN-F12 con 5% de suero fetal bovino (SFB), donde el epitelio fue mecánicamente removido. Posteriormente, el epitelio fue cortado en pequeñas piezas de 2-4 mm², los cuales fueron lavados con una solución de Hank's esteril y colocados en el medio NHS (composición en mM: NaCl 137; KCL 5.09; Na₂HPO₄ 1.14; KH₂PO₄ 0.18; MgCl₂ 0.923; CaCl₂ 0.91; NaHCO₃ 4.07; glucosa 21.5 y glutamina 0.2: suplementada con 1% vitaminas, 1% aminoácidos esenciales, 1% aminoácidos no esenciales, 1% piruvato y antibióticos, 0.2 mg/mL neomicina y 0,12 mg/mL penicilina, pH 7.2-7.4). Las piezas de epitelio fueron puestos en cubreobjetos tratados con 0.1% de gelatina y colocados en una cámara de rose. Los explantes fueron cubiertos con una membrana de diálisis estéril (Spectra, MWCO 12-14,000; #25218-468, VWR Scientific). Las cámaras de rose fueron llenadas con medio NHS suplementado con un 10% de suero de caballo (pH 7.2-7.4) y puestos en un incubador a 37°C por al menos 4 días, hasta que la monocapa de células ciliadas presente una actividad ciliada espontánea. El medio de cultivo de cada cámara fue renovado cada 48 horas (Gonzalez y cols, 2007).

Los ratones knockout para Panx1 fueron amablemente donados por el Dr. Juan Carlos Sáez. La disrupción del gen Panx, fue descrita por Anselmi y cols., 2008. Se realizó el mismo protocolo para la realización de cultivos primarios.

3. Determinación de la frecuencia de batido ciliar:

La FBC fue medida utilizando Sisson-Ammons Video Analysis (Sava System). El cual utiliza una cámara de video que graba el movimiento de los cilios directamente en la memoria del computador (Sisson y cols., 2003). Para los registros de la FBC se utilizó un microscopio invertido (Nikon Diaphot, Nikon, Japón), con un lente objetivo de 40X acoplado a una cámara de video de alta velocidad (Basler scA640) (100 fotos/s). Bajo condiciones de temperatura constante (35°C), mediante un sistema de incubación acoplado al microscopio (Nikon incubator NP-2).

Los cultivos celulares una vez retirada la membrana de diálisis, se lavaron con medio Hank's (Sigma H1387) más NaHCO₃, con un pH 7.3, por 3 veces, y luego se dejaron estabilizar por 10 minutos dentro de la cámara a 35°C. Posteriormente se seleccionó un área con 5 a 20 células ciliadas y se realizaron mediciones durante un periodo de tiempo control de 5 minutos (en Hank's), para establecer la FBC basal del explante escogido. Luego, se le agregó al cultivo la señal química definida para cada protocolo ó el vehículo para cada caso (tratamiento control) y se registró la FBC por 20 minutos más (tiempo adecuado para obtención del efecto máximo de las señales químicas estudiadas).

Algunos cultivos se incubaron entre 10-40 minutos con distintas drogas de interés, antes de registrar la actividad ciliar frente a la señal química en estudio. Esta incubación se realizó a 35°C, con la droga disuelta en DMSO o Hank's.

Los resultados obtenidos de la FBC (cada minuto de registro) se expresaron como porcentaje de cambio respecto de la FBC control, tomando como control el promedio de la FBC en condiciones basales.

4. Medición de movimiento de microesferas en epitelio de tráquea:

Los ratones fueron anestesiados por inyección de Ketamina (50 mg/kg) y Xilaxina (3.33 mg/kg). El tórax fue abierto, y la glándula submandibular y los músculos infrahioideos, fueron removidos. La tráquea se cortó caudal a la laringe y craneal a la bifurcación. Luego, la tráquea fue removida y transferida a una placa de cultivo, donde con ayuda de unas tijeras fue abierta para exponer la superficie epitelial hacia arriba y se fijó con dos agujas a la placa de cultivo y sumergido en Hank's. Luego, 1 millón de microesferas (MEs) de poliestireno no iónico (diámetro medio de 3,9 μm , N° de catálogo: N37458, Invitrogen) se añadió a la superficie epitelial de la tráquea. Se tomaron imágenes en el modo de campo brillante utilizando un objetivo de inmersión en agua 40x (Olympus). El transporte de las MEs fue registrado y las velocidades de los movimientos se calcularon utilizando el software Image J antes y después del tratamiento (König y cols, 2009).

5. Administración Intranasal de LPS:

Los ratones se expusieron por vía intranasal a 10 µg/mL de LPS disueltos en PBS, se administró un volumen total de 40 µL, en 4 dosis de 10 µL, durante 1, 3, 6, 9, 18 y 24 horas. La administración intranasal fue realizada bajo anestesia, con 50 mg/kg de ketamina y xilamina 3.33 mg/kg, después las tráqueas fueron removidas de los animales y utilizadas para experimentos posteriores. (Archer y cols, 2004).

6. Western Blot:

Para la realización de los western blot, se utilizaron tráqueas completas de ratón. Luego de cada tratamiento, y posterior al sacrificio de los animales, siguiendo el protocolo las tráqueas fueron extraídas y homogeneizadas en buffer RIPA (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,2, 0,1% SDS, 1.0% Tritón X-100, 1.0 % Deoxicolato, 5 mM EDTA) con inhibidores de proteasas (Roche). Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Lowry. Luego las proteínas fueron cargadas en un gel de acrilamida-bisacrilamida en condiciones desnaturalizantes y separadas por electroforesis, en una cámara para electroforesis. En cada pocillo del gel se cargó una cantidad de 50 µg de proteínas total, que fue controlada con posterioridad mediante inmunodetección de una proteína de expresión no variable bajo las condiciones del tratamiento, control de carga β-actina. Las proteínas que fueron separadas por electroforesis, posteriormente fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa y las uniones inespecíficas de las proteínas fueron bloqueadas con una

solución de leche sin grasa 5% en TBS-1X por 1 hora a temperatura ambiente, en agitación.

Luego, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente (Para NF- κ B p-p65: 3033S Cell Signaling, para TLR4: Abcam HTA125 y para β -Actina: Sigma, A5316). Posteriormente las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario adecuado para el anticuerpo primario utilizado, conjugado a HRP. La reacción fue revelada por quimioluminiscencia usando el kit ECL Western Blot Analysis System (NEN, Western lightning, Perkin Elmer).

7. Ensayo liberación ATP:

Los cultivos fueron abiertos, posteriormente lavados tres veces con Hank's y luego equilibrados por un período de 15 minutos a 35°C. Previo a la adición de drogas y tiempo después de la adición, 100 μ L de medio fue recolectado de cada cultivo, posteriormente fue calentada por 1 minuto a 95°C inmediatamente, para evitar la degradación de ATP, posteriormente las muestras fueron congeladas a -90°C. La cuantificación de ATP fue realizada siguiendo las instrucciones del kit Enliten ATP Assay kit (Promega). En una placa de 96 pocillos, 100 μ L de muestra, blanco o solución estándar de ATP y 100 μ L de luciferin luciferasa fue agregado a cada pocillo. El ensayo fue cuantificado por un luminómetro (Luminoskan Ascent 2.5; Thermo LabSystems). Los datos fueron expresados como nM de ATP por superficie de área de tejido (cm^2) (Zhao y cols, 2012).

8. Ensayo captación colorante:

Los cultivos fueron abiertos, posteriormente lavados tres veces con Hank's y luego se dejaron en reposo durante 15 minutos. Posteriormente se le agregó el tratamiento y posteriormente Bromuro de Etidio (BrEt), por un máximo de 15 minutos. Luego, se retiró el BrEt y los cultivos fueron puestos en hielo, y a cada uno se le agregó Paraformaldehído al 4% en PBS, durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo, los cultivos fueron lavados con PBS dos veces, luego se les agregó PBS con Tritón 1%, durante 10 minutos. Posteriormente se realizaron 2 lavados cada 5 minutos con PBS. Luego, a los cultivos se les agregó Dapi en agua destilada (1:5000), durante 10 minutos. Posteriormente fueron lavados 2 veces con PBS frío durante cinco minutos y luego montados en fluoromount.

La intensidad de fluorescencia del BrEt, intercalado en los ácidos nucleicos fue examinado por epifluorescencia, con una excitación 530-550 nm y emisión de 590 nm.

9. Determinación de los niveles de calcio libre intracelular:

Se realizó la técnica de imagenfluorometría y se obtuvieron imágenes fluorescentes las cuales fueron analizadas. Los cultivos primarios de epitelio respiratorio se incubaron, por 1 hora a 37°C, con una concentración de 1.5 μM del indicador fluorescente de Calcio Fura-2AM. Luego, los cultivos fueron lavados 3 a 4 veces con medio Hank's, para remover el exceso de fluorómetro no incorporado a las células, y posteriormente se realizaron los registros de los niveles de Ca^{2+} libre intracelular. Los cultivos fueron montados en un microscopio de fluorescencia acoplado a un sistema de

análisis de imágenes digitales (Metafluor, Universal Imaging Corporation, v6.1). Los cambios en los niveles de calcio intracelular, fueron obtenidos mediante la adquisición de dos imágenes fluorescentes en el mismo campo óptico con excitación a dos longitudes de onda diferente (340 y 380 nm) y con detección a una longitud de onda de 510 nm. El sistema de análisis computacional permite obtener secuencias de imágenes a partir de la razón de emisión a 340/380, las que fueron analizadas con el software MetaMorph (Universal Imaging Corporation, v6.1). Esta técnica es similar a la descrita en 1989 por Villalón y Cols.

Los niveles basales de Ca^{2+} se midieron durante 5 minutos, luego se le agregó al cultivo la señal química definida para cada protocolo y se continuó registrando por un periodo adicional de 20 minutos. Como control positivo se utilizó ATP (10 μM), agonista que modifica los niveles de Ca^{2+} intracelular.

10. Inmunofluorescencia:

Se realizó inmunofluorescencia a partir de cortes y cultivos de epitelio de tráquea de ratón para detectar la presencia de Panx1, TLR4 y P2X7R (Abcam ab77413). Se extrajeron las tráqueas de ratones BALB/c y se fijaron en una solución de paraformaldehído (PAF) al 4% en PBS por 24 horas. Para ayudar a disolver el PAF se agregó NaOH y luego se ajustó el pH a 7. Los órganos ya fijados se llevaron a una batería de deshidratación etanol/xilol, que consiste en etanol 70% por 1 hora, etanol 80% por 1 hora, etanol 90% por 1 hora, etanol 100% I por 1 hora y etanol por 100% II 12 horas para pasar por una solución de Xilol I durante 1 hora, y Xilol II por 12 horas.

Luego de la deshidratación, los tejidos fueron incluidos en parafina y cortados en un micrótomo a 8 μm . Los cortes obtenidos fueron recolectados en portaobjetos xilanizados y secados en una platina por 4 horas. Luego del secado los portaobjetos fueron rehidratados en una batería de desparafinización que consiste en Xilol I por 15 min, Xilol II por 10 min, Etanol 100% I por 5 min, Etanol 100% por II 5 min, Etanol 90% durante 3 min, Etanol 80% por 3 min y Etanol 70% durante 3 min.

Los portaobjetos, posteriormente, fueron mantenidos en PBS para llevarlos a ebullición en Citrato de Sodio 0,01 M pH 6,0, a fin de exponer los sitios de unión al anticuerpo. Se esperó por 10 minutos y se les cambió la solución por Citrato de Sodio frío por otros 10 min seguido de un bloqueo de los sitios de reacción no específicos con PBS/BSA 3% por 1 hora a 25°C. Luego, los portaobjetos fueron lavados 3 veces con PBS por 5 min e incubados con anticuerpos contra Panx1 (1:200), TLR4 (1:200) y P2X7R (1:100) disueltos en PBS/BSA 3%, a 4°C en una cámara húmeda toda la noche. Después de lavados extensivos con PBS, las muestras fueron incubadas con un anticuerpo secundario Alexa Fluo® 488 anti-rabbit (A11008) o Alexa Fluo® 488 anti-goat (A21202), (Life Technologies, 1:2000) dependiendo del anticuerpo primario, disueltos en PBS/BSA 3% por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente fueron lavadas 3 veces con PBS, se les agregó 50 μL de una solución de DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, D-3571) disuelto en agua destilada (1:5000) o Yoduro de Propidio (5 μM) por 15 min y nuevamente fueron lavadas 3 veces con PBS. Finalmente se montó el cubreobjetos en un medio de montaje Fluoromont. Las muestras fueron observadas bajo un microscopio de fluorescencia Bx51 (Olympus) y fotografiadas.

En la inmunofluorescencia a partir de cultivo de explantes de epitelio de tráquea de ratón, fueron fijados con PAF al 4% por 1 hora a 4°C y los sitios de unión al anticuerpo fueron expuestos mediante la incubación de las células con Tritón X-100 1% por 10 min. El resto del protocolo fue igual al realizado a partir de cortes de tejido.

11. Extracción de ARN y RT-PCR:

Para extraer el ARN desde los cultivos, se añadió 500 µL de TRIZOL. Luego se añadió 100 µL de cloroformo al tubo y se agitó fuertemente. Se procedió a centrifugar por 15 minutos a 12000 g en una centrífuga refrigerada. Se obtuvo la fase acuosa de la solución (fase transparente) la cual se traspasó a otro tubo estéril. A este nuevo tubo se le agregó 250 µL de isopropanol frío y se dejó incubar en frío por 10 minutos para precipitar el ARN. Se centrifugó nuevamente a 12000 g por 10 minutos. Se botó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol frío al 70%, se agitó fuertemente. Se centrifugó nuevamente a 7500 g por 5 minutos. Luego, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente y se agregó agua DEPC hasta que se diluyó completamente. Se cuantificó la concentración y pureza del ARN total calculando la densidad óptica a 260 nm y la razón entre 260nm/280nm, respectivamente, en un espectrofotómetro. Para la retrotranscripción se calculó un volumen de ARN que tuvo 2-5 µg de ARN, y se utilizó el protocolo de la retrotranscriptasa SuperScript® III de invitrogen. Para el RT-PCR se utilizó el protocolo de invitrogen para la Taq polimerasa.

Los partidores utilizados fueron:

TLR4: sense: 5'-TGGATACGTTTCCTTATAAG-3', antisense: 5'-GAAATGGAGGCACCCCTTC-3';

GAPDH: sense: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3, antisense: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3';

El producto de la reacción de PCR fue resuelto en un gel de agarosa al 1%. Como control de técnica se usó GAPDH.

12. Microscopía electrónica de Barrido (MEB)

La MEB se realizó en cultivos de células ciliadas de 9 días. Las células se fijaron con 2% de PFA en PBS, pH 7.2, durante 45 min a 4°C. Luego, el tejido se lavó, se deshidrató en una progresión de concentraciones crecientes de etanol, hasta el 100% de etanol y en el punto crítico se secaron utilizando CPDS Modelo-2002. Las muestras fueron pulverizadas con oro paladio utilizando un equipo de vacío PS10E y fueron observadas con un microscopio de barrido JEOJSM-25 S II.

13. Análisis de los datos:

Los gráficos de los valores experimentales de FBC, en respuesta a las diferentes drogas utilizadas en este estudio, corresponden al área bajo la curva (ABC), (expresada en unidades arbitrarias, U.A), de los cursos temporales de la FBC, luego de aplicar la transformación de arc seno a los datos de FBC expresados en % de la FBC basal.

Las comparaciones estadísticas, entre la ABC de las condiciones experimentales y los respectivos controles, se realizaron utilizando ANOVA y la prueba posterior de Tukey, con el programa GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). El criterio para una diferencia significativa corresponde a un valor de $p < 0.05$ y n indica el número de cultivos analizados.

VII. RESULTADOS

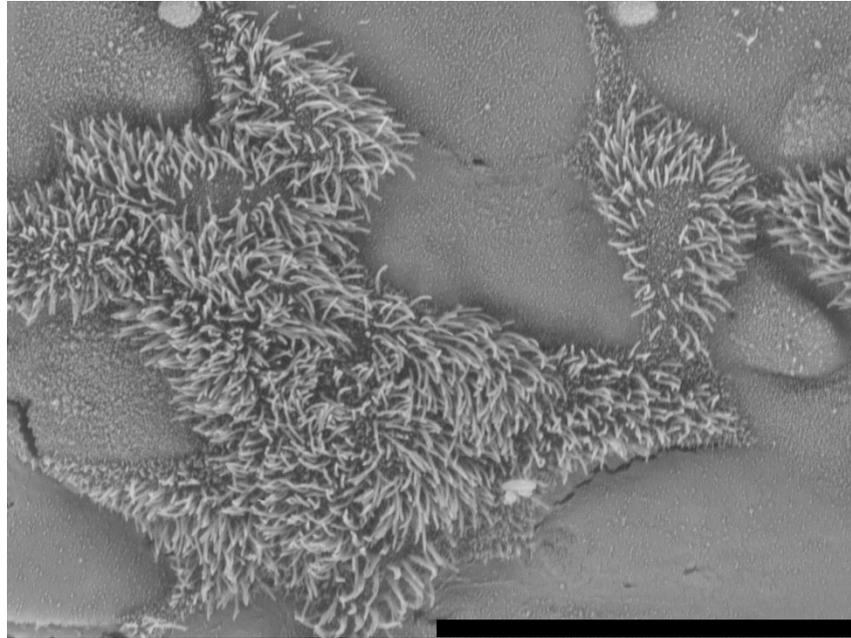
1. Caracterización cultivos primarios de epitelio respiratorio de ratón.

Utilizando una técnica de cultivo modificado a partir de Verdugo y cols., 1980, obtuvimos cultivos primarios que muestran batido ciliar espontáneo con características similares a las del epitelio respiratorio *in vivo*.

Obtuvimos cultivos primarios con monocapas confluentes de células agrupadas en explantes, donde las células ciliadas presentan batido ciliar espontáneo luego de 4-5 días en el cultivo. En las imágenes obtenidas por medio de microscopía electrónica de barrido, se observan los cultivos primarios con monocapas de células ciliadas y con cilios agrupados en el centro de la célula en la superficie apical (Figura 1A). Observamos además la presencia de células no ciliadas (basales y claras) y las células que secretan moco se observan escasamente.

Los cambios en la FBC de las células, fueron detectados por el método Sava Systems (Sisson y cols., 2003), el cual está específicamente diseñado para el video análisis del movimiento ciliar. El programa entrega información sobre la frecuencia ciliar a través del tiempo de un conjunto de células ciliadas en un explante. En la Figura 1B se observa una fotografía de un campo analizado, obtenida desde Sava Systems y un espectro de los puntos en movimiento, en promedio los campos analizados tenían un 25% de células ciliadas. Para el desarrollo de los experimentos de la tesis, fueron eliminados cultivos con puntos mayores a 6000 y menores a 1000, para evitar errores en la determinación de la FBC.

A



30 μm

B

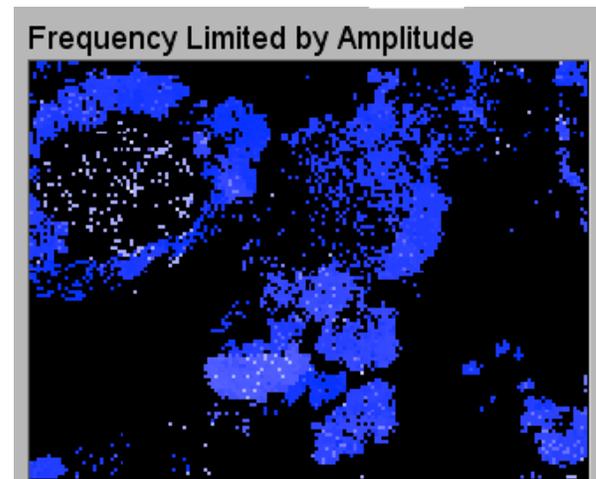
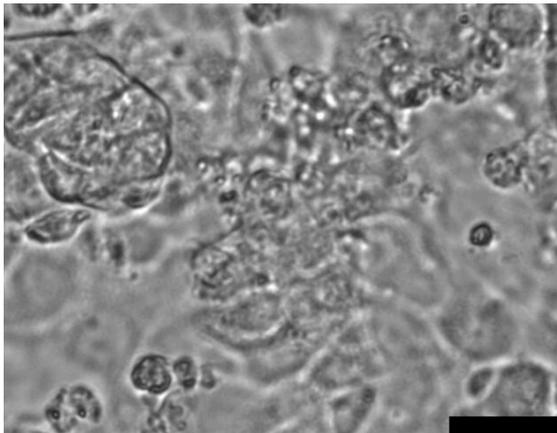


Figura 1. Caracterización cultivos de epitelio respiratorio y técnica para la determinación de frecuencia de batido ciliar.

A) Fotografía de microscopia electrónica de barrido, obtenida de cultivos primarios de células ciliadas de epitelio respiratorio, día 5. Barra 30 μm.

B) Fotografía de cultivo utilizado en la determinación de la FBC, obtenida con el programa Sava Systems. Se observa un espectro de los puntos en movimiento del cultivo. El espectro muestra un promedio de 3820 puntos. 40X. Barra 30 μm.

2. LPS induce un incremento en la FBC, en células ciliadas del epitelio respiratorio.

Se utilizaron cultivos primarios de células ciliadas de tráquea de ratón, expuestos a concentraciones crecientes de LPS, comprendidas entre 0.5 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ y se registraron los cambios en la frecuencia de batido de las células mediante la técnica de Sava System (ver Métodos) durante 20 minutos.

Los resultados obtenidos muestran que LPS induce aumentos en la FBC (Figura 2) en las células ciliadas de cultivos primarios de epitelio respiratorio. En la figura 2A se observa un aumento de la FBC en los cultivos expuestos a LPS con respecto al control. El máximo aumento estable de la FBC se alcanzó aproximadamente a los 15 minutos de exposición a LPS (23.5 \pm 2.5% y 32.3 \pm 2.4% de incremento en la FBC, para 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de LPS, respectivamente). En todas las mediciones se realizó una determinación de la FBC basal durante 5 minutos y luego se agregó el estímulo (LPS) y se continuó con la medición durante 20 minutos más.

La respuesta de LPS en la FBC se graficó como área bajo la curva (expresada en unidades arbitrarias, u.a) de los cursos temporales en respuesta a cada concentración utilizada de LPS, por un período de 20 minutos. Los resultados muestran que las células tratadas con 0.5, 1, 5, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de LPS, presentan una respuesta de 6, 18, 20, 22 y 14 veces mayor (206.24 \pm 92.8, 532.9 \pm 87.5, 585.7 \pm 21.5, 651.8 \pm 11.2 y 432.1 \pm 38.0 u.a, respectivamente) que las células tratadas con Hank's (tratamiento control, 29.0 \pm 13.6 u.a), respuesta que fue significativamente mayor para las concentraciones 1, 5, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ (* p <0.05). La aplicación de una concentración más alta de LPS, 100 $\mu\text{g/mL}$, no causó una respuesta mayor que 10 $\mu\text{g/mL}$, sobre la FBC (432.0 \pm 38.0), Figura 2B.

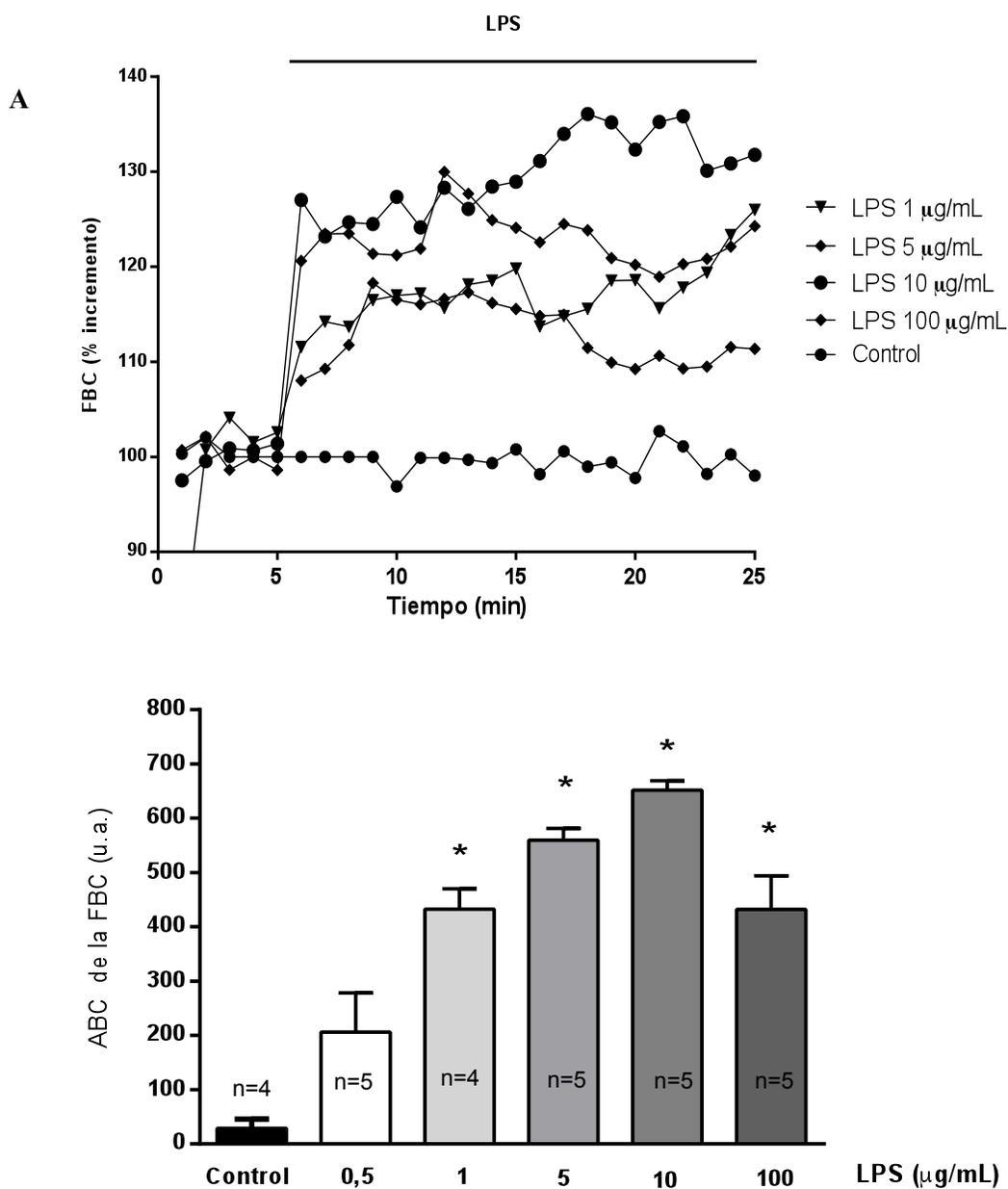


Figura 2. LPS incrementa la FBC en cultivos primarios de tráquea de ratón.

A) Curso temporal del promedio de los cambios de la FBC de células ciliadas, expuestas a 0.5, 1, 5, 10 y 100 µg/mL de LPS (durante 20 min) y control agua nano pura. La línea negra indica el tiempo de exposición a LPS. Se observa un aumento en la FBC, inducido por LPS. El máximo aumento estable de la FBC se alcanzó a los 15 minutos.

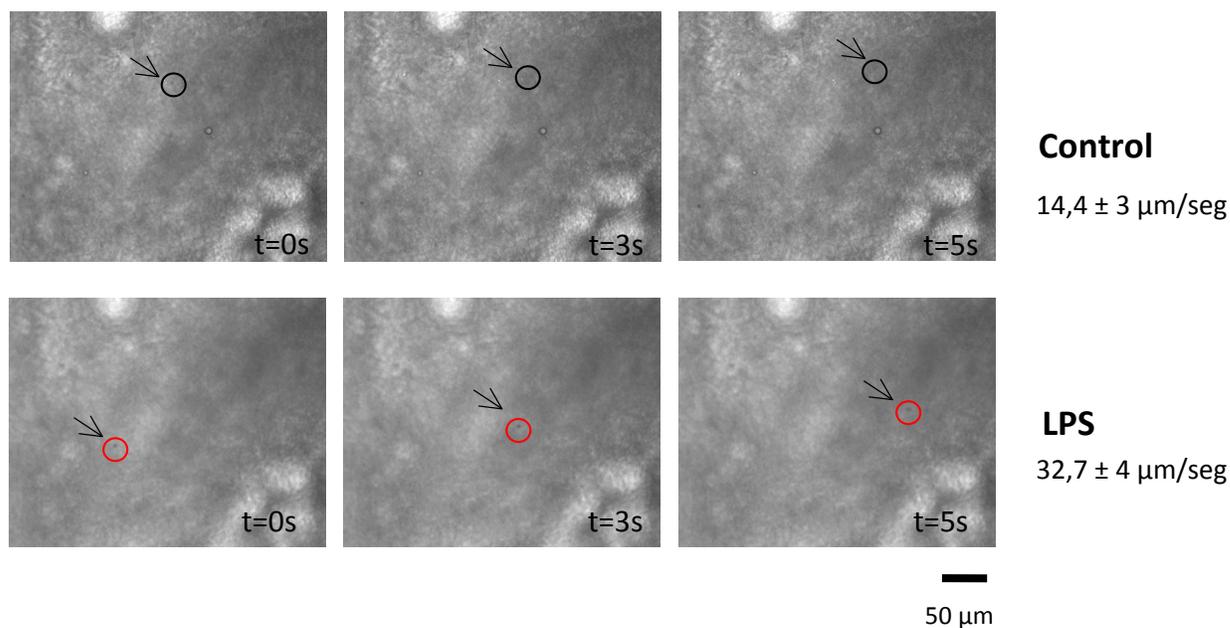
B) Área bajo la curva (expresada en unidades arbitrarias, u.a) de los efectos sobre la FBC de las diferentes concentraciones de LPS (* $p < 0.05$ versus control). La FBC fue determinada con la técnica SAVA system.

3. LPS induce un incremento en el transporte mucociliar de microesferas en tráquea de ratón.

Para determinar el efecto de LPS sobre la velocidad de transporte mucociliar en el epitelio ciliado respiratorio de ratón, se utilizaron tráqueas expuestas a 10 µg/mL de LPS y tráqueas expuestas al vehículo de LPS, en los cuales se evaluó la velocidad de transporte de microesferas de poliestireno (MEs) (ver Métodos).

En la Figura 3A, se muestra una secuencia temporal de imágenes obtenidas de las grabaciones, donde se observa que en el epitelio de tráquea de ratones tratados con LPS 10 µg/mL (n=5), el desplazamiento de las MEs es mayor con respecto a las tráqueas de ratones tratados con el vehículo. A partir de las imágenes se calculó la velocidad de desplazamiento promedio de las microesferas: 14,4±3 µm/seg y 32,7±4 µm/seg, vehículo y tratado con LPS respectivamente. En la Figura 3B, se observa un gráfico de distribución del análisis de las velocidades individuales de las partículas, en ambas condiciones: vehículo y LPS. Al analizar el incremento de la velocidad basal posterior al estímulo (LPS o vehículo), observamos que LPS incrementa un 167 % versus un 16% del vehículo. LPS incrementa la FBC y la velocidad de transporte mucociliar en el epitelio respiratorio de ratón.

A



B

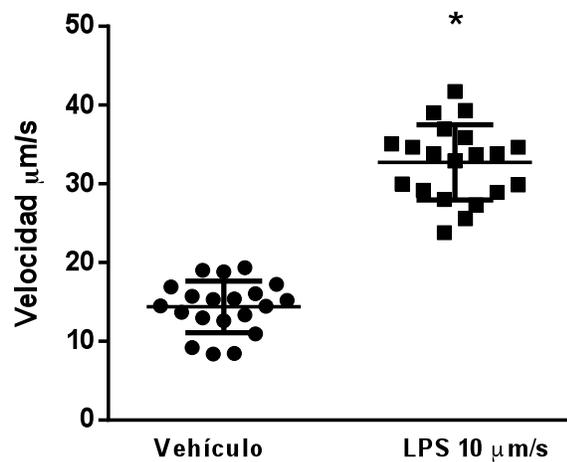


Figura 3. LPS incrementa la velocidad de desplazamiento de microsferas en tráqueas de ratón

A) Imágenes extraídas de la grabación del movimiento de Mes, en tráquea de ratones con vehículo (panel superior) y tráqueas tratadas con LPS 10 $\mu\text{g/mL}$ (panel inferior).

B) Velocidad instantánea promedio de desplazamiento de MEs: 14,4±3 $\mu\text{m/seg}$ y 32.7±4 $\mu\text{m/seg}$, vehículo y tratado con LPS respectivamente. LPS incrementa la velocidad de desplazamiento de las microsferas. (ANOVA, * $p < 0.05$) $n = 5$.

4. Efecto de LPS sobre la liberación de ATP.

I) LPS induce liberación de ATP en las células ciliadas de epitelio respiratorio.

En macrófagos y en otros sistemas, se ha reportado que LPS induce la liberación de ATP al medio extracelular (Sperlágh y cols, 1998). Por lo que investigamos si en nuestros cultivos, LPS induce un incremento en la concentración de ATP extracelular lo que es compatible con la modificación en la FBC luego de la exposición a LPS.

Realizamos previamente un estudio concentración-dependencia entre LPS y liberación de ATP extracelular. A diferencia de las otras dosis estudiadas (1 $\mu\text{g/mL}$ y 5 $\mu\text{g/mL}$), observamos que la exposición a LPS 10 $\mu\text{g/mL}$ durante 20 minutos induce un incremento significativo en los niveles de ATP extracelular en comparación con los cultivos a los cuales se les aplicó el vehículo de LPS (Hank's): $109.78 \pm 76.98 \text{ nM/cm}^2$ y $1495.94 \pm 405.17 \text{ nM/cm}^2$, respectivamente, Figura 4A (* $p < 0.05$, entre ambos grupos).

En promedio, en condición basal la concentración extracelular de ATP en nuestros cultivos es de 109.78 nM/cm^2 . Posterior al estímulo con LPS 10 $\mu\text{g/mL}$ (20 minutos) observamos un incremento en la concentración de ATP, alcanzando un promedio de 1495 nM/cm^2 y el área promedio de nuestros cultivos es 0.1 cm^2 . Luego del estímulo de LPS 10 $\mu\text{g/mL}$, calculamos en promedio un nivel de ATP extracelular secretado por cultivo de 150 nM. Posteriormente, evaluamos si esa concentración de ATP altera la FBC. Tal como se observa en la Figura 4B, las células ciliadas responden a esa cantidad de ATP incrementando su FBC significativamente ($52.34 \pm 40.59 \text{ u.a}$ en cultivos control y $560.15 \pm 93.38 \text{ u.a}$ en cultivos tratados con ATP, respectivamente).

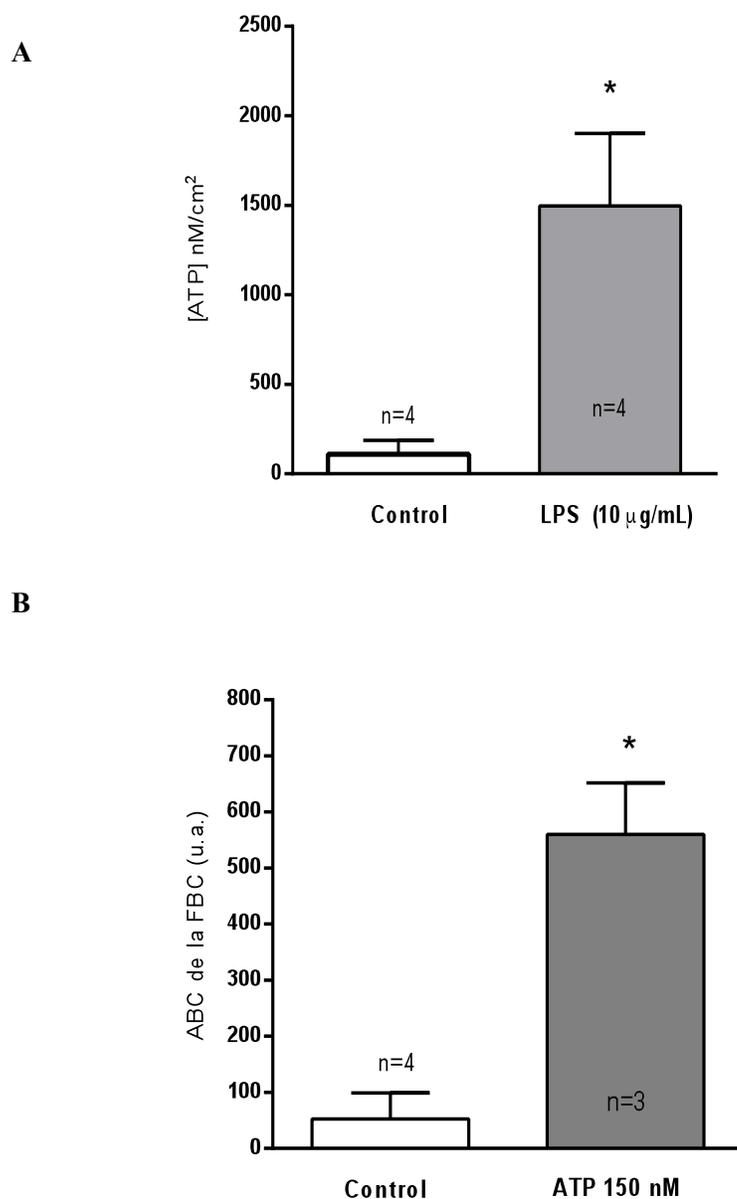


Figura 4. LPS induce liberación de ATP en cultivos primarios de tráquea de ratón.

A.) Cuantificación de niveles de ATP en muestras de medio de cultivos, luego de 20 minutos de exposición a vehículo o LPS 10 µg/mL. Se observa que LPS induce liberación de ATP (* $p < 0.05$ versus control).

B.) Área bajo la curva (en unidades arbitrarias, u.a) de los efectos de ATP (150 nM) sobre la FBC. Se observa que ATP incrementa la FBC (* $p < 0.05$ versus control). La FBC fue determinada con la técnica SAVA system.

II) ATP liberado induce incrementos en la FBC en células ciliadas del epitelio respiratorio.

Para evaluar si el ATP secretado al medio extracelular, luego de la exposición a LPS participa en el incremento de la FBC, estudiamos la frecuencia de batido ciliar luego de la pre-incubación con apirasa, una ectonucleotidasa que hidroliza el ATP a ADP, AMP y a fosfato inactivo.

Se registró la FBC basal de las células durante 5 minutos y luego se adicionó apirasa y LPS durante 20 minutos (Figura 5). Los datos se graficaron como el área bajo la curva (expresada en unidades arbitrarias, u.a.) de los cursos temporales, tomando en cuenta los 20 minutos en que las células fueron expuestas a LPS y apirasa (10 U/mL). Se observó que el tratamiento con apirasa disminuyó significativamente (* $p < 0.05$) el aumento de la FBC inducido por LPS 10 $\mu\text{g/ml}$; 159.5 ± 80 u.a. vs 651.7 ± 22 u.a., respectivamente. Además, nuevamente se confirmó el aumento significativo (* $p < 0.05$) de la FBC en los cultivos expuestos a LPS 10 $\mu\text{g/mL}$ con respecto al control (52.3 ± 47.7 u.a.). Apirasa (10 U/mL) durante los 20 minutos de experimento, no afectó la FBC basal de las células ciliadas, como se observa en el gráfico.

Para comprobar la disminución de los niveles de ATP, evaluamos la concentración de ATP extracelular, posterior al tratamiento con apirasa. Observamos que el tratamiento con apirasa disminuyó significativamente los niveles de ATP extracelular en cultivos primarios de tráquea de ratón en comparación a los sólo tratados con LPS 10 $\mu\text{g/ml}$; 202.7 ± 132 u.a y 651.8 ± 22 u.a, respectivamente). Datos no mostrados.

En conjunto estos resultados sugieren que LPS induce liberación de ATP al medio extracelular y que este ATP liberado es el responsable del incremento de la FBC luego de la exposición a LPS. Por lo que a continuación estudiaremos las posibles vías de señalización involucradas en el efecto estimulador de la FBC inducido por LPS.

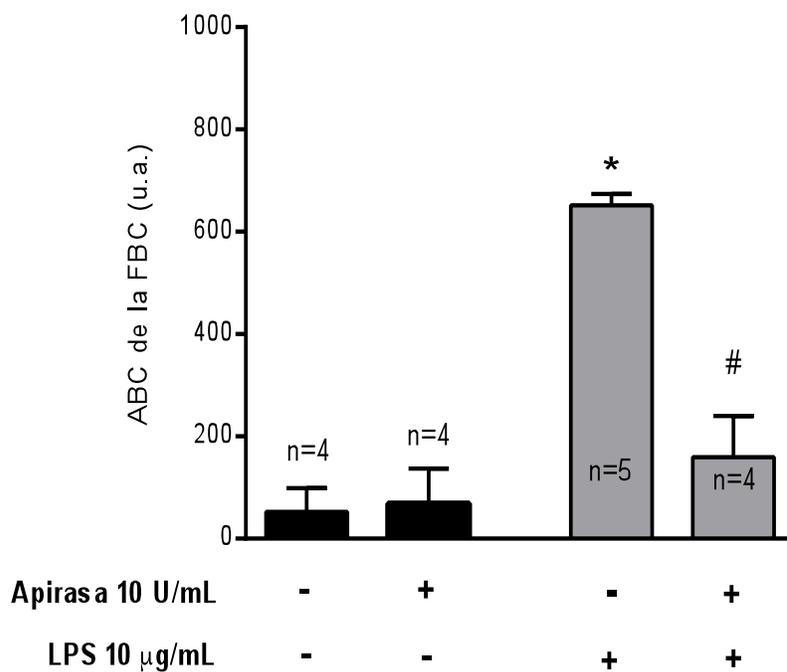


Figura 5. Apirasa reduce el aumento en la FBC inducida por LPS, en cultivos primarios de tráquea de ratón.

Área bajo la curva (en unidades arbitrarias u.a) de los efectos de apirasa (10 U/mL) sobre la FBC, en presencia y ausencia de LPS 10 µg/mL. Se observa que apirasa o tiene efecto sobre la FBC; pero si reduce significativamente el aumento en la FBC inducido por LPS (* $p < 0.05$ versus control; # $p < 0.05$ versus LPS 10 µg/mL). La FBC fue determinada con la técnica SAVA system.

5. Participación de la vía de señalización TLR en el incremento de la FBC inducido por LPS, en células ciliadas del epitelio respiratorio.

I) Expresión de canales TLR4 en células ciliadas de la tráquea de ratón.

Para estudiar las vías de señalización involucradas en el efecto estimulador de la FBC inducido por LPS, estudiamos la participación de los receptores TLR. LPS es detectado por los TLR, interactúa específicamente con TLR4, iniciando una cascada de señalización que involucra la participación del factor de transcripción NF- κ B.

Mediante la técnica de RT-PCR se identificó la presencia del mensajero (mRNA) de TLR4 en epitelio de tráquea y en cultivos primarios de tráquea de ratón. Observamos un único fragmento amplificado, del tamaño esperado, correspondiente a 506 pb. (Figura 6A). Se utilizó como control interno, GAPDH, cuyo fragmento amplifica 450 pb.

Estudios de inmunofluorescencia indirecta, confirman la expresión de TLR4 en el tejido de tráquea y en cultivos primarios de tráquea de ratón. En la figura 6Bi se observa que el anticuerpo específico anti-TLR4 reaccionó en tejido de tráquea dando una marca fluorescente intensa, localizada en la cara apical de las células ciliadas. En la figura 6Bii, se observa el control, sin anticuerpo primario, en que sólo se utilizó DAPI para marcar los núcleos y no se observa una marca fluorescente específica, indicando que la marca en 6Bi es específica.

Posteriormente evaluamos la presencia del receptor TLR4 en cultivos primarios utilizados en el desarrollo de la tesis, mediante la técnica de inmunofluorescencia. En la figura 6Ci, se observa la marca de TLR4 en la periferia nuclear y límites celulares de las

células, los núcleos fueron marcados con yoduro de propidio. En la figura 6Cii, se observa el control negativo sin anticuerpo primario, en ambas figuras los núcleos están marcados con yoduro de propidio.

II) Bloqueador de la activación de NF- κ B, no altera el efecto de LPS sobre la FBC en las células ciliadas respiratorias.

En los experimentos anteriores, mediante las técnicas de RT-PCR e inmunofluorescencia, detectamos la presencia de TLR4 en tejido de tráquea y en los cultivos primarios. Para determinar si la vía de señalización mediada por los receptores TLR4 está involucrada en el incremento de la FBC inducido por LPS, evaluamos la FBC en presencia de Dexametasona, un glucocorticoide que inhibe entre muchos otros efectos, la activación de NF- κ B (Adcock y cols., 2005).

Los resultados muestran que las células pre-incubadas por 3 y 24 horas, tanto con 100 nM y 1 μ M de Dexametasona y posteriormente expuestas a LPS, presentan un incremento en la FBC similar al incremento inducido por 10 μ g/mL en ausencia de este glucocorticoide (Figura 7), los valores observados fueron: 423 \pm 13 u.a, 435 \pm 37 u.a y 344 \pm 69 u.a, para cultivos incubados sin (control) o con 100 nM DEX y 1 μ M DEX respectivamente durante tres horas con DEX y posteriormente expuestos a LPS durante 20 minutos. Tras 24 horas de incubación se observó: control 400 \pm 16 u.a, DEX 100 mM 452 \pm 48 u.a y DEX 407 \pm 16 u.a. (Figura 7).

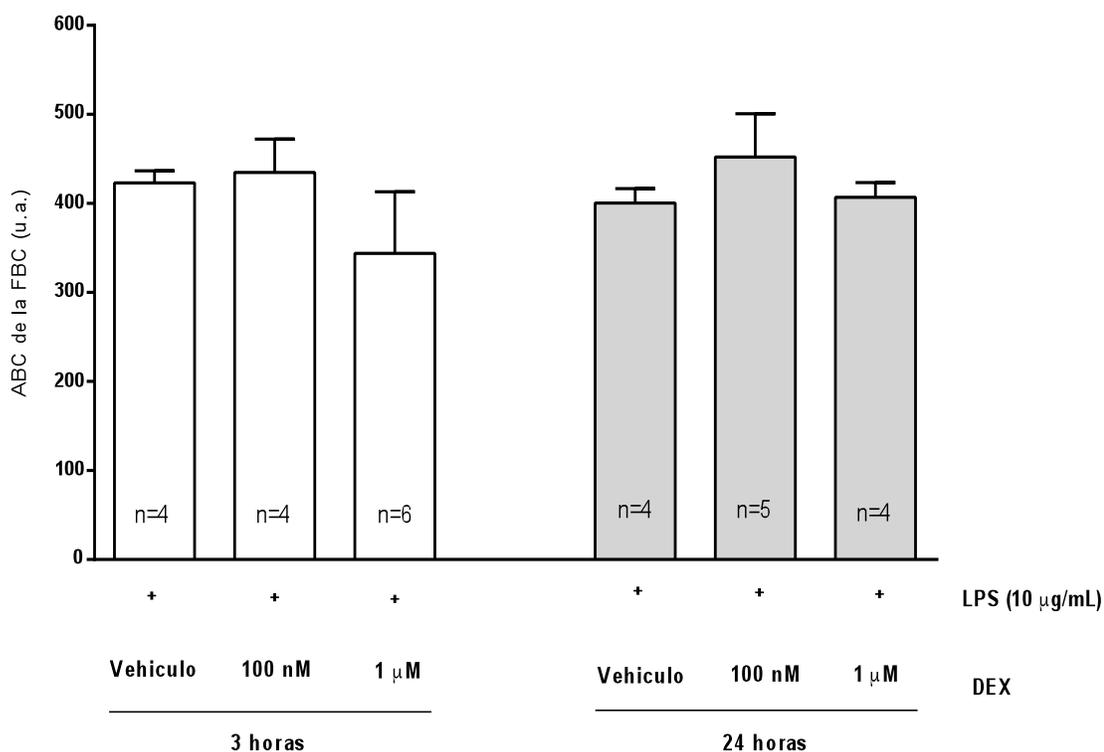


Figura 7. Dexametasona no altera el incremento de la FBC inducido por LPS en cultivos primarios de tráquea de ratón.

Área bajo la curva (en unidades arbitrarias u.a.) de los efectos de DEX sobre la FBC. Las barras blancas representan el $ABC \pm EE$ de los cultivos incubados por 3 horas con 100 nM y 1 μ M de DEX y posteriormente expuestos a LPS 10 μ g/mL. Las barras grises representan el $ABC \pm EE$ de los cultivos incubados durante 24 horas con 100 nM y 1 μ M de DEX y posteriormente expuestos a LPS 10 μ g/mL. DEX no afecta la FBC inducida por LPS ($p > 0.05$). La FBC fue determinada con la técnica SAVA system.

III) Activación de NF- κ B no participa en el incremento de FBC inducido por LPS.

Posteriormente, evaluamos los niveles de NF- κ B fosforilado luego del estímulo de LPS. Para esto, administramos intranasalmente 40 μ L de LPS 10 μ g/mL bajo anestesia y se esperó durante 1, 3, 6, 9, 18 y 24 hrs. Luego, evaluamos en epitelio de tráquea la fosforilación de NF- κ B mediante western blot con un anticuerpo específico (ver Métodos). Observamos que LPS indujo fosforilación de NF- κ B luego de 3 horas de exposición (Figura 8A), lo que no se relaciona con el curso temporal de los efectos de LPS que observamos sobre la FBC.

Utilizamos pirrolidina ditiocarbamato (PDTC), un inhibidor específico de la activación de NF- κ B (Schreck y cols., 1992). Los resultados muestran que las células pre-incubadas (30 minutos) con 10 μ M de PDTC y posteriormente expuestas a LPS (10 μ g/mL), presentan un incremento en la FBC similar al incremento inducido por 10 μ g/mL de LPS en ausencia de este bloqueador (672.8 \pm 60 y 651.8 \pm 22 u.a., respectivamente), Figura 8B. Además, nuevamente se confirmó el aumento significativo (* p <0.05) de la FBC en las células expuestas a 10 μ g/mL de LPS respecto al control (52.3 \pm 40) y de las células incubadas previamente con PDTC y tratadas con LPS, respecto al control.

En conjunto, estos resultados sugieren que el incremento de la FBC observada luego de la exposición a LPS, no estaría relacionado con la activación ni participación de NF- κ B. Los experimentos muestran que NF- κ B se activa, pero el efecto en el batido ciliar inducido por LPS, dada la temporalidad del efecto (20 min), no puede ser mediado por la activación de NF- κ B.

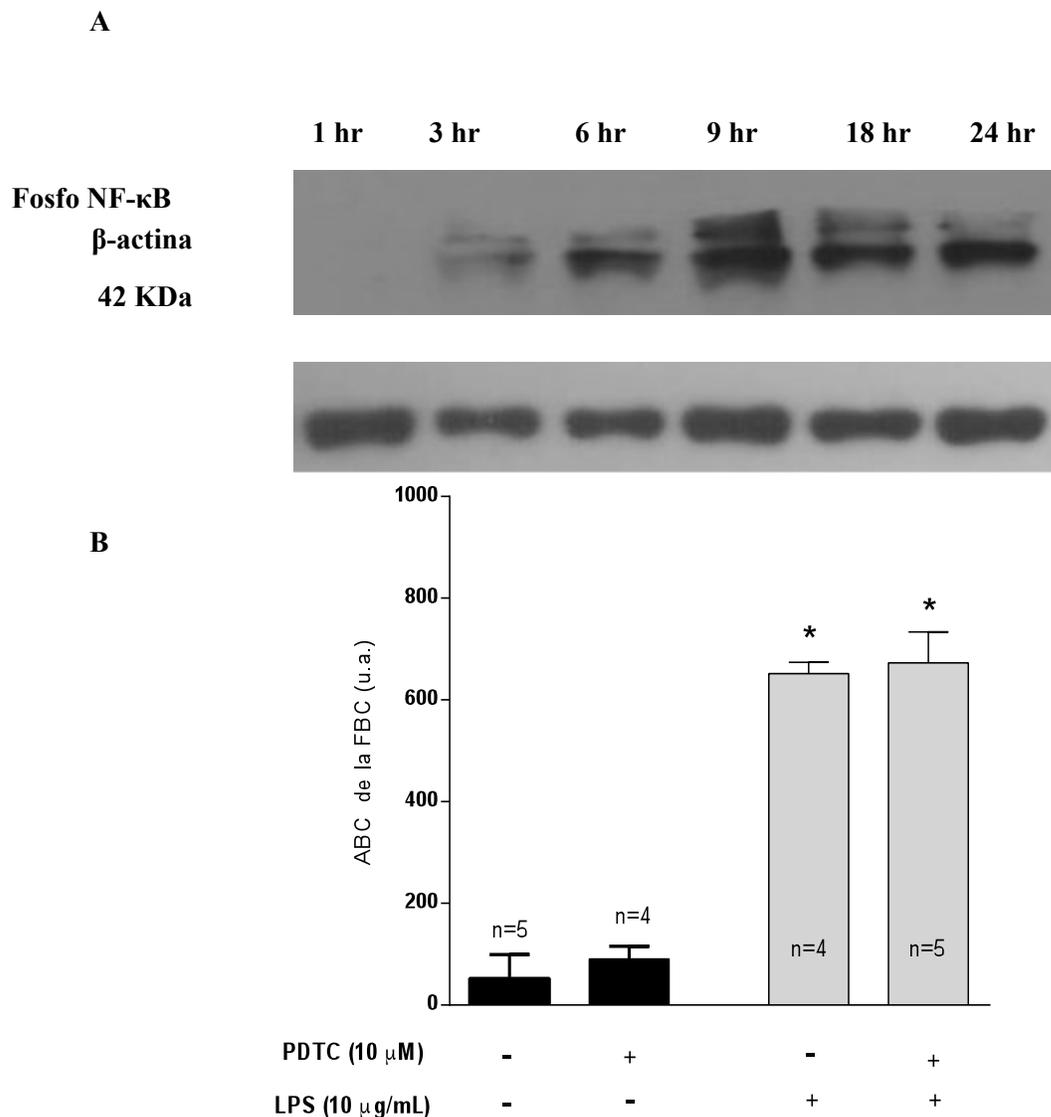


Figura 8. PDTC no altera el efecto de LPS sobre el incremento de la FBC en cultivos primarios de tráquea de ratón.

A) Western blot de epitelio de tráquea luego del tratamiento por 1, 3, 6, 9, 18 y 24 hrs. con LPS 10 μ g/mL, incubados con el anticuerpo específico fosfo NF- κ B (1:1500). A partir de las 3 horas se observa expresión de fosfo NF- κ B. Se utilizó como control de carga, β -actina.

B) Área bajo la curva (en unidades arbitrarias u.a) del efecto de la pre-incubación de PDTC sobre la FBC, en ausencia o presencia de LPS. PDTC no afectó el incremento de la FBC inducido por LPS (* p <0.05 versus control). La FBC fue determinada con la técnica SAVA system.

IV) Interleucina-8 no modifica la FBC de células ciliadas de cultivos primarios.

Dentro de los productos de la vía de señalización TLR, se encuentra interleucina 8 (IL-8), un potente factor quimioattractante cuya síntesis ocurre en monocitos, células endoteliales y células epiteliales (Yang y cols., 2004). En la literatura existen antecedentes sobre efectos de IL-8 sobre la FBC luego de 24 hrs. de incubación con 500 pg/mL (Shen y cols., 2012), pero se desconoce si tiene efectos en periodos cortos de incubación. Para esto se registró la FBC de cultivos primarios de células ciliadas en presencia de distintas concentraciones crecientes de IL-8: 500 pg/mL, 50 ng/mL y 5 µg/mL.

Los resultados muestran que IL-8 no incrementa la frecuencia de batido ciliar, en comparación al control (PBS) durante la exposición de 20 minutos: 94.3±3 u.a. cultivos control, 116.2±48 u.a. IL-8 500 pg/mL, 154.3±45 IL-8 50 ng/mL y 130.8±45 u.a. (Figura 9).

Estos resultados junto a los obtenidos previamente del bloqueo de la vía de NF-κB, sugieren que la vía de señalización de LPS mediada por su receptor TLR4 no está involucrada en los incrementos FBC inducidos por LPS en periodos cortos de incubación.

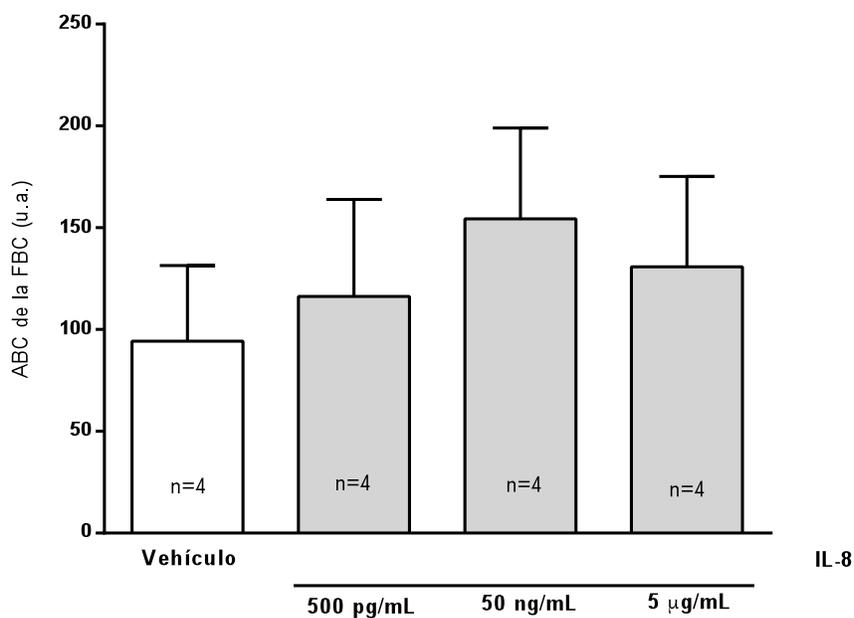


Figura 9. Interleucina-8 no afecta la FBC en cultivos primarios de tráquea de ratón.

Área bajo la curva (en unidades arbitrarias, u.a) de los efectos de IL-8 (500 pg/mL, 50 ng/ml y 5 µg/mL) sobre la FBC. IL-8 no tuvo efectos sobre la FBC ($p>0.05$). La FBC fue determinada con la técnica SAVA system.

6. Participación del receptor P2X7 y Panexina 1 en el aumento de la FBC inducido por LPS, en las células ciliadas del epitelio respiratorio.

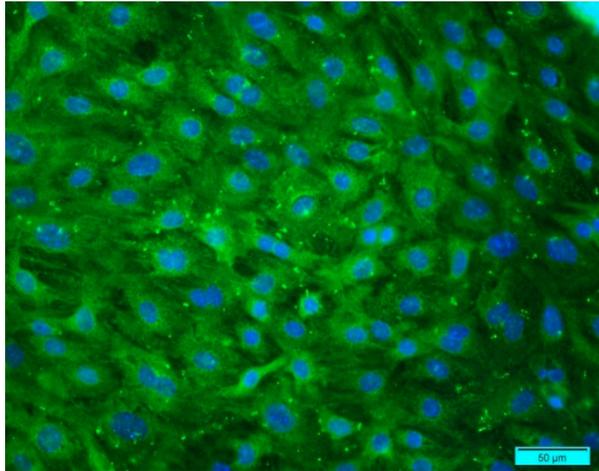
I) Expresión de canales purinérgicos y Panexina 1 en células ciliadas del epitelio respiratorio.

Para estudiar las vías de señalización involucradas en el efecto estimulador de la FBC inducido por LPS, evaluamos la participación del receptor P2X7 y del hemicanal Panx1, quienes están relacionados con incrementos en la liberación de ATP (D'hondt y cols., 2011), el cual parece ser el mediador del incremento de la FBC inducido por LPS.

Primero evaluamos la expresión de P2X7R mediante inmunofluorescencia en cultivos primarios de tráquea de ratón (Figura 10A), expresión proteica por primera vez reportada en epitelio de tráquea, anteriormente solo fue reportada la expresión del ARNm (Kim y cols., 2004). Se observa que el anticuerpo específico anti-P2X7R reaccionó específicamente con P2X7R en tejido de tráquea dando una marca verde fluorescente intensa, localizada en los alrededores de los núcleos celulares. En la figura 10B, se observa el control, sin anticuerpo primario, en el cual se utilizó DAPI para marcar los núcleos, no se observa una marca fluorescente específica.

Adicionalmente, se confirmó la expresión de Panx1 en epitelio de tráquea (Figura 11A) mediante inmunofluorescencia, previamente reportada por Ransford y cols., en el 2004. Se observa que el anticuerpo específico anti-Panx1 reaccionó específicamente en tejido de tráquea, dando una marca verde fluorescente intensa. En la figura 11B, se observa el control, sin anticuerpo primario, en el cual se utilizó DAPI para marcar los núcleos, no se observa una marca fluorescente específica.

A



B

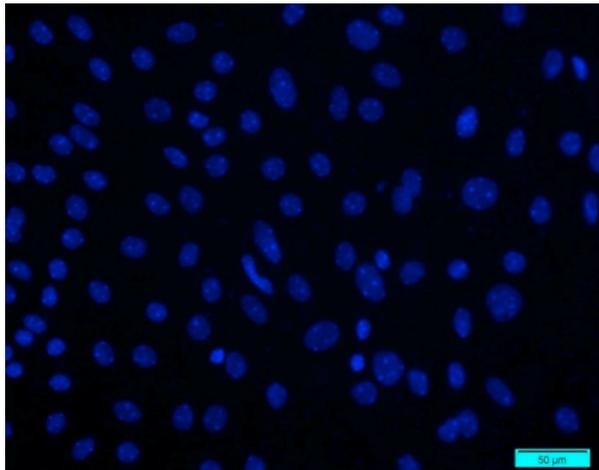


Figura 10. Expresión de receptores P2X7 en cultivos primarios de células ciliadas de epitelio respiratorio.

A) Se muestra la presencia de P2X7R revelada con anticuerpo anti-P2X7R (1:200) (verde) y los núcleos celulares revelados con DAPI (azul) en cultivos primarios de epitelio respiratorio

B) Control negativo sin anticuerpo primario, núcleos revelados con DAPI. Barra de escala: 50 μm .

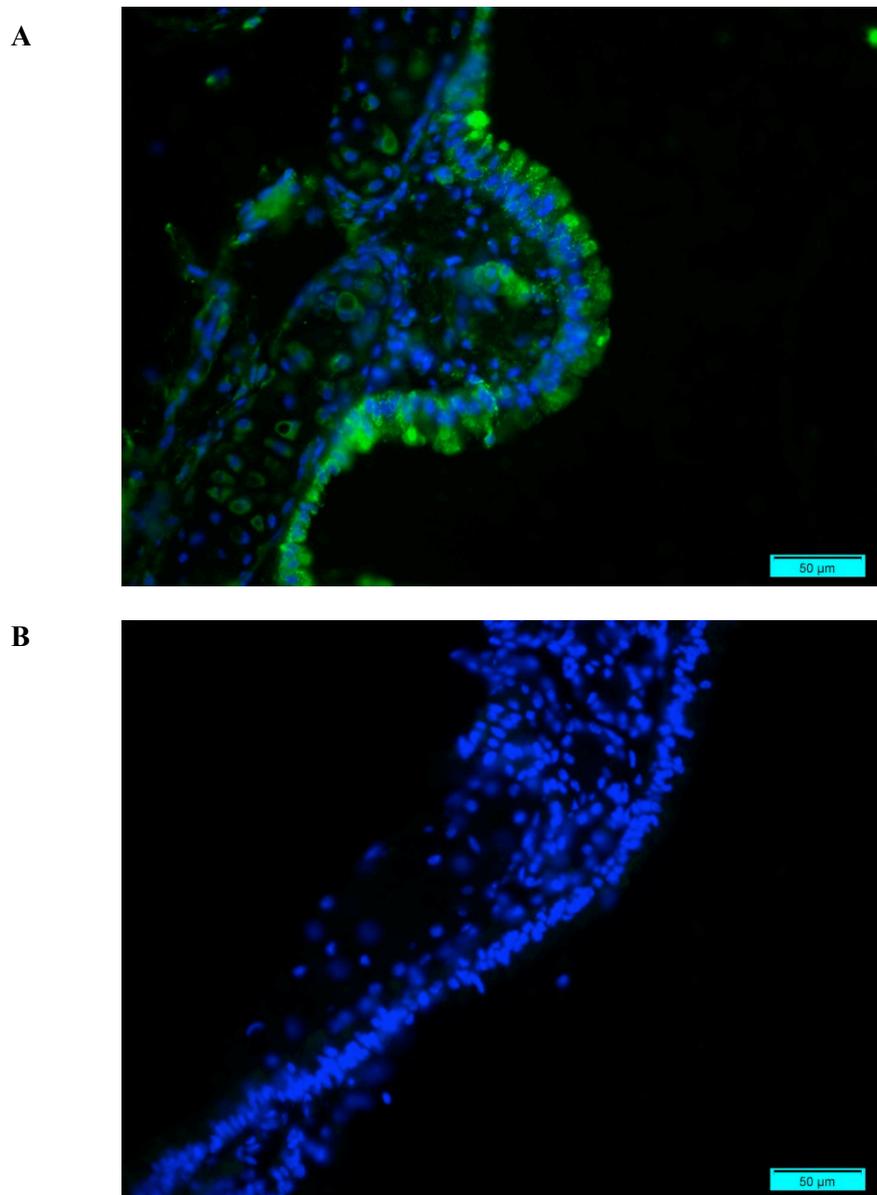


Figura 11. Expresión de panexina 1 en epitelio de tráquea de ratón.

A) Expresión de Panx1, revelada con anticuerpo anti-Panx1 (1:150) (verde) y los núcleos celulares revelados con DAPI (azul) en tráquea.

B) Control negativo sin anticuerpo primario. Se observan los núcleos revelados con DAPI, Barra de escala: 50 µm.

II) Antagonistas de canales purinérgicos, previenen el incremento en la FBC inducido por LPS, en células ciliadas del epitelio respiratorio.

Para determinar si los receptores P2X7, participan del aumento de la FBC inducido por LPS, se evaluó la FBC de los cultivos expuestos a LPS en presencia de Suramina, un antagonista de canales purinérgicos no selectivo (von Kügelgen y cols., 2006), ATP oxidado (oATP) un antagonista de P2X7R (Murgia y cols., 1993) y en presencia de KN62, un antagonista de los receptores P2X7.

Los resultados muestran que las células pre-incubadas (10 minutos) con 100 μ M de suramina y expuestas a LPS muestran un bloqueo significativo ($*p<0.05$) del efecto de LPS sobre la FBC (Figura 12A). Los cultivos incubados con suramina y posteriormente tratado con LPS presentan un ABC más bajo (411.71 ± 75.16 u.a.) en comparación a los tratados con LPS (651.76 ± 22.38 u.a.). Suramina 100 μ M (sin LPS) tiene un ABC similar al control (91.80 ± 51.83 u.a y 52.34 ± 47.75 u.a., respectivamente), lo que sugiere que suramina “*per sé*” no afectó la FBC basal.

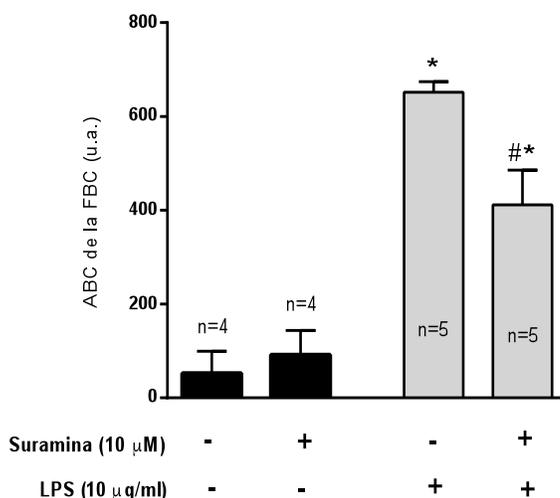
En la Figura 12B se observa que los cultivos pre-incubados (10 minutos) con 100 μ M de oATP y posteriormente expuestos a LPS, bloqueó significativamente ($*p<0.05$) el incremento de la FBC inducido por 10 μ g/mL de LPS sobre la FBC (271.70 ± 46.05 y 651.76 ± 22.38 u.a., respectivamente. Además, se confirmó el aumento significativo ($*p<0.05$) de la FBC en las células expuestas a 10 μ g/mL de LPS respecto al control y de las células incubadas previamente con oATP (con LPS), respecto al

control (52.34 ± 47.75 u.a.). oATP (sin LPS) no presenta diferencias significativas respecto al control (45.34 ± 32.37 u.a.).

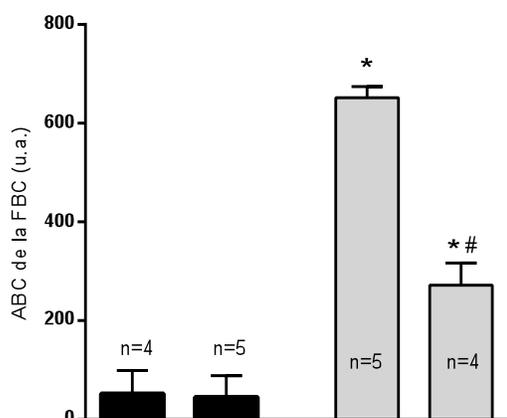
Posteriormente, se evaluó la FBC de los cultivos expuestos a LPS en presencia de KN62, un antagonista no competitivo de P2X7R. Los resultados obtenidos muestran que las células pre-incubadas (10 minutos) con $10 \mu\text{M}$ de KN62 y expuestas a LPS, producen un bloqueo significativo ($*p < 0.05$) del efecto de LPS sobre la FBC (Figura 12C). Los cultivos incubados con KN62 y posteriormente tratado con LPS presentan un ABC más bajo (252.66 ± 81.85 u.a.) en comparación a los tratados con LPS (651.76 ± 22.38 u.a.).

En conjunto estos resultados sugieren que P2X7R participa en el incremento de la FBC inducido por LPS.

A

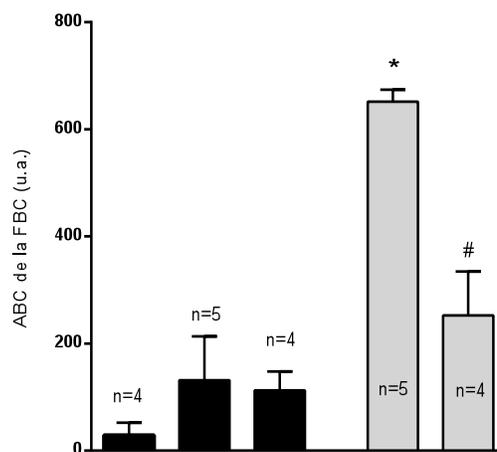


B



oATP (100 μ M)
LPS (10 μ g/ml)

C



KN62 (10 μ M)
LPS (10 μ g/ml)
DMSO

Figura 12. Antagonistas de canales purinérgicos, Suramina, oATP y KN62 bloquean la FBC inducida por LPS.

A) Área bajo la curva (en unidades arbitrarias, u.a) del efecto de suramina sobre la FBC, en presencia o ausencia de LPS. Suramina altera el efecto de LPS sobre la FBC (* $p < 0.05$ versus control; # $p < 0.05$ versus LPS 10 μ g/mL). La FBC fue determinada con la técnica SAVA system.

B) Área bajo la curva (en unidades arbitrarias, u.a) del efecto de oATP sobre la FBC, en presencia o ausencia de LPS. oATP altera el efecto de LPS sobre la FBC (* $p < 0.05$ versus control; # $p < 0.05$ versus LPS 10 μ g/mL). La FBC fue determinada con la técnica SAVA system.

C) Área bajo la curva (en unidades arbitrarias, u.a) del efecto de KN62 sobre la FBC, en presencia o ausencia de LPS. KN62 altera el efecto de LPS sobre la FBC (* $p < 0.05$ versus control; # $p < 0.05$ versus LPS 10 μ g/mL). La FBC fue determinada con la técnica SAVA system.

III) *knockout* e inhibidores de Panx1, previenen el incremento en la FBC inducido por LPS, en células ciliadas del epitelio respiratorio.

Para determinar si Panx1 participa en el incremento de la FBC inducido por LPS, evaluamos en cultivos realizados a partir de ratones *knockout* y en cultivos tratados con inhibidores de Panx1; probenecid y carbenoxolona, la FBC en respuesta a LPS.

En cultivos primarios de ratones *knockout* de Panx1, se observa que LPS no es capaz de incrementar la FBC en comparación con los cultivos control expuestos a LPS, durante el mismo periodo de exposición, Figura 13. Los resultados muestran que las células ciliadas control presentan un ABC de 533.98 ± 88.01 u.a, a diferencia de los cultivos *knockout* un ABC de 206.70 ± 35.75 u.a, luego de la exposición a LPS $10 \mu\text{g/ml}$.

Posteriormente, se evaluó el efecto de probenecid sobre el aumento de la FBC inducido por LPS. En la figura 14A, se observa que 1 mM de probenecid, inhibe de manera significativa ($*p < 0.05$), el aumento de la FBC inducido por $10 \mu\text{g/mL}$ de LPS (233.86 ± 71.19 y 651.76 ± 22.38 u.a., respectivamente). Tanto en control (vehículo de probenecid), como en probenecid (sin LPS) la FBC fue similar (52.34 ± 47.75 y 651.76 ± 22.38 u.a., respectivamente)

En la figura 14B., se observa que la pre-incubación (10 minutos) de las células ciliadas con $10 \mu\text{M}$ de Carbenoxolona, un inhibidor inespecífico de hemicanales y Panexina 1, bloqueó significativamente ($*p < 0.05$) el incremento en la FBC inducido por $10 \mu\text{g/ml}$ de LPS (344.62 ± 41.11 y 651.76 ± 22.38 u.a., respectivamente).

Para corroborar la participación de Panx1 en el incremento de la FBC inducido por LPS, evaluamos la captación de BrEt como un indicador de su activación funcional

(Schalper y cols., 2008). Para cuantificar dicha respuesta, medimos el incremento en la permeabilidad de la membrana inducido por la adición de LPS 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ posterior al estímulo con LPS durante 20 minutos, similar al tiempo en que se evaluó la FBC. Mediante el análisis de captación (ver Métodos) observamos un incremento en la captación de BrEt, en comparación a los cultivos tratados solo con el vehículo de LPS (Figura 15), efecto que fue bloqueado con la utilización de probenecid (1 mM) y cbx (10 μM). En conjunto estos resultados sugieren que Panx1 y P2X7R están involucrado en el incremento en la FBC Inducido por LPS.

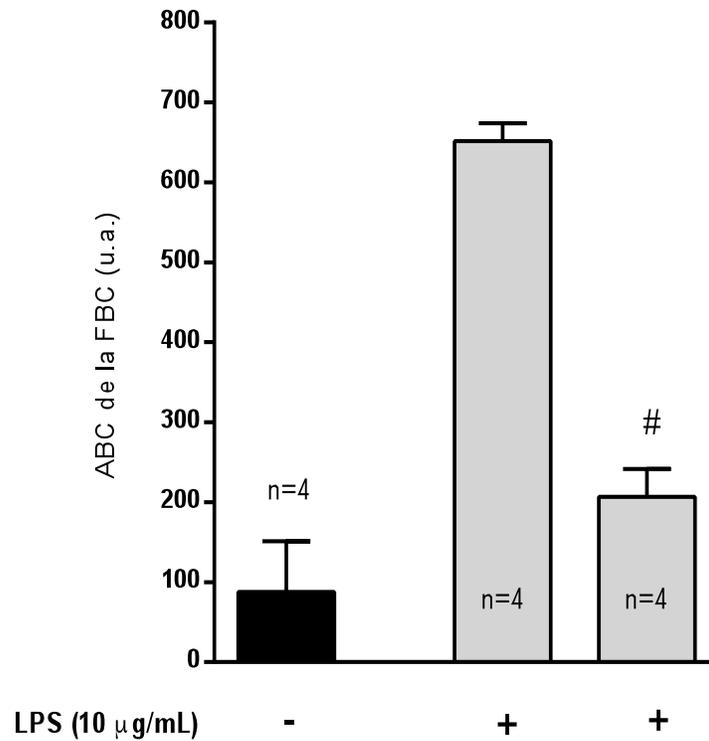


Figura 13. LPS no incrementa la FBC en cultivos primarios de ratones *knockout* de Panx1.

Área bajo la curva (en unidades arbitrarias, u.a) del efecto de LPS sobre la FBC en cultivos de ratones *knockout* de Panx1. En estos cultivos LPS no incrementa la FBC (# $p < 0.05$ versus LPS 10 µg/ml). La FBC fue determinada con la técnica SAVA system.

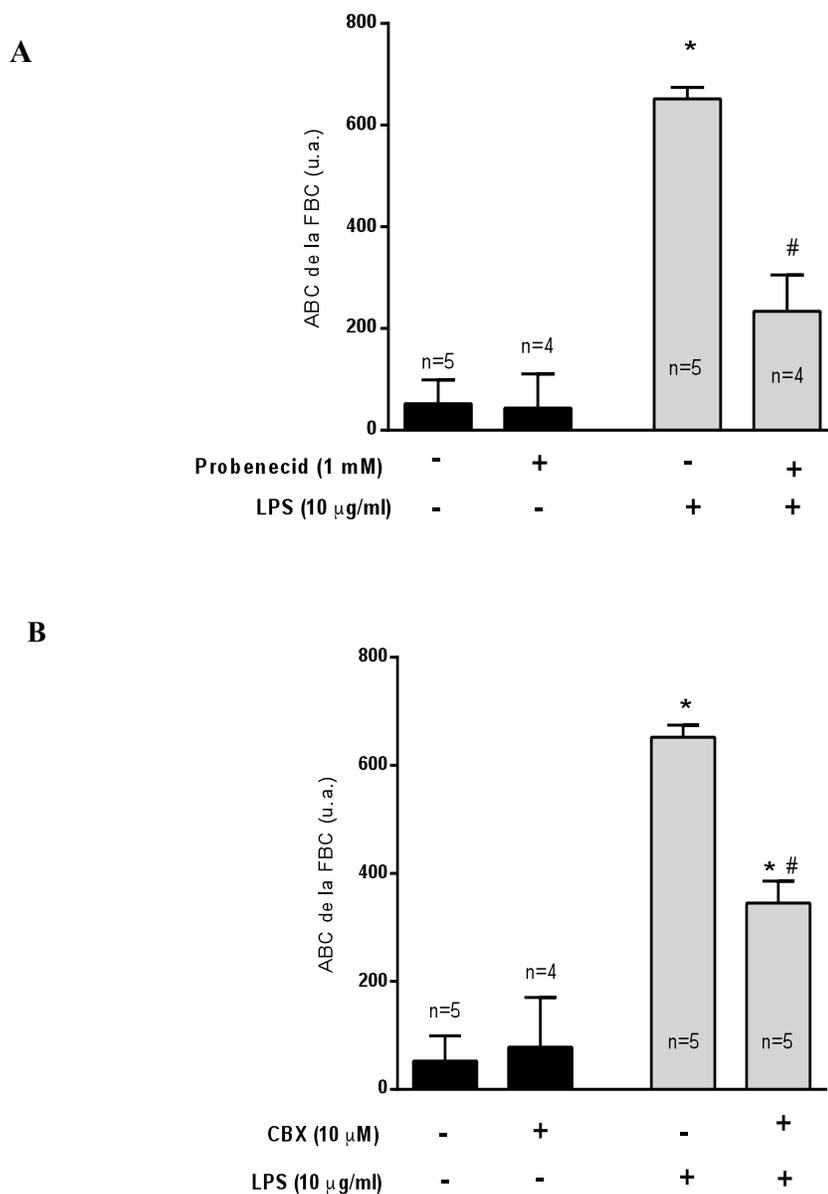


Figura 14. Inhibidores de Panx1, probenecid y carbenoxolona bloquean la FBC, inducida por LPS en cultivos primarios de células ciliadas de epitelio respiratorio.

A) Área bajo la curva (en unidades arbitrarias, u.a) del efecto de probenecid sobre la FBC. Se observa que probenecid reduce el efecto de LPS sobre la FBC (* $p < 0.05$ versus control; # $p < 0.05$ versus LPS 10 µg/mL). La FBC fue determinada con la técnica SAVA system.

B) Área bajo la curva (en unidades arbitrarias, u.a) del efecto de CBX sobre la FBC. Se observa que probenecid reduce el efecto de LPS sobre la FBC (* $p < 0.05$ versus control; # $p < 0.05$ versus LPS 10 µg/mL). La FBC fue determinada con la técnica SAVA system.

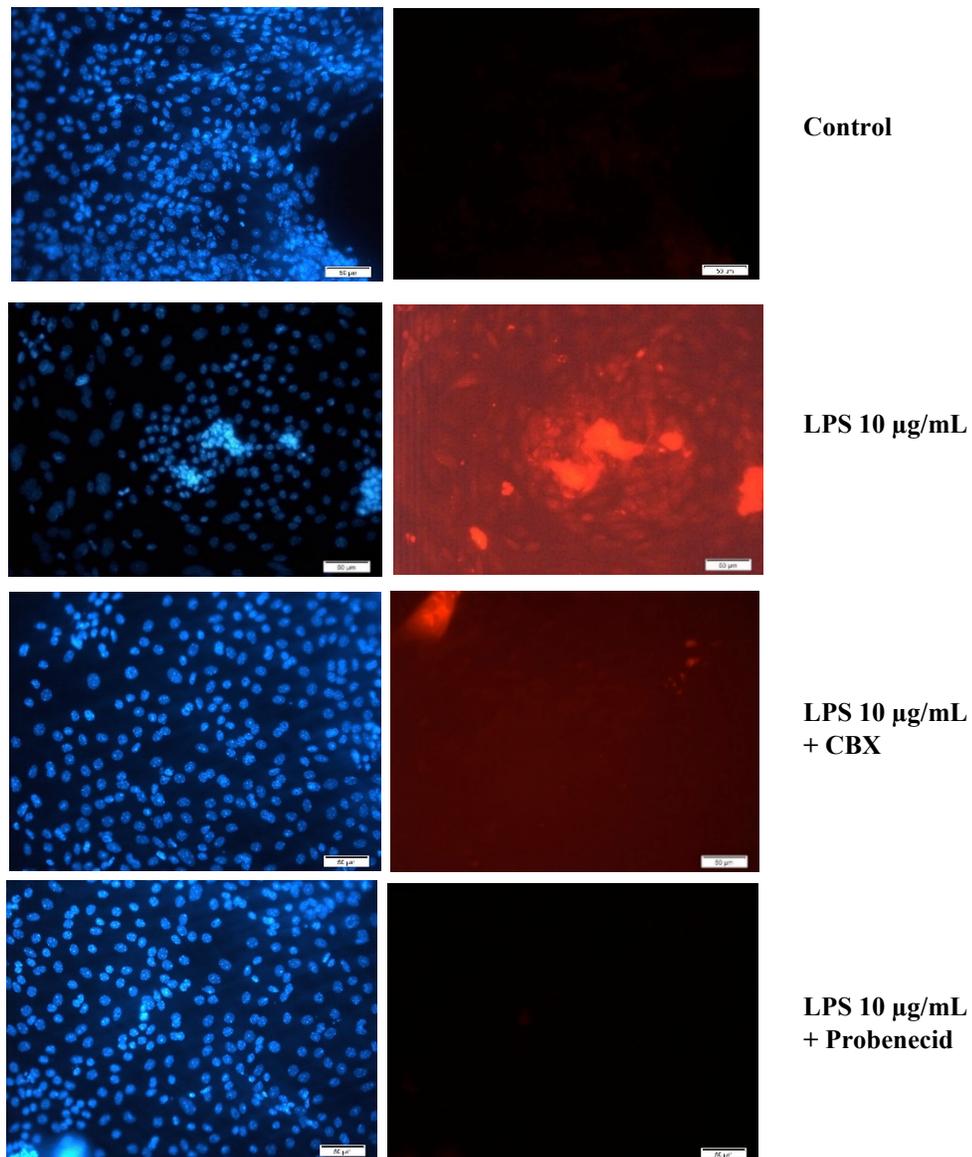


Figura 15. LPS induce captación de BrEt en cultivos primarios de células ciliadas de epitelio respiratorio.

Fotografías tomadas con microscopia de fluorescencia (40x) a cultivos tratados con las distintas condiciones. Se observa una fotografía de los núcleos celulares marcados con Dapi y luego las células posterior a la exposición a LPS, tratamientos o control. LPS induce un incremento en la captación de BrEt, posterior a los 20 minutos de exposición., efecto que es bloqueado con el uso de inhibidores: CBX y Probenecid.

IV) Antagonistas de canales purinérgicos previenen incrementos en la concentración extracelular de ATP inducido por LPS, en células ciliadas del epitelio respiratorio.

En los resultados obtenidos previamente, determinamos que P2X7R es importante en el incremento de la FBC inducido por LPS. Para averiguar el mecanismo en el cual podría actuar P2X7R, evaluamos si antagonistas de este receptor afectan la liberación de ATP inducida por LPS.

Evaluamos, el efecto de la pre-incubación de suramina sobre la liberación de ATP inducido por la exposición a LPS 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Mediante el ensayo de luciferin luciferasa, se observó que la pre exposición a suramina induce una disminución en los niveles de ATP extracelular en comparación con los cultivos tratados con LPS, Figura 16A, observándose en los cultivos pre-incubados con suramina niveles de ATP extracelular de $169.93 \pm 135.05 \text{ nM}/\text{cm}^2$ en comparación con un $1495.95 \pm 405.17 \text{ nM}/\text{cm}^2$ de ATP encontrado en los cultivos expuestos a LPS, suramina disminuye significativamente ($\#p < 0.05$) los niveles de ATP extracelular inducido por LPS.

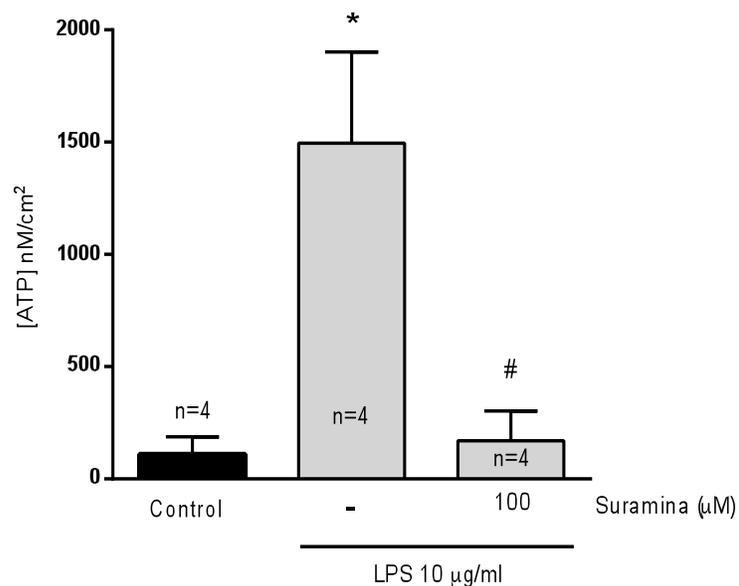
Posteriormente evaluamos si la exposición al antagonista αATP , tiene efecto sobre la liberación de ATP al medio extracelular posterior a la exposición a LPS 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se observa en la Figura 16B que la pre exposición a αATP induce una disminución en la liberación de ATP extracelular en comparación con los cultivos tratados solo con LPS. Los cultivos tratados con αATP muestran un $133.19 \pm 51.39 \text{ nM}/\text{cm}^2$ de incremento en los niveles de ATP en comparación con un 1495.95 ± 405.17

nM/cm² observado en los cultivos expuestos a LPS, encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos (#p<0.05).

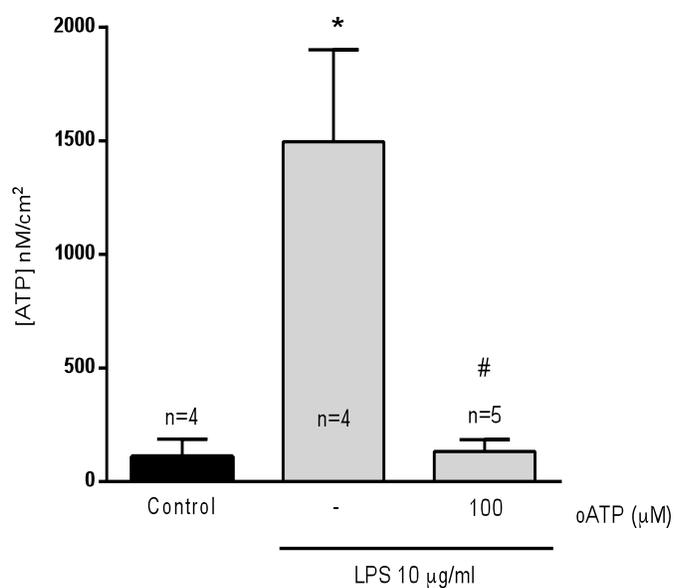
Posteriormente evaluamos si la pre-incubación con KN62, tiene efecto sobre la liberación de ATP al medio extracelular luego de la exposición a LPS 10 µg/mL. Se observó que la pre exposición a KN62 induce una disminución en los niveles de ATP extracelular en comparación con los cultivos tratados con LPS, Figura 16C, en los cultivos tratados con KN62 y luego expuestos a LPS se observó niveles de ATP de 38.45±24.39 nM/cm² en comparación con niveles de ATP de 1495.95±405.17 nM/cm² en los cultivos expuestos a LPS, observándose diferencias significativas entre ambos grupos (#p<0.05).

Se observa una inhibición de la liberación de ATP en presencia de antagonistas de P2X7R, estos resultados sugieren que P2X7R está involucrado en el mecanismo de liberación de ATP.

A



B



C

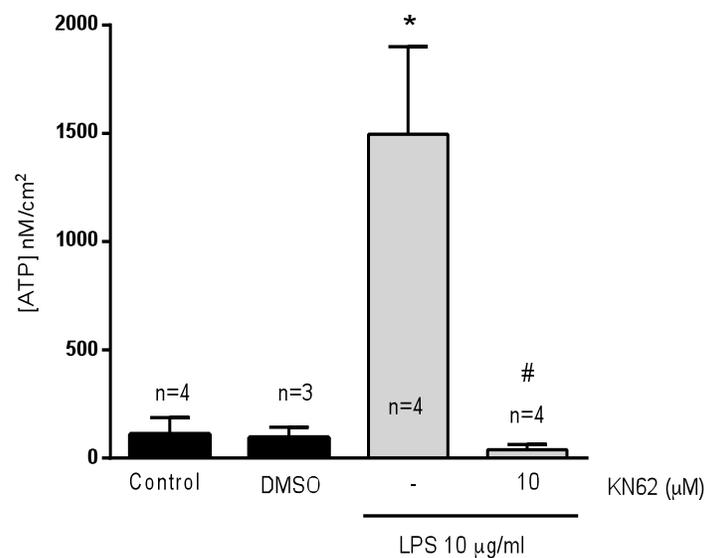


Figura 16. Antagonistas de P2X7R afectan la liberación de ATP inducida por LPS

A) Cuantificación de niveles de ATP en muestras de medio de cultivo, luego de pre-incubación con Suramina y exposición a LPS 10 µg/mL. Suramina afecta la liberación de ATP inducido por LPS (*p<0.05 versus control; # p<0.05 versus LPS 10 µg/mL).

B) Cuantificación de niveles de ATP en muestras de medio de cultivo, luego de pre-incubación con oATP y exposición a LPS 10 µg/mL. oATP afecta la liberación de ATP inducido por LPS (*p<0.05 versus control; # p<0.05 versus LPS 10 µg/mL).

C) Cuantificación de niveles de ATP en muestras de medio de cultivo, luego de pre-incubación con KN62 y exposición a LPS 10 µg/mL. KN62 afecta la liberación de ATP inducido por LPS (*p<0.05 versus control; # p<0.05 versus LPS 10 µg/mL).

V) Inhibidores de panexina 1, previenen aumentos en la concentración extracelular de ATP inducido por LPS, en células ciliadas del epitelio respiratorio.

En la literatura se ha descrito que Panx1 media la liberación de ATP al medio extracelular en diversos sistemas como células inmunes y cardiomiocitos (Delmatova y cols., 2012). Para evaluar si Panx1 está relacionada con la liberación de ATP inducida por LPS, evaluamos si la pre-incubación con CBX, produce una disminución en la liberación de ATP. Mediante el ensayo de luciferin luciferasa, se observó que la pre exposición a CBX induce una disminución en los niveles de ATP extracelular en comparación con los cultivos tratados con LPS, Figura 17A. Observándose en los cultivos con carbenoxolona: 220.31 ± 115.10 nM/cm² de niveles de ATP extracelular en comparación con 1495.95 ± 405.17 nM/cm² en los cultivos expuestos a LPS, observándose diferencias significativas entre ambos grupos #p<0.05.

Posteriormente se evaluó si la pre-incubación con probenecid, induce una disminución en la liberación de ATP al medio extracelular luego de la exposición a LPS 10 µg/mL. Los resultados muestran que la pre exposición a probenecid induce una disminución en la concentración de ATP extracelular en comparación con los cultivos tratados con LPS, Figura 17B, observándose en los cultivos con probenecid niveles de ATP de 155.82 ± 75.70 nM/cm², niveles más bajos en comparación con 1495.95 ± 405.17 nM/cm² de liberación de ATP en los cultivos expuestos a LPS, existiendo diferencias significativas entre ambos grupos #p<0.05. En conjunto estos resultados sugieren que P2X7R y Panx1 participan en el incremento de FBC inducido por ATP.

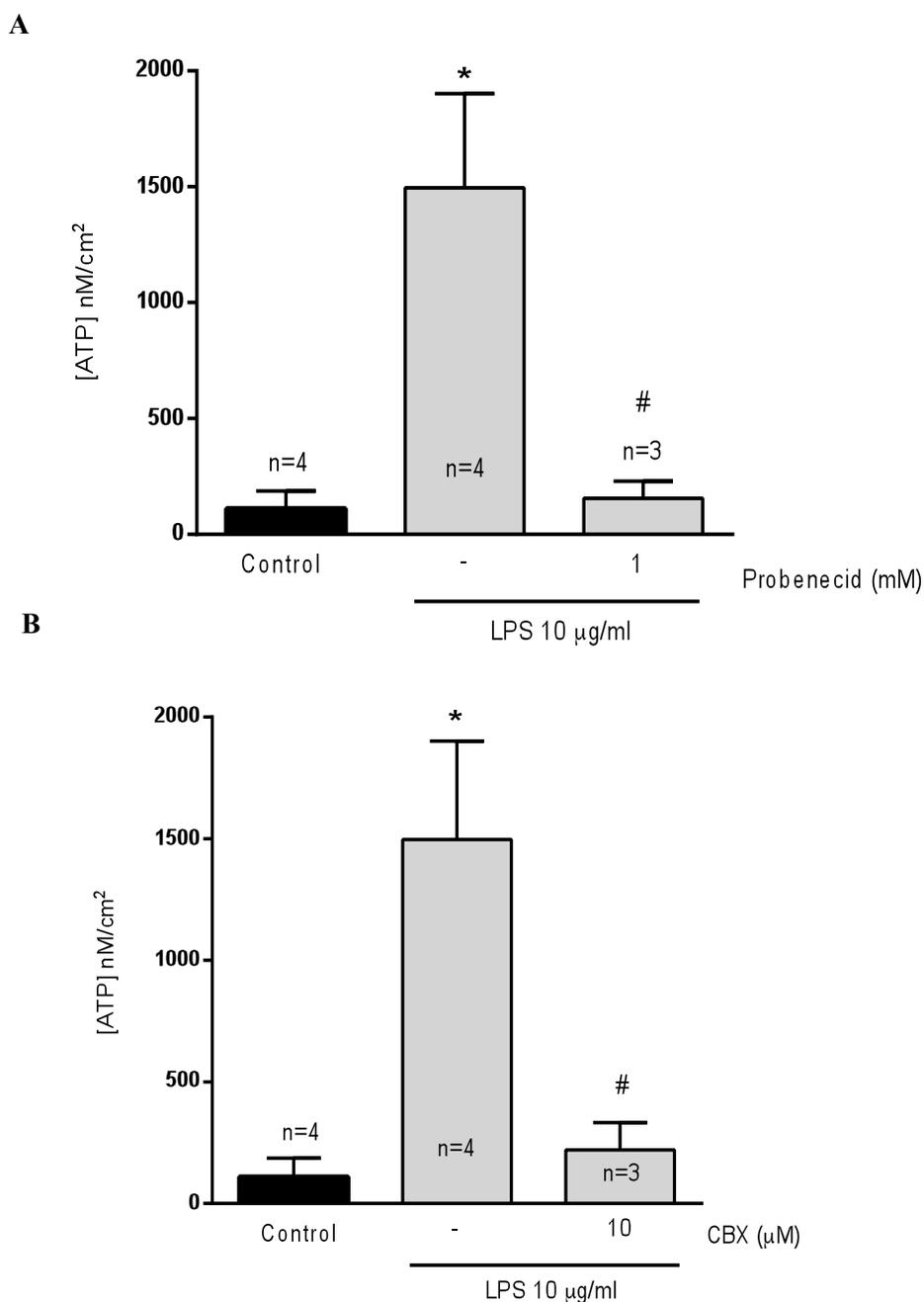


Figura 17. Inhibidores de Panx1 afectan la liberación de ATP estimulada por LPS.

A) Cuantificación de niveles de ATP en muestras de medio de cultivo, luego de pre-incubación con probenecid y exposición a LPS 10 µg/mL. Probenecid reduce la liberación de ATP inducido por LPS (* $p < 0.05$ versus control; # $p < 0.05$ versus LPS 10 µg/mL). Niveles de ATP detectados por una técnica luminométrica.

B) Cuantificación de niveles de ATP en muestras de medio de cultivo, luego de pre-incubación con CBX y exposición a LPS 10 µg/mL. CBX reduce la liberación de ATP inducido por LPS (* $p < 0.05$ versus control; # $p < 0.05$ versus LPS 10 µg/mL). Niveles de ATP detectados por una técnica luminométrica.

7. Participación de la vía de señalización mediada por los receptores P2Y en el incremento de la FBC inducido por LPS, en las células ciliadas del epitelio respiratorio.

Incrementos en el ATP extracelular en el rango de hasta 100 μM , se relacionan con aumentos en la FBC, mediado por la participación de la vía de señalización del receptor P2Y2 en el epitelio respiratorio (Uzlaner y cols., 1999).

El ATP interactúa con los receptores P2Y activando la vía de señalización, que involucra la producción de PLC, incrementos en la concentración intracelular de Ca^{2+} lo que a su vez activa la vía del NO y activación de la PKG. En conjunto, la activación de todos estos mecanismos se traduce en incrementos rápidos en la FBC (Uzlaner y cols., 1999).

En los resultados anteriores, determinamos que la exposición a LPS en cultivos de epitelio respiratorio induce un incremento en la concentración extracelular de ATP. Para evaluar si el ATP liberado incrementa la FBC mediante la vía de señalización P2Y, evaluamos la FBC en respuesta a LPS luego de la incubación con inhibidores de distintos componentes de la vía de señalización P2Y.

I. Inhibidor selectivo de la proteína cinasa C, previene el aumento en la FBC inducido por LPS, en células ciliadas del epitelio respiratorio.

Una vez que se activa la vía de P2Y2 por el estímulo de ATP extracelular, se activa a la fosfolipasa C, lo que se traduce en producción de IP3 y DAG, lo que se traduce en incrementos de Ca^{2+} intracelular y activación de la PKC (Ralevic y cols., 1998). Por lo que se evaluó la participación de la PKC en el aumento de la FBC inducido por LPS. Para esto, registramos la FBC de los cultivos primarios de células ciliadas expuestas a LPS en presencia de GF 109203X, un inhibidor selectivo de las isoformas de PKC dependiente de Ca^{2+} (Toullec y cols., 1991).

Los resultados (Figura 18) muestran que la pre-incubación (30 minutos) de las células ciliadas, con 20 μ M de GF 109203X, producen un bloqueo significativo ($*p<0.05$) del efecto de LPS 10 μ g/ml sobre la FBC, (133.49 \pm 31.21 y 651.76 \pm 22.38 u.a., respectivamente). Estos resultados indican que la proteína cinasa C participa como mediador en el incremento de la actividad ciliar inducido por LPS.

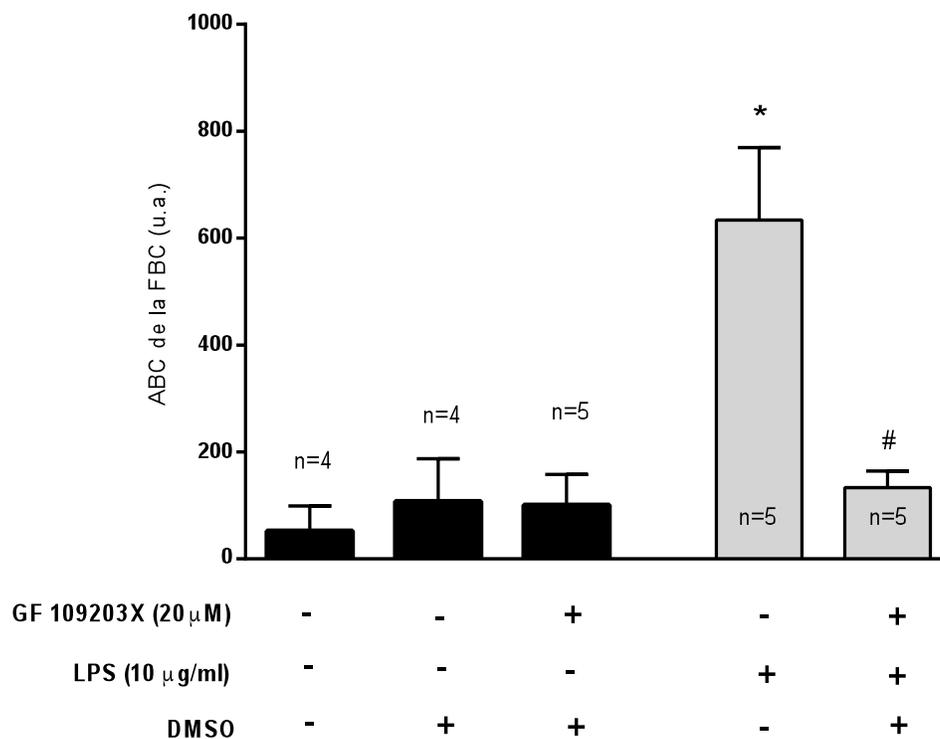


Figura 18. Bloqueo de la proteína cinasa C, reduce el efecto de LPS sobre la FBC.

Área bajo la curva (en unidades arbitrarias, u.a) de la FBC luego de la pre-incubación (30 minutos) con GF 109203X en presencia de LPS. GF 109203X inhibe el incremento de la FBC inducido por LPS (* $p < 0.05$ versus control; # $p < 0.05$ versus LPS 10 μg/mL). La FBC fue determinada con la técnica SAVA system.

II) Ca^{2+} intracelular participa en el incremento de la FBC inducido por LPS, en células ciliadas del epitelio respiratorio.

La activación de receptores del tipo P2Y por ATP extracelular, induce incrementos en Ca^{2+} intracelular. Por lo que evaluamos si la exposición a LPS modifica los niveles de Calcio intracelular mediante la técnica de espectrofluorometría.

Observamos que los niveles citosólicos de Ca^{2+} permanecen constantes en presencia de LPS con respecto al basal, no observamos efectos significativos con la técnica utilizada.

Utilizamos BAPTA-AM y W7, un quelante de Ca^{2+} y un inhibidor de la Calcio-Calmodulina (CaM), respectivamente para evaluar la participación de Ca^{2+} . BAPTA-AM ingresa a la célula, donde es modificado por una esterasa, lo cual la deja retenido en el medio intracelular, actúa como quelante de Ca^{2+} intracelular. W-7 es un inhibidor de la proteína dependiente de Ca^{2+} , CaM (Zagoor y cols., 2001).

Los resultados muestran que la pre-incubación (30 minutos) de los cultivos con BAPTA-AM (5 μM) (Figura 19A) inhibe significativamente (* $p < 0.05$) el incremento de la FBC inducido por LPS 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Observándose que los cultivos tratados previamente con BAPTA-AM muestran un ABC de 375.76 ± 76 y 651.76 ± 22.38 u.a., respectivamente. También evaluamos si BAPTA-AM, modifica los niveles de ATP liberado al extracelular, luego del tratamiento con LPS. Mediante el ensayo de luciferin luciferasa, se observó que la pre exposición a BAPTA-AM induce una disminución en la concentración de ATP extracelular en comparación con los cultivos tratados con LPS (Figura 19B). Los cultivos tratados con BAPTA-AM y posterior exposición a LPS,

tienen niveles de ATP de 61.40 ± 12.65 nM/cm² en comparación a los observados en los cultivos expuestos a LPS: 1495.95 ± 405.17 nM/cm² de ATP. Observándose diferencias significativas entre ambos grupos #p<0.05.

Las células ciliadas pre-incubadas con 5 μ M de W7 (Figura 20) mostraron una disminución significativa en la FBC con respecto a los cultivos tratados con LPS 10 μ g/mL, 166.12 ± 12 y 52.34 ± 47.75 u.a., respectivamente. Estos resultados confirman la participación de Ca²⁺ intracelular en el control de la FBC basal y sugieren que este catión participa como mediador de la respuesta del incremento de la FBC inducido por LPS.

El ion Ca²⁺ es un segundo mensajero importante en la señalización que involucra el incremento de la FBC en respuesta a ATP. Por esto, se determinaron los niveles de calcio intracelular en las células ciliadas expuestas a LPS. Para esto se utilizó la técnica de espectrofluorometría (ver Métodos) en las células ciliadas previamente cargadas con el indicador fluorescente de calcio, Fura 2-AM.

En la Figura 21 se observa que los niveles citosólicos de Ca²⁺ permanecen constantes en presencia de LPS con respecto al basal. Como control se utilizó ATP 10 μ M, demostrando así que las células respondían adecuadamente con movimientos de Ca²⁺ ante estímulos. En la figura 21A se observa una secuencia de imágenes, obtenidas a el tiempo 0, a los 10 minutos post aplicación LPS y luego de aplicar el estímulo control, ATP. Se observa un incremento en la en el Ca²⁺ libre intracelular luego de la aplicación de ATP. En la Figura 21B, se observan graficados la variación de Ca²⁺ obtenidos a través de los análisis de las secuencias de imágenes obtenidas en los experimentos. En

conjunto estos resultados sugieren que Ca^{2+} participa y es importante en el incremento de la FBC inducido por LPS en células ciliadas de epitelio respiratorio.

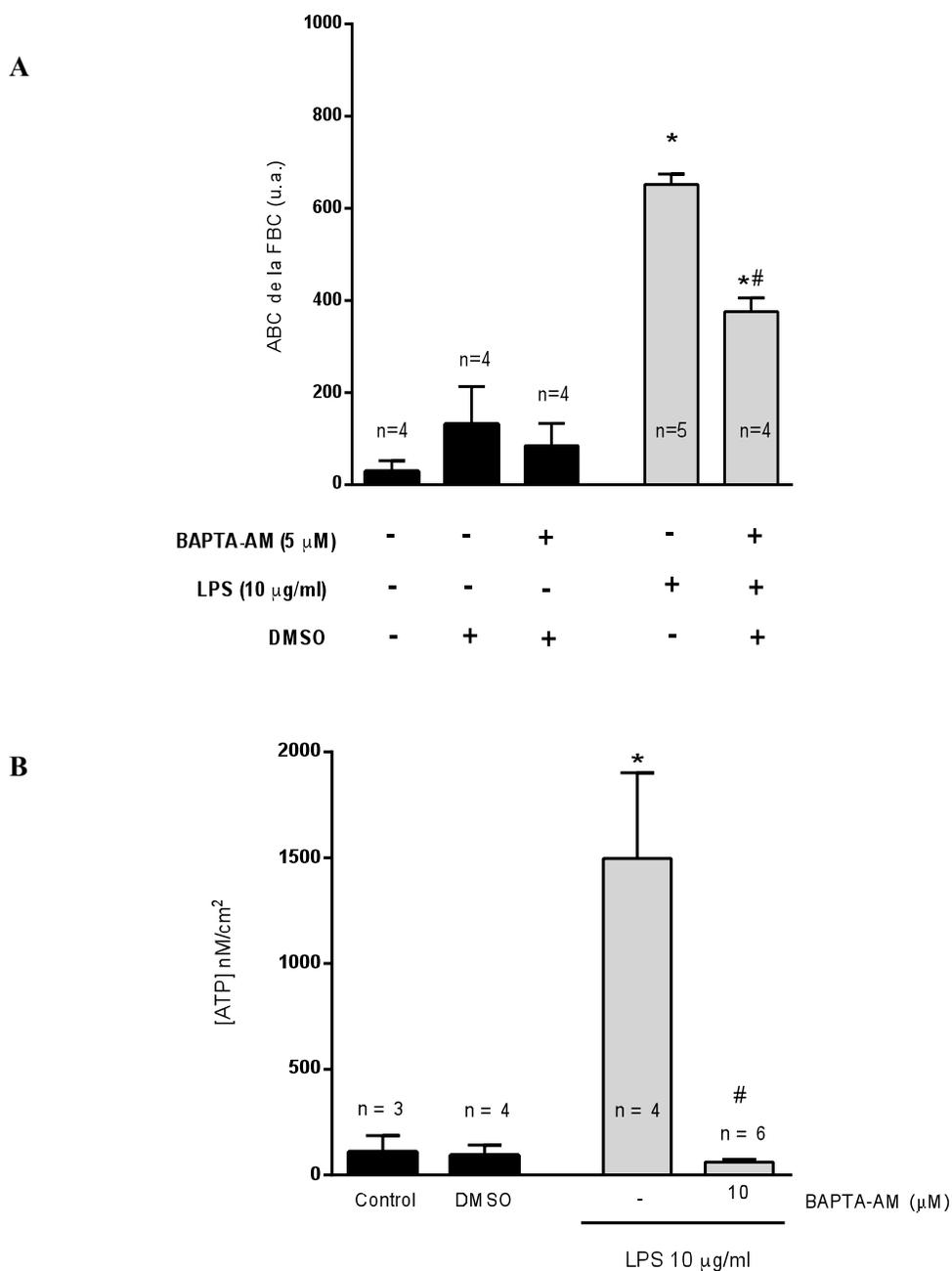


Figura 19. BAPTA-AM, quelador de Ca^{2+} intracelular, afecta el incremento de la FBC inducido por LPS.

A) Área bajo la curva (en unidades arbitrarias, u.a) de la FBC, luego de la pre-incubación de las con Bapta-AM en presencia de LPS. BAPTA-AM reduce el incremento en la FBC inducida por LPS (* $p < 0.05$ versus control; # $p < 0.05$ versus LPS 10 μ g/mL). La FBC fue determinada con la técnica SAVA system

B) Cuantificación de niveles de ATP en muestras de medio de cultivo, luego de pre-incubación con Bapta-AM y posterior exposición a LPS 10 μ g/mL. BAPTA-AM reduce la liberación de ATP inducido por LPS (* $p < 0.05$ versus control; # $p < 0.05$ versus LPS 10 μ g/mL). Niveles de ATP detectados por una técnica luminométrica.

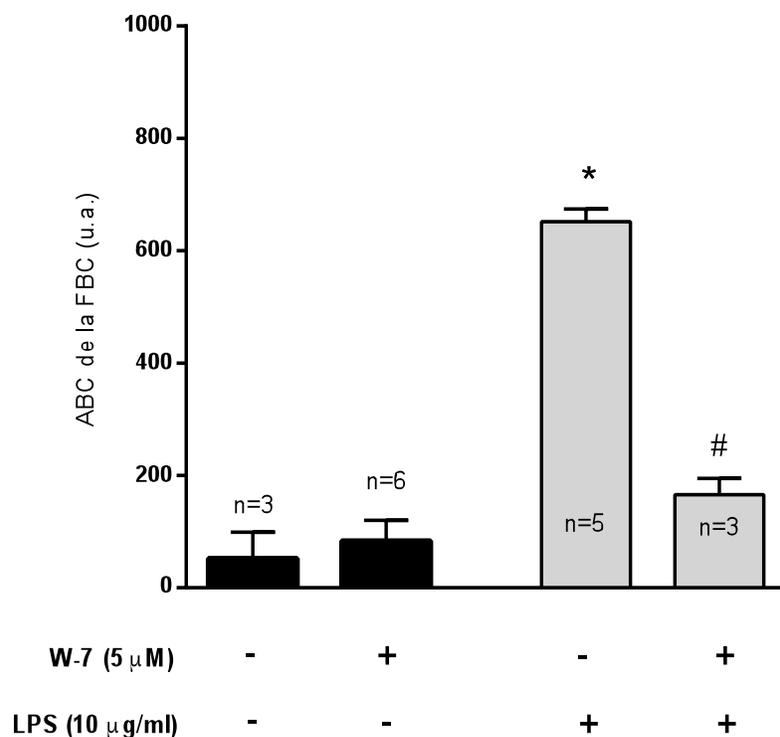


Figura 20. Inhibidor de la Calcio-Calmodulina, W-7 reduce el efecto de LPS sobre la FBC.

Área bajo la curva (en unidades arbitrarias, u.a) de la FBC, luego de la pre-incubación (10 minutos) de las células ciliadas con W-7 en presencia de LPS. W-7 reduce el incremento en la FBC inducido por LPS (* $p < 0.05$ versus control; # $p < 0.05$ versus LPS 10 μ g/ml). La FBC fue determinada con la técnica SAVA system.

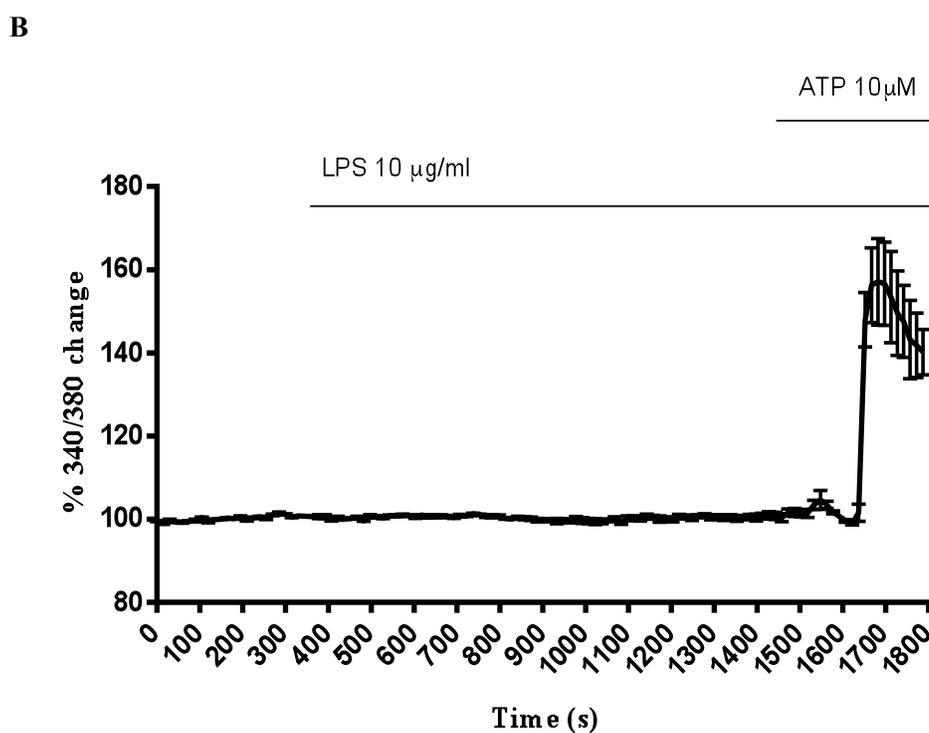
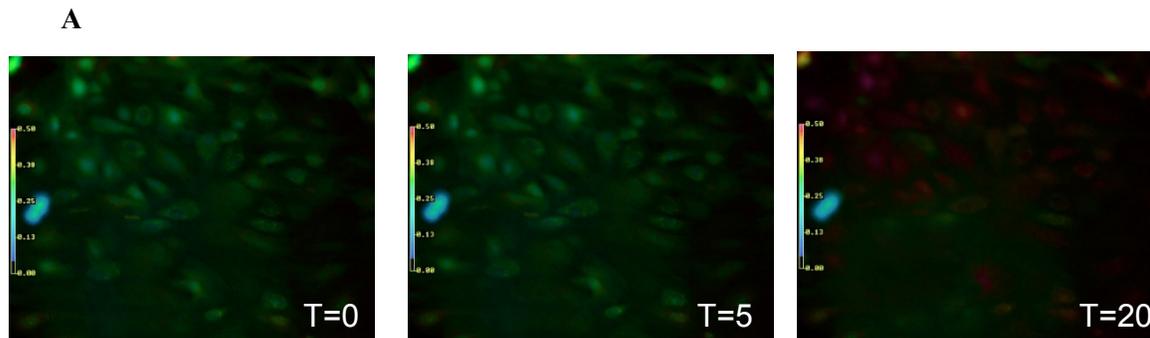


Figura 21. LPS no modifica los niveles de Ca^{2+} libre intracelular, en cultivos primarios de células ciliadas de epitelio respiratorio.

A) Registro de Ca^{2+} intracelular de cultivos celulares de células ciliadas, expuestos a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se observa que los niveles citosólicos de Ca^{2+} permanecen constantes en presencia de LPS con respecto al basal. Como control positivo se utilizó 10 μM de ATP en los cultivos expuestos a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (T=20 min)

B) Los datos están expresados como la razón de intensidades de fluorescencia emitida a 510 nm luego de la excitación secuencial a 349 y 380 nm, en función del tiempo.

III) Óxido nítrico, está involucrado en el aumento en la FBC inducido por LPS, en células ciliadas del epitelio respiratorio.

Dentro de la vía de señalización inducida por P2Y2 se encuentra involucrado el NO, se incrementa su producción activando a PKG, la cual está presente en el axonema ciliar y su actividad puede ser cuantificada en el cilio (Gertsberg y cols., 2004). En la Figura 22, se observa que la pre-incubación (30 minutos) de los cultivos ciliados, con 100 μ M de L-NAME, bloqueó significativamente (* $p < 0.05$) el incremento de la FBC inducido por LPS 10 μ g/mL sobre la FBC, (352.21 ± 19.13 y 651.76 ± 22.38 u.a., respectivamente). Las diferencias respecto al control (52.34 ± 40.59) se consideraron significativas cuando * $p < 0.05$. Sugiriendo que este inhibidor bloquea el incremento en la FBC inducido por LPS.

Dado que nuestros resultados sugieren la participación de las proteínas cinasas en el incremento de la FBC, inducido por LPS. Evaluamos la participación de PKG quien participa en procesos relacionados con incrementos en la FBC (Figura 23). Para esto, incubamos cultivos de células epiteliales ciliadas con 10 μ g/mL de LPS, en presencia o ausencia de KT 5823 (1 μ M), inhibidor selectivo de PKG. Se incubaron los cultivos con KT 5823 durante 30 minutos, posteriormente se adicionó LPS 10 μ g/mL durante 20 minutos. Los datos se graficaron como el área bajo la curva (expresada en unidades arbitrarias, u.a.) de los cursos temporales, tomando en cuenta los 20 minutos que las células expuestas a LPS y a KT 5823. Los datos se graficaron como el área bajo la curva (expresada en unidades arbitrarias, u.a.) de los cursos temporales, tomando en cuenta los 20 minutos que las células expuestas a LPS y a KT 5823. Se observó que el tratamiento

con KT 5823 disminuye el incremento de la FBC inducido por LPS 10 $\mu\text{g/mL}$; 293.98 ± 104.77 u.a. y 651.75 ± 22.38 u.a., respectivamente.

En conjunto, los resultados obtenidos con la utilización de inhibidores específicos de la vía de señalización P2Y, sugieren que esta vía de señalización participa en el incremento de la FBC inducido por LPS.

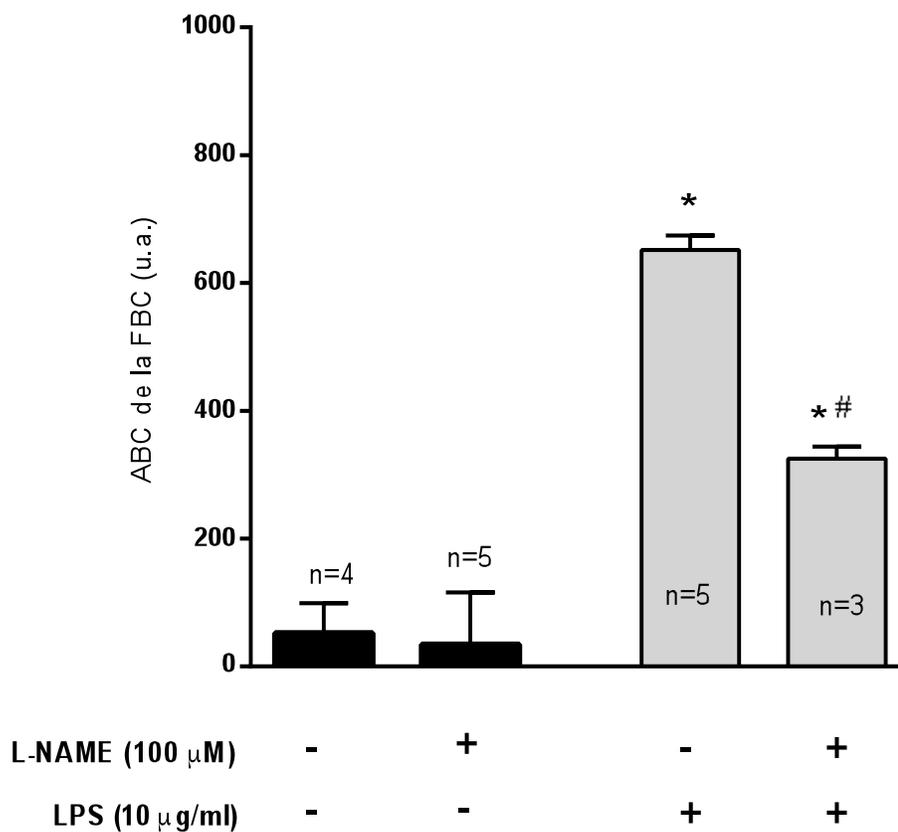


Figura 22. Inhibidor de la óxido nítrico sintasa, L-NAME, previene el aumento en la FBC inducido por LPS.

Área bajo la curva (en unidades arbitrarias u.a) de la FBC luego de la pre-incubación (30 minutos) con L-NAME en presencia de LPS. L-NAME reduce el incremento en la FBC inducido por LPS (* $p < 0.05$ versus control; # $p < 0.05$ versus LPS 10 μ g/mL). La FBC fue determinada con la técnica SAVA system.

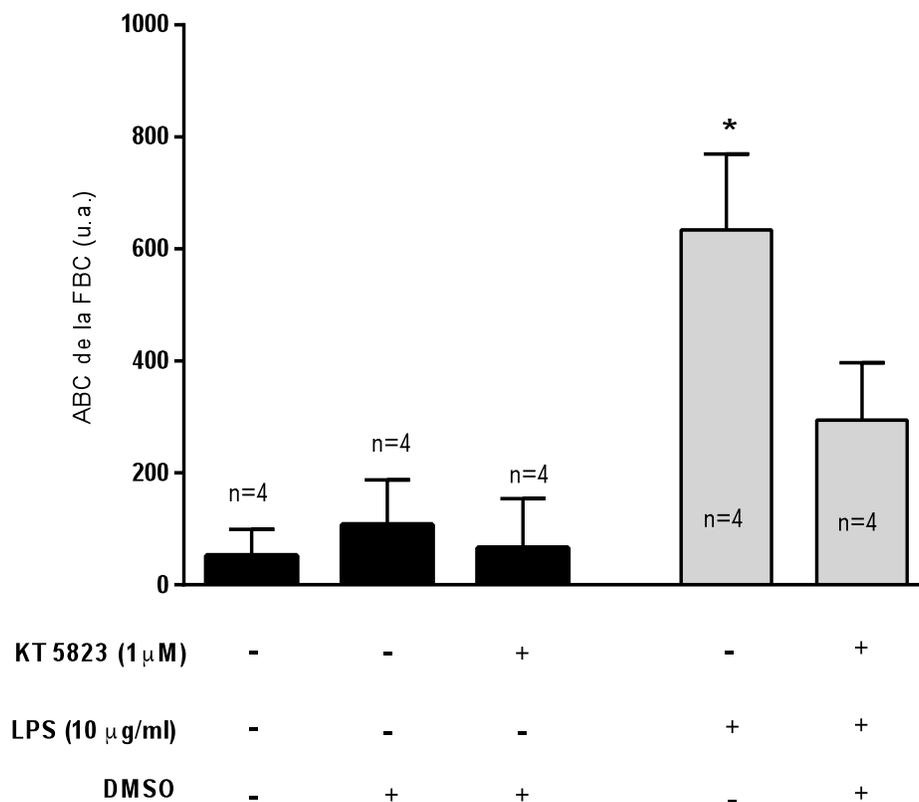


Figura 23. Inhibidor de PKG, KT 5823 previene el aumento en la FBC inducido por LPS.

Área bajo la curva (en unidades arbitrarias, u.a) de la FBC luego de la pre-incubación (30 minutos) con KT 5823 en presencia de LPS. KT 5823 reduce el efecto de LPS sobre la FBC (* $p < 0.05$ versus control). La FBC fue determinada con la técnica SAVA system.

8. MODELO

En base a los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, se propone el siguiente modelo del efecto de LPS sobre el epitelio ciliado respiratorio:

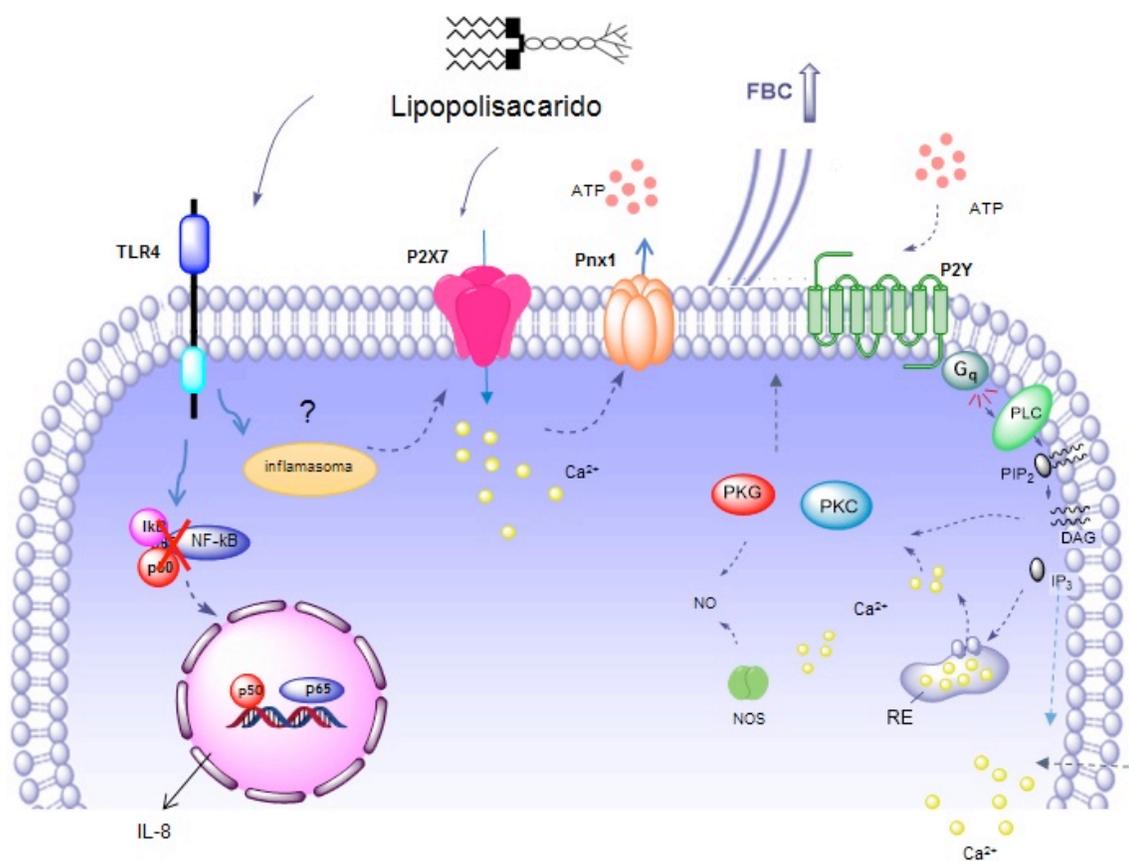


Figura 24. Modelo de señalización y acción de LPS sobre la FBC en cultivos primarios de células ciliadas de epitelio respiratorio.

El incremento de la FBC inducido por LPS depende de ATP extracelular. LPS induce incrementos en la concentración extracelular de ATP, el cual sería liberado mediante la activación de P2X7R, lo que provocaría la apertura de Panx1 por donde se liberaría el ATP. El ATP liberado interactuaría con los receptores del tipo P2Y, lo que generaría una cascada de activación de PKC y PKG, completando la vía de señalización de LPS sobre la FBC, en células ciliadas del epitelio respiratorio.

VIII. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que LPS induce un incremento en la FBC y en el transporte mucociliar en un mecanismo dependiente de incrementos en ATP extracelular, en las células ciliadas de tráquea de ratón.

Se ha demostrado la presencia de LPS en una diversidad de ambientes, como en el interior de hogares y escuelas (Roy y cols., 2003; Jacobs y cols., 2012) por lo que normalmente nos encontramos expuestos a este contaminante. En pacientes con infecciones bacterianas se ha encontrado concentraciones de LPS plasmáticas en el rango de $\approx 40\text{-}50 \mu\text{g/mL}$ (Prins y cols., 1998). Los resultados obtenidos en este estudio, mostraron un incremento en la FBC de manera dependiente de concentración, a concentraciones micromolares de LPS, las que son relevantes en procesos infecciosos.

Dentro de los efectos de LPS descritos en el epitelio respiratorio, encontramos que dosis elevadas de LPS en el rango de miligramos, aplicadas durante un periodo de tiempo prolongado (días), afecta el número de células ciliadas y el número de cilios presentes en ellas, disminuyendo la FBC (Ueda y cols., 2001), lo que puede relacionarse con problemas con el TMC. También en epitelio respiratorio, existen antecedentes que TNF- α , una de las citoquinas producidas luego de la estimulación con LPS (He y cols., 2012), incrementa la FBC en células ciliadas, luego de 24 hrs de incubación (Rhee y cols., 1999). Efectos que se pueden relacionar con la participación de la vía de señalización mediada por TLR4, la que según los antecedentes obtenidos en esta tesis se activa (evaluada por fosforilación de NF- κ B) posterior a las 3 horas de incubación con LPS 10 $\mu\text{g/ml}$. No existiendo evidencia hasta ahora en epitelio respiratorio, de efectos de

LPS a corto plazo con la FBC y el TMC, relacionados con las primeras etapas de una infección.

La FBC y el transporte mucociliar es el primer mecanismo de defensa de las vías respiratorias, donde el transporte de moco y las partículas inhaladas tales como el polvo y las bacterias es fundamental para limpiar las vías respiratorias, evitando la acumulación de sustancias nocivas y partículas que podrían generar enfermedades (Liu Y et al., 2012). Por lo que este incremento en la FBC y en el transporte mucociliar en tiempos tempranos frente a la infección, podría ser parte del mecanismo que se encarga de conducir el moco hacia el orificio de la laringe y las partículas que lleva atrapadas son deglutidos o expulsados al exterior por medio de la tos.

Respecto al incremento en la FBC y en el TMC, evidencia experimental previa indica una relación entre FBC e incrementos en la velocidad de transporte mucociliar, en el que un pequeño incremento en la FBC (16%) se traduce en un importante incremento en la velocidad de transporte mucociliar (56%) (Seybold y cols., 1990). Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la dosis de 10 $\mu\text{g/mL}$ de LPS, incrementa un $32.3 \pm 2.4\%$ la FBC y un 167% la velocidad de transporte de las Mes.

En otros sistemas biológicos como macrófagos, células epiteliales de pulmón y microglías (Sperlagh y cols., 1998; Craddick y cols., 2012 y Ferrari y cols., 2007) se ha establecido que LPS induce incrementos en la liberación de ATP. Nuestros resultados muestran un rápido incremento (minutos) en la concentración de ATP extracelular en presencia de LPS en epitelio respiratorio de ratón.

Se ha descrito que ATP agregado como estímulo, induce incrementos en la FBC en las células ciliadas (Uzlaner y cols., 1999). Utilizamos apirasa, una ectonucleotidasa de ATP, que dehidroliza este nucleótido a ADP y a AMP. Al determinar la FBC en presencia de una concentración de apirasa (10 U/mL) que no afecta la FBC basal, observamos una disminución del efecto observado con LPS. Dosis mayores a 50 U/mL afectan la FBC. Para comprobar que la dosis utilizada de apirasa reduce los niveles de ATP, medimos los niveles mediante la técnica luciferin luciferasa y observamos que posterior al estímulo de LPS y en presencia de apirasa, disminuyen significativamente los niveles de ATP extracelular.

La disminución de la FBC que observamos, luego del tratamiento de apirasa con LPS, no es atribuible a los productos de la hidrólisis del ATP. Antecedentes en la literatura muestran que tanto ADP, como AMP no alteran la FBC (Zhang y cols., 2003). ADP puede interactuar con los receptores del tipo P2Y, lo que puede explicar que no observamos una completa inhibición de la FBC luego de someterlos a apirasa con LPS. Nuestros resultados sugieren que el aumento en los niveles de ATP extracelular es un paso importante en el incremento de la FBC inducido por LPS, apoyando la hipótesis de que LPS aumenta la liberación de ATP que controla la actividad ciliar en las vías respiratorias de ratón.

Para estudiar las vías de señalización involucradas en el efecto de LPS sobre la FBC en células ciliadas de epitelio respiratorio de ratón, inicialmente evaluamos la participación de la vía de señalización TLR. LPS interactúa con TLR4, mediado por CD14 y MD2 e inicia una cascada de señalización, que involucra la participación de NF-

κ B y producción de citoquinas inflamatorias, las cuales a largo plazo están involucradas con incrementos sobre la FBC (Shen y cols., 2012). En esta tesis, corroboramos la expresión de TLR4 en tejido respiratorio, ya que Sha y cols., en el año 2004 demostraron la presencia de los receptores TLR4 en epitelio respiratorio. Utilizando la técnica de RT-PCR y mediante inmunofluorescencia, observamos la expresión del mRNA y la expresión proteica de TLR4 en el tejido de tráquea y en los cultivos primarios de células ciliadas desarrollados a partir del epitelio. Demostrando que en los cultivos utilizados en el desarrollo de la tesis se mantiene la expresión del receptor.

Una de las rutas de señalización activada por LPS luego de su interacción con TLR4, involucra la activación y participación de NF- κ B. Evaluamos el efecto de DEX, un potente glucocorticoide capaz de interferir con la vía NF- κ B. Dentro de los efectos descritos para los glucocorticoides, estos son capaces de interactuar con la vía de señalización TLR a varios niveles: 1.) su unión directa a NF- κ B provocando su inhibición; 2.) unión directa al ADN, impidiendo la interacción con NF- κ B; 3.) inducción de la expresión de IKK inhibidor de NF- κ B y 4.) Incrementando los niveles de ribonucleasas que reducen los niveles de mRNA (Adcock y cols., 2005). También utilizamos un inhibidor específico de NF- κ B: PTDC, en el caso de ambos inhibidores no observamos efecto sobre el incremento de la FBC inducido por LPS. También evaluamos la fosforilación de NF- κ B, como indicador indirecto de su activación. Luego de 3 horas de exposición a LPS 10 μ g/ml observamos fosforilación del factor de transcripción, evento que no se relaciona con la temporalidad observada en el incremento en la FBC inducida por LPS. La fosforilación de IKB es mejor indicador de activación de NF- κ B, debido a que la activación de este factor de transcripción se

produce a través de la fosforilación de I κ B α en Ser32 y Ser36 seguido por la degradación mediada por proteasoma que resulta en la liberación y translocación nuclear de NF- κ B activo (Brown y cols., 1995).

Dentro de los productos de la vía de señalización TLR, se encuentra IL-8, una importante interleucina inflamatoria encargada del reclutamiento de elementos del sistema inmune y relacionada a procesos inflamatorios mediados por infecciones bacterianas Gram negativas (Noah y cols., 1997). Se ha demostrado que IL-8 incrementa la FBC en células ciliadas respiratorias posterior a 24 y 48 horas de exposición (Shen y cols., 2012), pero se desconoce si posee efectos en periodos cortos de exposición. En esta tesis evaluamos el efecto de esta citoquina inflamatoria en periodos cortos de exposición (20 minutos), similares a los que se evaluó el efecto de LPS en la FBC y no observamos incrementos significativos respecto al control con ninguna de las dosis utilizadas (500 pg/mL, 50 ng/mL y 5 μ g/mL).

Los resultados obtenidos anteriormente, sugieren que la activación de NF- κ B, no participaría en el incremento de la FBC inducido por LPS, debido a la temporalidad de su activación. Pero no podemos descartar la participación de receptores NLR o de inflamasomas, que participen como intermediarios entre LPS y el incremento en la FBC. Existe evidencia que los receptores NLR, se complementan con la vía de señalización TLR en la inducción de la respuesta inmune innata (Fukata y cols., 2009). También se ha observado que la activación de TLR4 por LPS induce incrementos en los niveles del inflamasoma NLRP3 de manera dependiente de MyD88 (Embry y cols., 2011) y la

activación de este inflamasoma está relacionado con la activación de la proteína cinasa C (Ho y cols., 2013), lo que podría explicar los incrementos en la FBC inducidos por LPS.

Nuestros resultados sugieren que ATP, puede ser el mediador del incremento de la FBC inducido por LPS, por lo que para determinar las vías de señalización involucradas en el efecto estimulador de la FBC inducido por LPS, evaluamos la participación del receptor P2X7 y del hemicanal Panx1, quienes están relacionados con incrementos en la liberación de ATP (D'hondt y cols., 2011), desde otros sistemas, como los cardiomiocitos (Dolmatova y cols., 2012). Existen antecedentes de que LPS interactúa con P2X7R, el cual posee un sitio conservado de interacción en C-terminal, segmento que parece coordinar eventos en la cascada de señalización, ligados a acciones de LPS en macrófagos (Denlinger y cols., 2001). Recientemente se ha descrito que LPS puede modular la actividad de P2X7R en células HEK293 (que no expresan TLR4). En estas células, LPS es incapaz de inducir alguna actividad relacionada con la activación de P2X7R (Leiva-Salcedo y cols., 2011). Lo que sugiere que LPS requiere la participación de TLR4, para mediar la activación o inducción de activación de P2X7R, que podría involucrar la participación de inflamasomas o receptores NLR.

Primero confirmamos la expresión mediante inmunofluorescencia de P2X7R en los cultivos primarios de epitelio de tráquea, expresión proteica por primera vez reportada, anteriormente solo fue reportada la expresión del ARNm (Kim y cols., 2004). También confirmamos la expresión de Panx1 en epitelio de tráquea mediante inmunofluorescencia, previamente reportada por Ransford y cols., en el 2004.

Para evaluar la participación de P2X7R y Panx1, determinamos la FBC en presencia de antagonistas e inhibidores junto a LPS. Utilizamos suramina, un antagonista de canales purinérgicos no selectivo (von Kügelgen y cols., 2006), en presencia de un antagonista irreversible de P2X7R, α ATP (Murgia y cols., 1993) y en presencia de KN62, un antagonista de los receptores P2X7 (Gargett y cols., 1997). Con la utilización de estos bloqueadores observamos una disminución de la respuesta de FBC a LPS. En el caso de suramina, un antagonista de los receptores purinérgicos, observamos una disminución parcial pero significativa de la FBC, lo que puede explicarse por la dosis utilizada: 100 μ M. Esta dosis es menor que el IC_{50} reportado para P2X7R: $>300 \mu$ M (Pelegri y cols., 2006).

Existen antecedentes en la literatura que relacionan a P2X7R y Panx1 con incrementos en aumentos en el ATP extracelular (Suidicani y cols., 2006). Panx1 actuaría como un canal independiente permeable a moléculas de gran tamaño, el cual sería reclutado por la activación de P2X7R (Faria y cols., 2005) y por donde podría salir ATP al extracelular.

Evaluamos la participación de Panx1 en el incremento de la FBC inducido por LPS, para esto utilizamos cultivos primarios a partir de ratones *knockout* de Panx1 y cultivos tratados con inhibidores de Panx1; probenecid y carbenoxolona, en los cuales determinamos la FBC en respuesta a LPS. Con la utilización de los inhibidores y los cultivos de ratones *knockout*, observamos una disminución en la respuesta a LPS, antecedentes que sugieren que Panx1, participa en el incremento de la FBC inducido por LPS en cultivos primarios de epitelio respiratorio. Para evaluar la apertura funcional de

Panx1, realizamos experimentos de captación del colorante BrEt, el cual por su tamaño y carga, ingresaría principalmente por Panx1 (Schalper y cols., 2008).

En la literatura se propone como mediador de la interacción entre P2X7R y Panx1 a Ca^{2+} , el cual ingresaría a la célula luego de la activación del receptor P2X7 y de este modo activaría a Panx1 (Faria y cols., 2005). En los experimentos mostrados en esta tesis, observamos que la adición de LPS a los cultivos primarios no provocó cambios observables en los niveles intracelulares de Ca^{2+} , en comparación al control (ATP 10 μM). Sin embargo no descartan la posibilidad de que los efectos de LPS sobre la FBC dependan de la activación de microdominios de Ca^{2+} , y no necesariamente del incremento en la concentración intracelular de este catión (Perekh y cols, 2008; Castillo y cols, 2007). En macrófagos se ha demostrado que LPS induce incrementos en la concentración de Ca^{2+} (Seabra y cols., 1998), por lo que tampoco somos capaces de descartar un problema de sensibilidad del sistema de determinación de Ca^{2+} , debido a que mediante esta técnica tampoco fue posible detectar cambios en los niveles de Ca^{2+} intracelular, luego de un estímulo de 1 μM de ATP, a pesar de que en epitelio respiratorio se ha descrito que en el incremento en la FBC inducido por ATP extracelular, incrementos en el Ca^{2+} intracelular son necesarios (Korngreen y cols., 1994).

Para corroborar la participación de Ca^{2+} en el incremento de la FBC por LPS, utilizamos W-7, un inhibidor de la proteína dependiente de Ca^{2+} , Calcio-Calmodulina (CaM), enzima encargada de la homeostasis del Ca^{2+} , ayudando a la recaptación del ion al retículo endoplasmático (Stevens y cols., 1983). También utilizamos BAPTA-AM, el

cual es un quelador de calcio, con una alta selectividad y GF 109203X, inhibidor selectivo de las isoformas de PKC que requieren de Ca^{2+} para su activación. Con la utilización de estos inhibidores determinamos que Ca^{2+} es importante y participa en el incremento de la FBC. También evaluamos incrementos en el ATP extracelular, en presencia de BAPTA-AM y LPS, observando una disminución significativa, lo que apoya el argumento que en nuestro sistema, Ca^{2+} puede ser el mediador entre la activación de P2X7R y la apertura de Panx1.

Para determinar si P2X7R y Panx1, participan en el proceso de liberación de ATP, evaluamos la concentración de ATP en cultivos previamente incubados con los antagonistas de P2X7R (suramina, ATPo y KN-62) e inhibidores de Panx1 (cbx y probenecid). En el caso de los antagonistas de P2X7R, KN62 el antagonista fue con quien se observamos un mayor bloqueo. En todos los casos, observamos una disminución en la concentración de ATP extracelular determinado por la técnica de luciferin luciferasa. Lo que sugiere que LPS, induce incrementos en la concentración de ATP extracelular, mediados por P2X7R y de Panx1, que junto a los resultados anteriores apoyan la participación de estos en los mecanismos de liberación de ATP e incrementos de la FBC.

En los resultados de esta tesis, determinamos que la exposición a LPS induce un incremento en la concentración de ATP extracelular, mediada por la participación de P2X7R y Panx1. Para determinar si el ATP liberado está involucrado en el incremento en la FBC, que se observa luego de la exposición a LPS, evaluamos la participación de la vía de señalización mediada por el receptor P2Y. Los receptores purinérgicos del tipo

P2Y, se encuentran presentes en el epitelio respiratorio (Kim y cols., 2004) y específicamente P2Y2 sería el receptor nucleotídico dominante en el incremento de la FBC en respuesta a ATP en células ciliadas de tráquea de rata (Hayashi y cols., 2005) y de epitelio ciliado nasal humano (Morse y col., 2001). Este receptor, luego de la interacción con ATP, activa a PLC incrementando los niveles de IP₃ y diacilglicerol movilizandando Ca²⁺ de los almacenes intracelulares, lo que incrementa la [Ca²⁺]_i en respuesta a ATP o UTP (Homolya y cols., 1999). Este incremento en el Ca²⁺ intracelular, activa directamente a NOS (Motte y cols., 1995), induciendo la expresión de NO, quien activa a guanilato cilcasa, que cataliza la formación de GTP a cGMP quien activa a PKG (Jiao y cols., 2011), la cual provoca fosforilación de proteínas involucradas en incrementos en la FBC, todos procesos activados luego de incrementos de ATP extracelular. Incrementos en el ATP extracelular en el rango de hasta 100 μM, se relacionan con aumentos en la FBC, mediado por la participación de la vía de señalización del receptor P2Y2 en el epitelio respiratorio (Uzlaner y cols., 1999), por lo que proponemos a este receptor como mediador del incremento de la FBC inducido por LPS, sin poder descartar la participación de otros receptores del tipo P2Y.

Para evaluar la participación de esta vía de señalización, utilizamos inhibidores específicos: GF 109203X un inhibidor de PKC, la cual es activada por incrementos en la concentración de Ca²⁺ intracelular y por diacilglicerol (Uzlaner y cols., 1999), L-NAME inhibidor de la NOS, que impide que se produzca NO evitando la activación de PKG y KT-5823 un inhidor específico de la PKG. Los tres inhibidores reducen drásticamente la FBC inducida por LPS, lo que muestra la importancia de la activación de esta vía de señalización en el efecto de LPS. Pero observamos que ninguno de estos bloqueadores,

reduce completamente la FBC inducida por LPS, por lo que otras vías de señalización pueden estar involucradas, como las activadas por los receptores purinérgicos del tipo P2X (Hayashi y cols., 2005).

En resumen, en esta tesis se demuestra que LPS incrementa la FBC en cultivos primarios de epitelio respiratorio y el TMC de Mes en epitelio de tráquea. Siendo este efecto dependiente de aumento en las concentraciones extracelulares de ATP, mediado por un mecanismo que involucra la participación de P2X7R y Panx1. El ATP liberado luego de la estimulación de LPS interactúa con receptores del tipo P2Y, siendo su vía de señalización encargado del incremento en la FBC en cultivos primarios de epitelio respiratorio en respuesta a LPS. En conjunto, estos antecedentes proveen evidencia del mecanismo por el cual factores ambientales pueden inducir una respuesta fisiológica funcional de defensa.

IX. CONCLUSIONES

LPS es una señal química que participa en la regulación de la actividad del batido ciliar, aumentando la FBC y la velocidad del transporte mucociliar en células ciliadas de tráquea de ratón. LPS induce incrementos en la liberación de ATP en cultivos primarios del epitelio respiratorio de ratón. Este incremento en la concentración extracelular de ATP media el incremento en la FBC y la velocidad de transporte mucociliar.

En el incremento de la liberación de ATP, inducido por LPS participa P2X7R y Panx1, debido a que es prevenido con inhibidores específicos, tales como probenecid y KN-62.

Una vez que el ATP es liberado al medio extracelular, interactúa con los receptores del tipo P2Y, activando la cascada de señalización que involucra la activación de proteínas cinasas, procesos que finalmente median el incremento de la FBC inducido por LPS.

En conclusión, el mecanismo de LPS para incrementar la FBC depende de la liberación de ATP, mediada por la participación de panx1 y P2X7R en cultivos primarios de células ciliadas. Estos antecedentes proveen evidencia del mecanismo por el cual factores ambientales pueden inducir una respuesta fisiológica funcional de defensa.

X. BIBLIOGRAFIA

Abbey DE, Nishino N, McDonnell WF, Burchette RJ, Knutsen SF, Lawrence Beeson W, Yang JX. Long-term inhalable particles and other air pollutants related to mortality in nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 159(2):373-82.

Adcock IM & Ito K. (2005). Glucocorticoid pathways in chronic obstructive pulmonary disease therapy. *Proc Am Thorac Soc.* 2(4):313-9.

Akira S. & Takeda K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 4(7), 499-511.

Alberty J, Stoll W & Rudack C. (2006). The effect of endogenous nitric oxide on mechanical ciliostimulation of human nasal mucosa. *Clin Exp Allergy* 36, 1254-1259.

Anselmi F, Hernandez VH, Crispino G, Seydel A, Ortolano S, Roper SD, Kessar N, Richardson W, Rickheit G, Filippov MA, Monyer H, Mammano F. (2008). ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca²⁺ signals across the inner ear. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(48):18770-5.

Archer AJ, Cramton JL, Pfau JC, Colasurdo G & Holian A. (2004). Airway responsiveness after acute exposure to urban particulate matter 1648 in a DO11.10 murine model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 286(2):L337-43.

Barrera NP, Morales B & Villalón M. (2004). Plasma and intracellular membrane inositol 1,4,5-trisphosphate receptors mediate the Ca²⁺ increase associated with the ATP-induced increase in ciliary beat frequency. *Am J Physiol Cell Physiol.* 287(4):C1114-24.

Bao L, Locovei S, Dahl G. (2004). Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett.* 572(1-3):65-8.

Beis I, Newsholme EA. (1975). The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem J.* ;152(1):23-32.

Beutler B & Poltorak A. (2001). The sole gateway to endotoxin response: how LPS was identified as Tlr4, and its role in innate immunity. *Drug Metab Dispos.* 29 (4 Pt 2):474-8.

Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther.*;112(2):358-404

Burnstock G. (2007). Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci.* 64(12):1471-83.

Button B, Picher M, Boucher RC. (2007). Differential effects of cyclic and constant stress on ATP release and mucociliary transport by human airway epithelia. *J Physiol*; 580(Pt. 2):577-92.

Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U.(2005). Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science.*; 267(5203):1485-8.

Bryant C, Fitzgerald KA. (2009) Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends Cell Biol.*19(9):455-64.

Castillo K, Delgado R, Bacigalupo J. 2007. Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase in the Cilia of Olfactory Receptor Neurons: Possible role on Ca²⁺ clearance. *Eur J Neurosci.* 26: 2524-2531.

Craddick M, Patel R, Lower A, Highlander S, Ackermann M, McClenahan D. (2012). Adenosine-5'-triphosphate release by *Mannheimia haemolytica*, lipopolysaccharide, and interleukin-1 stimulated bovine pulmonary epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012 Sep 15;149(1-2):58-65.

Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H, Kang J, Naus CC, Nedergaard M, (1998). Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22;95(26):15735-40.

Cohen NA. (2006). Sinonasal mucociliary clearance in health and disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl.* 196, 20-6.

Corriden R, Insel PA. (2010). Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Sci Signal.*;3(104).

Daviskas E, Anderson SD, Shaw J, Eberl S, Seale JP, Yang IA, Young IH. Mucociliary clearance in patients with chronic asthma: effects of beta agonists. *Respirology.* 2005;

10(4):426-35.

Denlinger LC, Fisetto PL, Sommer JA, Watters JJ, Prabhu U, Dubyak GR, Proctor RA, Bertics PJ. (2001). Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* 15; 167(4):1871-6.

Dolmatova E, Spagnol G, Boassa D, Baum JR, Keith K, Ambrosi C, Kontaridis MI, Sorgen PL, Sosinsky GE, Duffy HS. (2012). Cardiomyocyte ATP release through pannexin 1 aids in early fibroblast activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* ;303(10):H1208-18.

Diamond G, Legarda D & Ryan LK. (2000). The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol Rev.* 173, 27-38.

Di Virgilio F. (1995). The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol Today.* 16 (11):524-8.

D'hondt C, Ponsaerts R, De Smedt H, Vinken M, De Vuyst E, De Bock M, Wang N, Rogiers V, Leybaert L, Himpens B, Bultynck G. (2011). Pannexin channels in ATP release and beyond: an unexpected rendezvous at the endoplasmic reticulum. *Cell Signal.*; 23(2):305-16.

Embry CA, Franchi L, Nuñez G, Mitchell TC. (2011). Mechanism of Impaired NLRP3 Inflammasome Priming by Monophosphoryl Lipid A. *Sci Signal.* ;4(171).

Elssner A, Duncan M, Gavrillin M, Wewers MD. (2004). A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. *J Immunol.* 172(8):4987-94.

Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. (2002). Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* ;4(8):837-51.

Faria RX, Defarias FP, Alves LA. (2005). Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor? *Am J Physiol Cell Physiol.*; 288(2):C260-71.

Feldman C, Mitchell TJ, Andrew PW, Boulnois GJ, Read RC, Todd HC, Cole PJ & Wilson R. (1990). The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium in vitro. *Microbial Pathogenesis* 9, 275-284.

Ferin J, Oberdorster G & Penney DP. (1992). Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 6, 535-542.

Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM & Maniatis T. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol.* 4(5), 491-6

Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Hanau S, Di Virgilio F. (1997). Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J Exp Med.* 185(3):579-82.

Fraser IP, Stuart L, Ezekowitz RA. TLR-independent pattern recognition receptors and anti-inflammatory mechanisms. (2004). *J Endotoxin Res.* 10(2):120-4.

Gargett CE, Wiley JS. (1997). The isoquinoline derivative KN-62 a potent antagonist of the P2Z-receptor of human lymphocytes. *Br J Pharmacol.* 120(8):1483-90.

Gertsberg I, Hellman V, Fainshtein M, Weil S, Silberberg SD, Danilenko M & Priel Z. (2004). Intracellular Ca²⁺ regulates the phosphorylation and the dephosphorylation of ciliary proteins via the NO pathway. *The Journal of general physiology* 124, 527-540.

Gonzalez C, Sanchez T, Fonseca X & Villalon M. (2007). Primary culture of human adenoid ciliated cells. An experimental model to evaluate ciliary activity *in vitro*. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello* 2007; 67: 99-107.

Hansen M, Boitano S, Dirksen ER & Sanderson MJ. (1993). Intercellular calcium signaling induced by extracellular adenosine 5'-triphosphate and mechanical stimulation in airway epithelial cells. *Journal of cell science* 106 (Pt 4), 995-1004.

Hayashi T, Kawakami M, Sasaki S, Katsumata T, Mori H, Yoshida H, Nakahari T. (2005). ATP regulation of ciliary beat frequency in rat tracheal and distal airway epithelium. *Exp Physiol.* ; 90(4):535-44.

He X, Shu J, Xu L, Lu C, Lu A. (2012). Inhibitory effect of Astragalus polysaccharides on lipopolysaccharide-induced TNF- α and IL-1 β production in THP-1 cells. *Molecules.*17(3):3155-64.

Ho CL, Lin CY, Ka SM, Chen A, Tasi YL, Liu ML, Chiu YC, Hua KF. (2013). Bamboo Vinegar Decreases Inflammatory Mediator Expression and NLRP3 Inflammasome Activation by Inhibiting Reactive Oxygen Species Generation and Protein Kinase C- α/δ Activation. *PLoS One.*; 8(10):e75738.

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K & Akira S.(1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive

to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol.* 162(7), 3749-52.

Homolya L, Watt WC, Lazarowski ER, Koller BH & Boucher RC. (1999). Nucleotide-regulated calcium signaling in lung fibroblasts and epithelial cells from normal and P2Y (2) receptor (-/-) mice. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 26454-26460.

Imler JL & Zheng L. (2004). Biology of Toll receptors: lessons from insects and mammals. *J Leukoc Biol* 75, 18-26.

Jacobs JH, Krop EJ, Wind SD, Spithoven J, Heederik DJ. (2012). Endotoxin levels in homes and classrooms of Dutch school children and respiratory health. *Eur Respir J.*

Jain B, Rubinstein I, Robbins RA & Sisson JH. (1995). TNF-alpha and IL-1 beta upregulate nitric oxide-dependent ciliary motility in bovine airway epithelium. *The American Journal of Physiology* 268, L911-917.

Jeffery PK & Li D. (1997). Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. *Eur Respir J* 10, 1655-1662.

Jiang Z, Mak TW, Sen G & Li X. (2004). Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(10), 3533-8.

Jiao J, Wang H, Lou W, Jin S, Fan E, Li Y, Han D, Zhang L. (2011). Regulation of ciliary beat frequency by the nitric oxide signaling pathway in mouse nasal and tracheal epithelial cells. *Exp Cell Res.* ; 317(17):2548-53.

Kanthakumar K, Taylor G, Tsang KW, Cundell DR, Rutman A, Smith S, Jeffery PK, Cole PJ & Wilson R. (1993). Mechanisms of action of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin on human ciliary beat in vitro. *Infection and Immunity* 61, 2848-2853.

Kanneganti TD, Lamkanfi M, Kim YG, Chen G, Park JH, Franchi L, Vandenabeele P & Nunez G. (2007). Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity* 26, 433-443.

Kawakami M, Nagira T, Hayashi T, Shimamoto C, Kubota T, Mori H, Yoshida H & Nakahari T. (2004). Hypo-osmotic potentiation of acetylcholine-stimulated ciliary beat

frequency through ATP release in rat tracheal ciliary cells. *Experimental Physiology* 89, 739-751.

Kim CH, Kim SS, Choi JY, Shin JH, Kim JY, Namkung W, Lee JG, Lee MG & Yoon JH. (2004). Membrane-specific expression of functional purinergic receptors in normal human nasal epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287, L835-842.

King M, Rubin BK. Pharmacological approaches to discovery and development of new mucolytic agents. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54(11):1475–1490.

König P, Krain B, Krasteva G & Kummer W. (2009). Serotonin increases cilia-driven particle transport via an acetylcholine-independent pathway in the mouse trachea. *PLoS One*. 2009;4(3):e4938. doi: 10.1371.

Korngreen, A. & Priel, Z. (1994). Simultaneous measurement of ciliary beating and intracellular calcium. *Biophysical Journal* 67, 377—380.

Knorst MM, Kienast K, Riechelmann H, Müller-Quernheim J, Ferlinz R. (1994). Effect of sulfur dioxide on mucociliary activity and ciliary beat frequency in guinea pig trachea. *Int Arch Occup Environ Health*.; 65(5):325-8.

Ma W, Korngreen A, Weil S, Cohen EB, Priel A, Kuzin L & Silberberg SD. (2006). Pore properties and pharmacological features of the P2X receptor channel in airway ciliated cells. *The Journal of Physiology* 571, 503-517.

Martinon F, Tschopp J. (2007) Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* ;14:10–22.

Morse DM, Smullen JL & Davis CW. (2001). Differential effects of UTP, ATP, and adenosine on ciliary activity of human nasal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C1485-1497.

Motte, S., Communi, D., Piroton, S. & Boeynaems, J. M. (1995). Involvement of multiple receptors in the actions of extracellular ATP: the example of vascular endothelial cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 27, 1—7.

Murgia M, Hanau S, Pizzo P, Ripa M & Di Virgilio F.(1993). Oxidized ATP. An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P2Z receptor. *J Biol Chem*. 15; 268(11):8199-203.

Nakahari T. (2007). Regulation of ciliary beat frequency in airways: shear stress, ATP action, and its modulation. *American journal of physiology* 292, L612-613.

Noah TL, Black HR, Cheng PW, Wood RE & Leigh MW. (1997). Nasal and bronchoalveolar lavage fluid cytokines in early cystic fibrosis. *J Infect Dis.*; 175(3):638-47.

Leiva-Salcedo E, Coddou C, Rodríguez FE, Penna A, Lopez X, Neira T, Fernández R, Imarai M, Rios M, Escobar J, Montoya M, Huidobro-Toro JP, Escobar A, Acuña-Castillo C. (2011). Lipopolysaccharide inhibits the channel activity of the P2X7 receptor. *Mediators Inflamm.* 2011;2011:152625.

Li D, Shirakami G, Zhan X, Johns RA. (2000). Regulation of ciliary beat frequency by the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate signaling pathway in rat airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 23(2):175-81.

Lipmann F (1941). *Adv. Enzymol.* 1: 99–162.

Liu Y & Di YP. (2012). Effects of second hand smoke on airway secretion and mucociliary clearance. *Front Physiol.* 3:342.

Locovei S, Wang J, Dahl G. (2006). Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett.* 580(1):239-44.

Ma W, Korngreen A, Weil S, Cohen EB, Priel A, Kuzin L & Silberberg SD. (2006). Pore properties and pharmacological features of the P2X receptor channel in airway ciliated cells. *The Journal of Physiology* 571, 503-517.

North RA. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* 82(4):1013-67.

Okada SF, Ribeiro CM, Sesma JI, Seminario-Vidal L, Abdullah LH, van Heusden C, Lazarowski ER, Boucher RC. (2013) Inflammation Promotes Airway Epithelial ATP Release via Calcium-Dependent Vesicular Pathways. *Am J Respir Cell Mol Biol.*

Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T & Seya T (2003) TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol.* 4, 161–167.

Pelegri P and Surprenant A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.*; 25(21):5071-82.

Raetz CR, Whitfield C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002; 71:635-700.

Parekh AB. (2008). Ca²⁺ microdomains near plasma membrane Ca²⁺ channels: impact on cell function. *J Physiol.* ; 586(13):3043-54.

Peters A, Wichmann HE, Tuch T, Heinrich J & Heyder J. (1997). Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 155, 1376-1383.

Prins JM, Lauw FN, Derkx BH, Speelman P, Kuijper EJ, Dankert J, van Deventer SJ. (1998). Endotoxin release and cytokine production in acute and chronic meningococcaemia. *Clin Exp Immunol.*; 114(2):215-9.

Raetz CR & Whitfield C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry* 71, 635-700.

Ralevic, V. and G. Burnstock, (1998), Receptors for purines and pyrimidines, *Pharmacol Rev* 50, 413.

Ransford GA, Fregien N, Qiu F, Dahl G, Conner GE, Salathe M. 2004. Pannexin 1 contributes to ATP release in airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 41(5):525-34.

Restrepo RD. Inhaled adrenergics and anticholinergics in obstructive lung disease: do they enhance mucociliary clearance? (2007) ; *Respir Care.* 52(9):1159-73; discussion 1173-5.

Rhee CS, Hong SK, Min YG, Lee CH, Lee KS, Ahn SH, Park KS & Yi WJ. (1999). Effects of IL-1 beta, TNF-alpha, and TGF-beta on ciliary beat frequency of human nasal ciliated epithelial cells in vitro. *Am J Rhinol.*;13(1):27-30.

Roy SR, Schiltz AM, Marotta A, Shen Y & Liu AH. (2003). Bacterial DNA in house and farm barn dust. *J Allergy Clin Immunol.* 112(3), 571-8.

Ruland J. (2011) Return to homeostasis: downregulation of NF-kB responses. *Nat Immunol.* 12(8):709-14.

Rubin BK. The pharmacologic approach to airway clearance: mucoactive agents. *Respir Care* 2002; 47(7):818-822.

Saano V, Virta P, Joki S, Nuutinen J, Karttunen P, Silvasti M. (1992) ATP induces respiratory ciliostimulation in rat and guinea pig in vitro and in vivo. *Rhinology.* ; 30(1):33-40.

Seabra V, Stachlewitz RF, Thurman RG (1998). Taurine blunts LPS-induced increases in intracellular calcium and TNF-alpha production by Kupffer cells. *J Leukoc Biol.* 64(5):61521.

Seminario-Vidal L, Okada SF, Sesma JI, Kreda SM, van Heusden CA, Zhu Y, Jones LC, O'Neal WK, Penuela S, Laird DW, Boucher RC, Lazarowski ER. (2011). Rho signaling regulates pannexin 1-mediated ATP release from airway epithelia. *J Biol Chem.*; 286(30):26277-86.

Seybold ZV, Mariassy AT, Stroh D, Kim CS, Gazeroglu H & Wanner A. (1990). Mucociliary interaction in vitro: effects of physiological and inflammatory stimuli. *J Appl Physiol.* 68(4):1421-6.

Sisson JH, Stoner JA, Ammons BA & Wyatt TA. (2003). All-digital image capture and whole-field analysis of ciliary beat frequency. *J Microsc.*; 211(Pt 2): 103-111.

Schwiebert EM, Zsembery A.. (2003). Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *mBiochim Biophys Acta.*; 1615(1-2):7-32.

Schalper KA, Palacios-Prado N, Orellana JA, Sáez JC. (2008). Currently used methods for identification and characterization of hemichannels. *Cell Commun Adhes.*; 15(1):207-18.

Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, Beck LA & Schleimer RP. (2004). Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 31, 358-364.

Schreck R, Meier B, Männel DN, Dröge W & Baeuerle PA. (1992). Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J Exp Med.* 1; 175(5):1181-94.

Shen JC, Chen B & Cohen NA. (2012). Keratinocyte chemoattractant (interleukin-8) regulation of sinonasal cilia function in a murine model. *Int Forum Allergy Rhinol.*;2(1):75-9.

Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med.*; 189(11):1777-82.

Sperlágh B, Haskó G, Németh Z & Vizi ES. (1998). ATP released by LPS increases nitric oxide production in raw 264.7 macrophage cell line via P2Z/P2X7 receptors. *Neurochem Int.* ;33(3):209-15.

Stevens FC. (1983). Calmodulin: an introduction. *Can J Biochem Cell Biol.*;61(8):906-10.

Suadicaní SO, Brosnan CF, Scemes E. (2006). P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling. *J Neurosci.* 1;26(5):1378-85.

Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T & Akira S. (2000). Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol.* 12(1), 113-7.

Traenckner EB, Pahl HL, Henkel T, Schmidt KN, Wilk S, Baeuerle PA. (1995). Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J.* ;14(12):2876-83.

Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E & Loriolle F., (1991) The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem.* 25;266(24):15771-81.

Ueda T, Takumida M, Takeno S, Tashiro T, Kawamoto H, Yajin K. (2001). Functional role of nitric oxide in the nasal mucosa of the guinea pig after instillation with lipopolysaccharide. *Acta Otolaryngol.* 121(4):510-6.

Uzlaner N & Priel Z. (1999). Interplay between the NO pathway and elevated [Ca²⁺]_i enhances ciliary activity in rabbit trachea. *J Physiol.* ;516 (Pt 1):179-90.

Vallabhapurapu S & Karin M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 27, 693-733.

Van der Baan B. (2000). Ciliary function. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* ; 54(3):293-8.

Verdugo P. (1980). Ca²⁺-dependent hormonal stimulation of ciliary activity. *Nature* 283, 764-765.

Verdugo P. (1991). Mucin exocytosis. *The American Review of Respiratory Disease* 144, S33-37.

Villalón, M., Hinds, T. R. & Verdugo, P. (1989). Stimulus-response coupling in mammalian ciliated cells. Demonstration of two mechanisms of control for cytosolic $[Ca^{2+}]$. *Biophys J* 56, 1255-8.

Von Kügelgen I. (2006). Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther.* 110(3):415-32.

Wang J, Matsukura S, Watanabe S, Adachi M & Suzaki H. (2007). Involvement of Toll-like receptors in the immune response of nasal polyp epithelial cells. *Clin Immunol.*

Wilson R, Pitt T, Taylor G, Watson D, MacDermot J, Sykes D, Roberts D & Cole P. (1987). Pyocyanin and 1-hydroxyphenazine produced by *Pseudomonas aeruginosa* inhibit the beating of human respiratory cilia in vitro. *J Clin Invest.*; 79(1):221-9.

Xu Y, Tao X, Shen B, Horng T, Medzhitov R, Manley JL & Tong L. (2000). Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* 2; 408(6808):111-5.

Yang YH, Lai HJ, Huang CM, Wang LC, Lin YT, Chiang BL. (2004). Sera from children with active Henoch-Schönlein purpura can enhance the production of interleukin 8 by human umbilical venous endothelial cells. *Ann Rheum Dis.* 63(11):1511-3.

Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K & Akira S (2002) Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol.* 169: 6668–6672.

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K & Akira S. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* 301(5633), 640-3.

Zagoor O, Braiman A, Gheber L, Priel Z. (2001). Role of calcium and calmodulin in ciliary stimulation induced by acetylcholine. *Am J Physiol Cell Physiol.* 280(1):C100-9.

Zhang L, Sanderson MJ. (2003). Oscillations in ciliary beat frequency and intracellular calcium concentration in rabbit tracheal epithelial cells induced by ATP. *J Physiol.* 546 (Pt 3):733-49.

Zhao KQ, Cowan AT, Lee RJ, Goldstein N, Droguett K, Chen B, Zheng C, Villalon M, Palmer JN, Kreindler JL & Cohen NA.(2012). Molecular modulation of airway epithelial ciliary response to sneezing. *FASEB J.*; 26(8):3178-87.