

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**"PARTICIPACIÓN DE LA CINASA DE PROTEÍNA C Y LA
CINASA DE TIROSINA EN LA HIPERREACTIVIDAD
INDUCIDA POR EL LEUCOTRIENO D₄ A LA HISTAMINA EN
TIRAS DE MÚSCULO LISO TRAQUEAL DE BOVINO"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN INVESTIGACIÓN EN MEDICINA
P R E S E N T A :
M en C. VERÓNICA E. CARBAJAL SALINAS

Director de la Tesis

DR. LUIS MANUEL MONTAÑO R.

Codirector de la Tesis

DR. FRANCISCO J. FLORES M.

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE 2006

ESTA TESIS SE REALIZÓ EN :

- 1. El Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). México, D.F.**
- 2. En el departamento de Autoinmunidad del INER. México, D.F.**
- 3. Departamento de Farmacología, Fac. de Medicina, UNAM, México, D.F.**

Bajo la dirección del:

Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez

Y la asesoría de los miembros del comité tutorial:

Dr. Francisco J. Flores Murrieta

Dr. Guillermo M. Ceballos Reyes

Dr. Carlos Castillo Henkel

Dr. Enrique Castillo Henkel

Dra. G. Cleva Villanueva López

Financiada con apoyos de:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, No. Exp. 90726).

Merck Sharp & Dhome

DGAPA, UNAM (IN210005-2)

DEDICATORIA

A mi esposo Víctor Hugo Morales Serrano

A mis Padres: Juan Carbajal Roldán y Virginia Salinas (†)

A mis hermanos: Juan Carlos, Guillermo, Luz María, Beatriz, Armando y Jaime

A mis sobrinos: Richard, Vicky, Lis, Karen, Juanito, Joaquín, Carlos, Luz Elena, Edgar, Adrián, Amairan, Steve e Itzel.

A mi profesor y abuelito: José Luis Sánchez Acenjo (†)

A mi amiga y hermana Mildret Ayala Virgen

A Karla, Ana Celia, Raymundo, Mike, Maty, Juan Martínez, Yoli Morales, Rosalba Flores y Leonor Pérez

A ti que cada mañana me despiertas con el canto de un pajarillo, que en cada oración que te digo tocas mi cabeza y siento tu presencia. Y que siempre me ayudas a levantarme ante las pruebas aún cuando siento que no las puedo pasar.

Gracias Señor por que lo único que necesito en este mundo es tu amor a mi vida.

2ª Crónicas 1: 10

Por tanto, dame sabiduría y conocimiento

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez, por su interés y apoyo incondicional en mi formación como doctor. Agradezco toda su enseñanza y paciencia, sobre todo por su gran calidad humana.

Al Dr. Francisco J. Flores Murrieta, por creer en mí y darme su apoyo, en esta etapa de mi vida.

Al Dr. Guillermo M. Ceballos Reyes, por transmitir a mi vida mucha confianza, paciencia y darme una enseñanza de calidad.

Agradezco al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) por permitirme el uso de sus instalaciones y material químico para la realización de esta tesis.

A la Dra. Blanza Bazán Perkins, por su valiosa amistad y la motivación a mi vida para la realización de esta tesis.

Al Q.C. Edgar Flores Soto por su ayuda en la técnica de célula única para la culminación de esta tesis.

Agradezco al Sr. Eligio Torres Santana y al personal de transporte del INER por su disposición en traer las muestras de tráquea de bovino del rastro de temamatla para la realización de esta tesis.

Al Dr. Erasmo Martínez Cordero, por su ayuda en la realización de la técnica de Western Blot en su laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio: a Blanca Bázan, Paty Segura, Betina Sommer, Paty Campos, Edgar Flores, Jaime Chávez, Jose Luis Arreola y Eduardo Calixto.

A la Sra. Antonia Rodríguez por su apoyo técnico.

A mis amigas: Liliana, Juanita, Mariana y Diana.

INDICE

	Página
GLOSARIO	11
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE TABLAS	16
RESUMEN	17
ABSTRACT	18
INTRODUCCIÓN	19
Aparato Respiratorio	20
Regulación del calibre de la vía aérea	22
Inflamación de las vías aéreas	23
Mecanismo de contracción en el músculo liso de las vías aéreas (MLVA).....	24
Leucotrienos	27
Biosíntesis de leucotrienos	28
JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	30
HIPÓTESIS	30
OBJETIVOS	31
MATERIAL Y MÉTODOS	32
1. ÓRGANOS AISLADOS	32
2. MEDICIONES SIMULTÁNEAS	33
3. MEDICIÓN DE [Ca²⁺]_i EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO TRAQUEAL DE BOVINO.....	35

a)	Disgregación de células musculares lisas	35
b)	Microfluorometría	35
4.	MEDICIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE ERK-1 Y ERK-2..	37
a)	Obtención de muestras de músculo liso	37
b)	Extracción de proteínas	37
c)	Electroforesis	37
d)	Electrotransferencia	38
e)	Inmunodetección	38
	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	39
	FÁRMACOS	39
	RESULTADOS	40
1.	ESTUDIOS FUNCIONALES EN ÓRGANOS AISLADOS	40
a)	Presencia funcional de receptores a leucotrienos (LTs) en el músculo liso traqueal de bovino.....	40
b)	Efecto del LTC ₄ y LTD ₄ sobre la sensibilidad del MLVA de bovino al carbacol o a la histamina.	42
2.	MEDICIONES SIMULTÁNEAS DE Ca²⁺ INTRACELULAR Y CONTRACCIÓN	44
a)	Efecto del LTD ₄ sobre los cambios de [Ca ²⁺] _i y contracción inducido por histamina, carbacol y KCl.....	44

b) Efecto de los diferentes inhibidores de cinasas sobre el aumento a la reactividad a histamina inducido por el LTD ₄	48
c) Efecto de la genisteína sobre la hiperreactividad inducida por el LTD ₄ a KCl.	48
d) Participación de los canales de Ca ²⁺ tipo L en la respuesta de carbacol o de histamina en tiras de músculo liso traqueal de bovino.	50
3. MEDICIÓN DE [Ca ²⁺] _i EN CÉLULAS ÚNICAS DE MLVA DE BOVINO.....	51
a) Efecto del LTD ₄ sobre los cambios de [Ca ²⁺] _i inducido por histamina o carbacol en células de MLVA de bovino.....	51
b) Efecto del ácido ciclopiazónico (CPA) sobre la actividad de la ATPasa de Ca ²⁺ del retículo sarcoplásmico.	51
c) Efecto del LTD ₄ sobre la actividad de la ATPasa de Ca ²⁺ del RS en células únicas de MLVA de bovino.....	52
4. DETERMINACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE ERK 1/2 EN TIRAS DE MUSCULO LISO TRAQUEAL MEDIANTE ANÁLISIS DE WESTERN-BLOT.....	54
a) Participación de la vía de la cinasa de tirosina (TK) en la hiperreactividad inducida por el LTD ₄ a la histamina.....	54

DISCUSIÓN	56
CONCLUSIONES	63
PERSPECTIVAS	64
REFERENCIAS	65
ANEXO I	72

GLOSARIO

[Ca ²⁺] _i	concentración de calcio intracelular
5-HPETE	5-hidroxiperoxieicosatetraenoico
5-LO	5- lipoxigenasa
AMPC	monofosfato de adenosina cíclica
ATPasa	adenosintrifosfatasa
Ca ²⁺	calcio
Cch	carbacol
CE ₅₀	concentración efectiva 50%
COX	ciclooxigenasa
CPA	ácido ciclopiazónico
cPLA ₂	fosfolipasa A ₂ citosólica
CTL	control
D600	hidrocloruro de methoxyverapamil
DMSO	dimetil sulfoxido
E ₁	primera estimulación
E ₂	segunda estimulación
EGTA	etilen glicol-bis (β-aminoetil eter) N, N, N', N' ácido tetraacético
ERK	cinasa regulada extracelularmente
FEV ₁	volumen expiratorio forzado al primer segundo
FLAP	proteína activadora de la 5-lipoxigenasa
Fura-2 AM	fura-2 con grupo acetoximetilo
GEN	genisteína
GGLT	enzima γ-glutamyl-leucotrienasa
GMPc	guanosin monofosfato ciclico
His	histamina
IgE	inmunoglobulina E
IL	interleucina
IP ₃	1,4,5 trifosfato de inositol
IP ₃ R	receptor de 1, 4, 5-inositol trifosfato

K ⁺	potasio
KCl	cloruro de potasio
K _d	constante de disociación
KDa	kilo daltones
L-CIS	L-cisteína
LT	leucotrieno
LTA ₄	leucotrieno A ₄
LTA ₄ H	leucotrieno A ₄ hidrolasa
LTA ₄ S	leucotrieno A ₄ sintasa
LTB ₄	leucotrieno B ₄
LTC ₄	leucotrieno C ₄
LTD ₄	leucotrieno D ₄
LTE ₄	leucotrieno E ₄
LTs	leucotrienos
MAPK	cinasa de proteína activada por mitógeno
mg/ml	miligramos/mililitro
MLCK	cinasa de la cadena ligera de miosina
MLCP	fosfatasa de la cadena ligera de miosina
MLVA	músculo liso de las vías aéreas
mM	miliMolar
MRPI	proteína asociada a resistencia a multidroga
NANC	Sistema nervioso no adrenérgico no colinérgico
nm	nanómetros
PAF	factor de activación plaquetaria
PC ₂₀	concentración provocativa 20%
PGD ₂	prostanglandina D ₂
PKA	proteína cinasa A
PKC	cinasa de proteína C
PKG	proteína cinasa G
PTI	photon technology internacional
R	cociente de fluorescencia basal 340/380

Rmax	cociente de fluorescencia máxima 340/380
Rmin	cociente de fluorescencia mínima 340/380
RS	retículo sarcoplásmico
RyR	receptor de ryanodina
SDS	dodecilsulfato de sodio
Ser 19	serina en la posición 19 de la miosina
SP	substancia P
TBS	buffer salino-Tris
TEMED	N, N, N', N' – tetrametilendiamina
TK	cinasa de tirosina
TNF- α	factor de necrosis tumoral alfa
TXA ₂	tromboxano A ₂
U/mL	unidades por mililitro
U-46619	análogo de TXA ₂
VDCC	canales de Ca ²⁺ tipo L dependientes de voltaje
VIP	péptido vasoactivo intestinal

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Cambio del FEV₁ inducido por diferentes concentraciones de metacolina inhalada en pacientes con asma moderada y severa vs individuos sanos. El valor de PC₂₀ esta calculado por interpolación de la caída en un 20% del FEV₁ vs la concentración de metacolina. La PC₂₀ en los sujetos asmáticos es mucho menor en comparación con los individuos sanos, indicando un incremento en la reactividad de las vías aéreas en el caso de los asmáticos (O'Byrne y col., 2003)..... **20**
- Figura 2.** Corte transversal de un bronquio de perro (tomado de Montaña y col., 1996). **22**
- Figura 3.** Biosíntesis de leucotrienos y sus acciones. La activación celular de una célula cebada o macrófago por complejos antígeno-inmunoglobulina E (IgE), ionóforos u otros estímulos permite que una cascada de eventos celulares se activen para que la biosíntesis de leucotrienos ocurra (Funk CD.,2001). **29**
- Figura 4.** A) Efecto del LTC₄ y LTD₄ sobre tiras de músculo liso traqueal de bovino y B) efecto del LTD₄ (32 nM) sobre célula única de músculo liso traqueal de bovino. L= lavado. C) Amplificación de la señal de Ca²⁺ inducida por el LTD₄..... **40**
- Figura 5.** Efecto del MK-571, antagonista del receptor CysLT1, en el MLVA de bovino. A) Curva concentración-respuesta a el LTD₄ (3.2 a 100 nM) y B) en presencia de MK-571 (100 nM)..... **41**
- Figura 6.** A) Efecto del LTC₄ (10 nM) y del LTD₄ (32 nM), en la reactividad del músculo liso traqueal al carbacol. El LTC₄ y LTD₄ se preincubaron durante 30 min. B) Logaritmo negativo de la concentración efectiva 50 % (Log CE₅₀) a el carbacol con y sin LTC₄ o LTD₄. **42**
- Figura 7.** A) Efecto del LTC₄ (10 nM) y del LTD₄ (32 nM), en la reactividad del músculo liso traqueal a la histamina. El LTC₄ y LTD₄ se preincubaron durante 30 min. B) Logaritmo negativo de la concentración efectiva 50 % (Log CE₅₀) a la histamina con y sin LTC₄ o LTD₄. * p < 0.05. **43**

- Figura 8.** Efecto de la L-cisteína (L-CIS) + LTD₄ y L-cisteína, en la reactividad del músculo liso traqueal a la histamina. La L-CIS y LTD₄ se preincubaron durante 30 min. B) Logaritmo negativo de la concentración efectiva 50 % (Log CE₅₀) a la histamina con y sin L-CIS o L-CIS + LTD₄. * p < 0.05. 44
- Figura 9.** Registros típicos de mediciones simultáneas de la concentración de Ca²⁺ intracelular (registros oscilatorios) y contracción (líneas lisas) en tiras de músculo liso traqueal de bovino. Dos estimulaciones sucesivas (E₁ y E₂) con carbacol, histamina o KCl estuvieron sin (A,C,E) o con (B,D,F) la presencia de LTD₄. 46
- Figura 10.** Efecto del LTD₄ sobre los cambios de la concentración de Ca²⁺ intracelular y contracción inducidos por histamina (His, 1.3 μM, n=7), Carbacol (Cch, 0.1μM, n=7), o KCl (30 mM, n=5) en tiras de músculo liso traqueal de bovino. Las barras blancas indican la respuesta obtenida a diferentes fármacos usados, en la ausencia de LTD₄. Las barras en diagonal, cruzadas y negras corresponden a la preincubación de los tejidos con 1, 10 y 32 nM de LTD₄ respectivamente. **p< 0.01, *p< 0.05. 47
- Figura 11.** Efecto de diferentes inhibidores de cinasas sobre las modificaciones inducidas por el LTD₄ en el incremento de [Ca²⁺]_i y la contracción producidos por la histamina (1.3 μM) en tiras de músculo liso traqueal de bovino. Estaurosporina (0.01μM, n=4) y chelitrina (1 μM, n=8), inhibidores de la cinasa de proteína C (PKC), no modificaron el efecto de LTD₄ sobre el pico de Ca²⁺ intracelular y contracción máxima inducida por histamina. Genisteína (10 μM, n=5) completamente abolió el efecto de LTD₄ sobre los cambios de Ca²⁺ intracelular y contracción inducida por la histamina. ** p<0.01, * p <0.05. 49
- Figura 12.** A) Efecto de la genisteína (10 μM) sobre la respuesta máxima de contracción y la [Ca²⁺]_i a la histamina. B) Efecto de la daidzeína (10 μM, control negativo de genisteína) sobre el efecto de hiperreactividad del LTD₄ sobre la respuesta de histamina en tiras de músculo liso traqueal de bovino. 49
- Figura 13.** Efecto de la genisteína (GEN, n=8) sobre la hiperreactividad inducida por el LTD₄ a KCl (30 mM, n=5) en tiras de músculo liso traqueal de bovino. *p< 0.05 vs su grupo respectivo sin genisteína.. 50
- Figura 14.** Efecto del clorhidrato de metoxiverapamil (D-600, 30 μM) sobre la respuesta a carbacol (1 μM, n=5) e histamina (10 μM, n=6). ** p < 0.01. 51

- Figura 15.** Efecto del LTD₄ (32 nM) sobre la respuesta a carbacol (Cch 10 μM) o histamina (His, 100 μM) en células de músculo liso traqueal de bovino. *p < 0.05 comparado con el grupo de His. 52
- Figura 16.** Efecto del ácido ciclopiazónico (CPA, 1 μM) sobre la respuesta a carbacol (Cch, 3.1 μM) o histamina (His, 3.1 μM) en células de músculo liso traqueal de bovino. 52
- Figura 17.** Efecto del LTD₄ (32 nM) sobre el relleno de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico (RS) en células de músculo liso traqueal de bovino. A) Protocolo experimental para evaluar el relleno del RS usando cafeína (10 mM). B) Registros típicos del efecto del LTD₄ sobre el relleno de Ca²⁺ del RS. C) LTD₄ induce un incremento en el relleno de Ca²⁺ del RS, expresado como cociente E₂/E₁, comparado con el grupo control (CTL). Genistéina (GEN, 10 μM), completamente abolió el efecto de LTD₄. E₁, primera estimulación con cafeína; y E₂ segunda estimulación con cafeína. * p < 0.01..... 53
- Figura 18.** Análisis de Western Blot por densitometría de la MAP-ERK 1/2 en el músculo liso traqueal de bovino sometido a diferentes tratamientos. Las barras blancas, representan los tejidos estimulados con los diferentes agonistas; las barras negras, tejidos estimulados con L-cisteína (L-Cis) + LTD₄; las barras en diagonal y cruzados, tejidos que fueron preincubados con L-Cis + LTD₄ antes de la estimulación de carbacol (Cch) o histamina (His), respectivamente. Todos los experimentos corresponden a una n=5. † p < 0.05 con respecto al grupo control sin ningún tratamiento (basal). * p < 0.05 y ** p < 0.02 con respecto a los tejidos estimulados solo con el agonista. 54
- Figura 19.** Análisis de Western Blot por densitometría de la MAPK- ERK 1/2 no fosforilada en el músculo liso traqueal de bovino sometido a diferentes tratamientos. Las barras blancas, representan los tejidos estimulados con los diferentes agonistas; las barras negras, tejidos estimulados con L-cisteína (L-Cis) + LTD₄; las barras en diagonal y cruzados, tejidos que fueron preincubados con L-Cis + LTD₄ antes de la estimulación de carbacol (Cch) o histamina (His), respectivamente. Todos los experimentos corresponden a una n=5. 55

LISTA DE TABLAS

- TABLA 1.** Mediadores químicos liberados por las células inflamatorias y sus efectos. 24

RESUMEN

La hiperreactividad de las vías aéreas es un rasgo característico del asma, pero sus mecanismos no son bien conocidos. El leucotrieno D₄ (LTD₄) es una de las pocas moléculas capaces de producir hiperreactividad de las vías aéreas. En este estudio, el LTD₄, pero no el leucotrieno C₄ (LTC₄), produjo un desplazamiento hacia la izquierda de la curva concentración-respuesta a la histamina en tiras de músculo liso traqueal de bovino. Ni el LTC₄ o el LTD₄ modificaron la curva concentración-respuesta al carbacol. En mediciones simultáneas de Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]_i) y contracción, histamina o carbacol produjeron un pico transitorio de Ca²⁺ seguido de una meseta, junto con una contracción. El LTD₄ incrementó el pico transitorio de Ca²⁺ y la contracción inducido por histamina pero no modificó las respuestas a carbacol. El aumento de las respuesta a histamina inducido por el LTD₄ no fueron modificadas por estaurosporina o cheliritrina pero fueron anuladas por la genisteína. El análisis de Western blot mostró que el carbacol, pero no la histamina, causó una intensa fosforilación de las cinasas activadoras de mitógenos (MAPK: ERK 1/2) y que el LTD₄ incrementó significativamente la fosforilación inducida por la histamina, pero no por el carbacol. La participación de los canales de Ca²⁺ tipo L en la hiperreactividad a la histamina fue descartada porque el LTD₄ no modificó los cambios [Ca²⁺]_i inducidos por KCl. En células de músculo liso traqueal de bovino, el LTD₄ aumentó el pico transitorio de Ca²⁺ inducido por histamina (pero no por carbacol) y el relleno de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico (RS). La genisteína anuló este último efecto. El bloqueo parcial de la ATPasa de Ca²⁺ del RS con ácido ciclopiazónico redujo el pico transitorio de Ca²⁺ producido por la histamina pero no modificó el inducido por el carbacol. Estos resultados sugieren que el LTD₄ induce hiperreactividad a la histamina a través de la activación de la vía de la cinasa de tirosina y un incremento en la actividad de la ATPasa de Ca²⁺ del RS. Los canales de Ca²⁺ tipo L parecen no estar involucrados en este fenómeno.

ABSTRACT

Airway hyperresponsiveness is a key feature of asthma, but its mechanisms remain poorly understood. Leukotriene D₄ (LTD₄) is one of the few molecules capable of producing airway hyperresponsiveness. In this study, LTD₄, but not leukotriene C₄ (LTC₄), produced a leftward displacement of the concentration-response curve to histamine in bovine airway smooth muscle strips. Neither LTC₄ nor LTD₄ modified the concentration-response curve to carbachol. In simultaneous measurements of intracellular Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) and contraction, histamine or carbachol produced a transient Ca²⁺ peak followed by a plateau, along with a contraction. LTD₄ increased the histamine-induced transient Ca²⁺ peak and contraction but did not modify responses to carbachol. Enhanced responses to histamine induced by LTD₄ were not modified by staurosporine or chelerythrine but were abolished by genistein. Western blot showed that carbachol, but not histamine, caused intense phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and that LTD₄ significantly enhanced the phosphorylation induced by histamine, but not by carbachol. L-type Ca²⁺ channel participation in the hyperresponsiveness to histamine was discarded because LTD₄ did not modify the [Ca²⁺]_i changes induced by KCl. In tracheal myocytes, LTD₄ enhanced the transient Ca²⁺ peak induced by histamine (but not by carbachol) and the sarcoplasmic reticulum (SR) Ca²⁺ refilling. Genistein abolished this last LTD₄ effect. Partial blockade of the SR-ATPase Ca²⁺ pump with cyclopiazonic acid reduced the Ca²⁺ transient peak induced by histamine but not by carbachol. These results suggested that LTD₄ induces hyperresponsiveness to histamine through activation of the tyrosine kinase pathway and an increasing SR-ATPase Ca²⁺ pump activity. L-type Ca²⁺ channels seemed not to be involved in this phenomenon.

INTRODUCCIÓN

En 1997 en la revista Expert Panel Report, definió al **Asma como una enfermedad inflamatoria crónica** de las vías aéreas en la que participan muchas células y elementos celulares, en particular, células cebadas, eosinófilos, linfocitos T, macrófagos, neutrófilos y células epiteliales. En personas susceptibles, esta inflamación causa **episodios recurrentes** de sibilancias, disnea, opresión torácica y tos, en especial en las noches y en las primeras horas de la mañana. Estos episodios están usualmente asociados con **obstrucción difusa y variable del flujo aéreo, que suele ser reversible**, ya sea en forma espontánea o con tratamiento. Este proceso de inflamación produce **hiperreactividad bronquial** siendo un rasgo característico de esta enfermedad. (Hargreave y col., 1981; Hargreave y col., 1986; Jeffery y col., 1989; Barnes, 1997). Esta hiperreactividad consiste en un incremento de la sensibilidad del músculo liso traqueobronquial ante estímulos físicos (aire frío, etc.) o químicos (agonistas colinérgicos, histamina, etc.) Esta situación hace que las vías aéreas respondan en forma exagerada ante estos estímulos, produciendo una disminución en su calibre y dificultando el paso del aire. Este fenómeno, aunque ha sido extensivamente estudiado, los mecanismos involucrados en su desarrollo aun no están bien comprendidos.

La forma para evaluar la hiperreactividad de las vías aéreas en sujetos asmáticos es mediante espirometría, midiendo el volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV₁). El método consiste en administrar a los pacientes asmáticos, por vía inhalatoria, diferentes concentraciones de metacolina hasta alcanzar la concentración que disminuya un 20% el FEV₁ (concentración provocativa 20% [PC₂₀]). Por lo regular, en los pacientes asmáticos la PC₂₀ es < 8 mg/mL, mientras que en los sujetos sanos es > 16 mg/mL (Fig. 1) (O'Byrne y col., 2003).

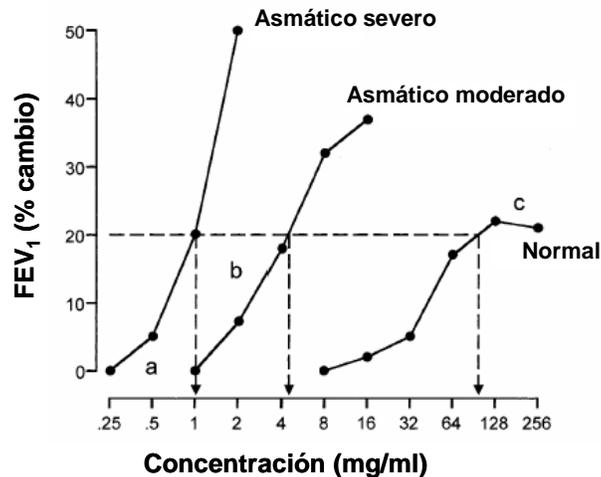


Figura 1. Cambio del FEV₁ inducido por diferentes concentraciones de metacolina inhalada en pacientes con asma moderada y severa vs individuos sanos. El valor de PC₂₀ esta calculado por interpolación de la caída en un 20% del FEV₁ vs la concentración de metacolina. La PC₂₀ en los sujetos asmáticos es mucho menor en comparación con los individuos sanos, indicando un incremento en la reactividad de las vías aéreas en el caso de los asmáticos (O'Byrne y col., 2003).

APARATO RESPIRATORIO

El aparato respiratorio tiene como función captar el oxígeno del aire inspirado y la eliminación del dióxido de carbono producido en el metabolismo celular del organismo. Las dos fosas nasales, la faringe y la tráquea pertenecen a las vías aéreas superiores. Los bronquios primarios y el árbol bronquial pertenecen a las vías aéreas inferiores.

La tráquea del humano es un tubo flexible de unos 11 cm de largo y 2 cm de diámetro. Esta recubierta por epitelio cilíndrico pseudo-estratificado ciliado con una lámina basal anormalmente gruesa y con muchas células caliciformes diseminadas. Un rasgo característico de la tráquea es su armazón de soporte formado por 16 a 20 cartílagos hialinos, en forma de C, que rodean su porción ventral y lateral. Estos anillos cartilaginosos incompletos están unidos por tejido conjuntivo fibro-elástico. Por fuera de estos cartílagos, hay una capa de tejido conjuntivo denso que contiene muchas fibras elásticas. La pared posterior de la tráquea, próxima al esófago carece de cartílagos. En lugar de ellos, hay una banda gruesa de haces de músculo liso que, por lo general, cursan transversalmente. Sus extremos, están insertados en los haces de fibras elásticas

y colágenas que constituyen la capa de tejido conjuntivo denso situada por fuera de los cartílagos traqueales. El músculo liso está unido también a la mucosa por tejido conjuntivo laxo que se continúa con la lámina propia. La tráquea se bifurca en los bronquios primarios derecho e izquierdo, que se dirigen a los pulmones respectivos. Después de entrar a los pulmones, los bronquios primarios se subdividen en otros más pequeños, los bronquios secundarios (o lobulares), uno para cada lóbulo pulmonar. (El pulmón derecho posee tres lóbulos y el izquierdo, dos). Los bronquios secundarios dan origen a otros de menor calibre, los bronquios terciarios (o segmentarios), que a su vez se ramifican en bronquiolos. Éstos se dividen repetidas veces y los más pequeños se denominan bronquiolos terminales. Esta ramificación considerable de la tráquea semeja un árbol invertido, por lo que suele llamarse árbol traqueobronquial (Tortora and Grabowski, 2003).

A medida que surgen las ramas del árbol traqueobronquial, se advierten varios cambios estructurales. En primer lugar, el epitelio cambia gradualmente de cilíndrico ciliado pseudoestratificado (en los bronquios) a cúbico sencillo no ciliado en los bronquios terminales. En segundo lugar, los anillos cartilagosos incompletos de los bronquios primarios se sustituyen, también de manera gradual, por placas de cartílago, que están ausentes en las ramas pequeñas. En tercer lugar, conforme disminuye la cantidad de cartílago aumenta el músculo liso (Tortora and Grabowski, 2003). Este músculo liso se encuentra organizado en forma de haces entrelazados, algunos de los cuales tienen un trayecto preferente circular o espiral. En las porciones más distales del árbol bronquial, el músculo liso se adelgaza y se organiza más laxamente. Está presente sin embargo, en toda la porción conductora del tracto respiratorio (Fawcett, 1989).



Figura 2. Corte transversal de un bronquio de perro (tomado de Montaña y col., 1996).

REGULACIÓN DEL CALIBRE DE LA VÍA AÉREA

El sistema nervioso autónomo regula muchos aspectos de la función de las vías aéreas, incluyendo secreciones, flujo sanguíneo, permeabilidad microvascular, liberación y migración de células inflamatorias y **el tono del músculo liso de las vías aéreas**. La inervación autonómica del aparato respiratorio comprende la vía colinérgica, adrenérgica y la no adrenérgica no colinérgica (NANC, Barnes, 1995).

En el caso de la vía colinérgica, las neuronas (parasimpáticas) inervan las vías aéreas a través del nervio vago, realizando sinapsis cerca de las células de músculo liso de las vías aéreas (MLVA). Estas neuronas, llamadas paratraqueales, liberan el neurotransmisor acetilcolina, el cual es un potente estimulador de los receptores colinérgicos muscarínicos generando contracción del MLVA (Grippi, 1995). Por otro lado el mecanismo adrenérgico incluye liberación de norepinefrina por los nervios simpáticos, esta catecolamina activa receptores adrenérgicos α o β . Los receptores β_2 se encuentran en el músculo liso de las vías aéreas, y su activación produce relajación de este tejido, mientras que los receptores α se encuentran en muy baja densidad y no tienen importancia funcional (Barnes, 1994). Existe otro mecanismo por el cual el tono de la vía aérea es regulado, el sistema nervioso NANC. Este ejerce una influencia excitatoria e inhibitoria sobre el tono de MLVA. Las neuronas del sistema NANC liberan los péptidos, sustancia P (SP) y el péptido vasoactivo intestinal (VIP), los cuales contraen y relajan las células MLVA, respectivamente (Grippi, 1995).

INFLAMACIÓN DE LAS VÍAS AÉREAS

La inflamación de las vías aéreas juega un papel central en la patogénesis del asma (O'Byrne, 1996). Las células inflamatorias que participan en la fisiopatología del asma como neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, linfocitos y células cebadas, liberan mediadores químicos proinflamatorios, tales como leucotrieno (LT) B₄, C₄ y D₄ (Barnes, 1997; Spector, 1997; Abela y Daniel, 1994), Tromboxano A₂ (TXA₂; Takata y col., 1996), factor de activación plaquetaria (PAF; Vargaftig y col., 1987; Barnes y col., 1988) y algunas citocinas, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α ; Amrani y Panettieri, 1998; Pennings y col., 1998) y la interleucina 5 (Bittleman y Casale, 1994; Petrolani y Goldman, 1996) (ver tabla 1), todos ellos capaces de producir hiperreactividad en las vías aéreas. Sin embargo, es muy probable que cada uno de estos mediadores proinflamatorios solo participen parcialmente en el desarrollo de esta hiperreactividad, por lo que este fenómeno puede ser multifactorial. (Devillier y col., 1999)

Se ha demostrado que durante la hiperreactividad de la vía aérea inducida por ozono o reto antigénico, existe una mayor disponibilidad de Ca²⁺ cuando el músculo es estimulado por algún agonista constrictor (Montaño y col., 1993, Perpiña y col., 1991; Chiba y Misawa, 1995). Más aún, algunos trabajos han demostrado que concentraciones subumbrales de U-46619 (análogo de TXA₂), TNF- α o de LTC₄ y LTD₄ inducen en el músculo liso una mayor liberación de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico (RS) cuando son estimulados por histamina o acetilcolina (Abela y Daniel, 1994; Takata y col., 1996; Amrani y Panettieri, 1998). Sin embargo, ninguno de los trabajos anteriores han explorado que mecanismos específicos están involucrados en la regulación del Ca²⁺ citosólico durante la hiperreactividad inducida por los agentes antes mencionados.

TABLA 1. MEDIADORES QUIMICOS LIBERADOS POR LAS CÉLULAS INFLAMATORIAS Y SUS EFECTOS.

CÉLULA INFLAMATORIA	MEDIADOR QUÍMICO	EFEECTO
Cebada	LTC ₄ , LTB ₄ , TXA ₂ , PGD ₂ , TNF- α	Hiperreactividad
	Histamina	Broncoconstricción
	PAF, PGD ₂ , LTB ₄ , Eotaxina	Quimiotaxis
Eosinófilo	LTC ₄ , LTD ₄	Hiperreactividad
	PAF	Broncoconstricción
	Proteína básica mayor	Citotoxicidad, daño epitelial
Basófilo	LTD ₄	Hiperreactividad
	Histamina	Broncoconstricción
Linfocito	Citocinas como: IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6	Regulación inmunológica
Neutrófilo	LTD ₄ , PGD ₂	Hiperreactividad
	PAF, PGD ₂	Quimiotaxis, Hipersecreción de moco
	IL-8	Inhibe proceso inflamatorio alérgico
Macrófago	LTC ₄ , LTB ₄ , TXA ₂ , PGD ₂	Hiperreactividad
	PAF, IL-8	Quimiotaxis
	IL-8	Inhibe proceso inflamatorio alérgico

MECANISMO DE CONTRACCIÓN EN EL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS (MLVA).

La actividad de contracción y relajación del músculo liso de la vía aérea esta bajo control miogénico, neurogénico y hormonal, siendo el efecto final la regulación de la concentración intracelular de Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i), la cual determinará el grado de tensión a desarrollar por el músculo liso.

Existen dos mecanismos de acople excitación-contracción en el músculo liso de la vía aérea: el acople electromecánico y el farmacomecánico. El acople electromecánico opera a través del cambio en el potencial de membrana a valores más positivos (despolarización) lo que produce la apertura de los canales de Ca²⁺ tipo L dependientes de voltaje (VDCC) produciendo un incremento en la [Ca²⁺]_i (Montaño y col., 1996). Un cambio a potenciales más negativos (hiperpolarización)

puede causar relajación debido a la reducción en la probabilidad de apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y a la apertura de los canales de K^+ (Somlyo and Somlyo, 1994).

El acople farmacomecánico involucra la estimulación de receptores membranales por acción directa de neurotransmisores que desencadenan toda una vía de transducción de señales que involucra a las proteínas G y la producción de segundos mensajeros, siendo el efecto final la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS) por el 1,4,5 trifosfato de inositol (IP_3) generado por el fosfatidilinositol (Baron y col., 1984; Montaña y col., 1996; Bazán y col. 1998). Asimismo, se presenta entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales operados por receptor y por canales dependientes de voltaje tipo L (Montaña y col., 1996; Janssen y col., 1997; Fleischmann y col., 1997), activación transitoria de canales de cloro dependientes de Ca^{2+} , debido a la liberación de Ca^{2+} del RS, así como una supresión prolongada de las corrientes de K^+ (Janssen, 1996). Esta situación favorece la despolarización, apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje e incremento de Ca^{2+} citosólico. Cabe destacar que todos estos mecanismos son compartidos en mayor o menor grado dependiendo del agonista broncoconstrictor utilizado.

En 1993, Kajita y Yamaguchi demostraron en músculo liso traqueal de bovino la presencia de receptores a ryanodina en el RS. Es muy probable que estos receptores sean activados por el incremento del Ca^{2+} citosólico favoreciendo así la liberación de este ión del RS (Endo e Iino, 1993). Asimismo, se ha propuesto que durante el vaciamiento del RS de su contenido de Ca^{2+} se produce un mecanismo adicional de entrada de este ión, conocido como entrada capacitativa de Ca^{2+} , la cual pudiera estar contribuyendo al incremento del Ca^{2+} citosólico inducido por un agonista (Amrani y col., 1995).

El incremento de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) induce la unión de éste a la calmodulina, y la asociación del complejo Ca^{2+} -calmodulina con la subunidad catalítica de la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) activa a esta enzima para fosforilar a la serina en la posición 19 (Ser 19) de la cadena ligera de miosina de 20 kDa. Esta fosforilación permite a la ATPasa de

miosina ser activada por la actina y, en consecuencia, el músculo se contrae (Somlyo y Somlyo, 1994; Amrani y col., 1998). Esta posición 19 de la cadena ligera de la miosina es susceptible de ser desfosforilada por la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP) y en esta forma inhibir el proceso de la contracción (Somlyo y col., 1989; Kitazawa y col., 1991).

Se ha demostrado que la cantidad de Ca^{2+} necesaria para mantener la contracción es relativamente pequeña. En este sentido, se ha observado en el músculo liso traqueal de perro y bovino (Takuwa y col., 1987; Montaña y col., 2003), que la estimulación con carbacol o sustancia P induce un incremento transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ seguido de una contracción. Posteriormente, este pico de Ca^{2+} cae a una meseta, pero la contracción se mantiene, lo cual nos habla de un incremento en la sensibilización a Ca^{2+} de la maquinaria contráctil. Las señales de transducción involucradas en este proceso de sensibilización a Ca^{2+} son complejas y específicas para cada tipo de músculo liso. Recientemente se ha demostrado que el incremento en la sensibilidad a Ca^{2+} inducida por agonistas involucra una cascada mediada por proteínas G heterotriméricas (Gq y Gi) que a su vez involucran pequeñas proteínas G monoméricas de la familia Rho. La activación de la Rho cinasa da como resultado la inhibición de la MLCP y en consecuencia inhibe la desfosforilación de la cadena ligera de miosina, favoreciendo la contracción. Este fenómeno ocurre cuando las concentraciones de Ca^{2+} intracelular son constantes, es decir, cuando se presenta la meseta (Croxtton y col., 1998; Somlyo y Somlyo, 2000).

Por otro lado, la actividad de la MLCP puede también ser modulada por la cinasa de proteína C (PKC). La PKC se activa cuando aumenta la concentración de diacilglicerol (activador fisiológico de la PKC), por los ésteres de forbol, por agonistas que actúan a través de proteínas G (Gq) y por concentraciones micromolares de Ca^{2+} . La PKC puede inhibir directamente a la MLCP favoreciendo también la desfosforilación de la cadena ligera de la miosina y mantener la contracción. (Somlyo y Somlyo, 2000).

Se ha propuesto que durante la contracción inducida por carbacol o serotonina se activa la MLCK vía la cinasa de tirosina (TK), sugiriendo un papel importante de

esta proteína durante el proceso de contracción del músculo liso traqueobronquial (Jin y col., 1996). También se ha sugerido que tanto la PKC y la cinasa de tirosina juegan un papel importante en el incremento del Ca^{2+} citosólico inducido por un agonista (Tolloczko y col., 2000).

Adicionalmente, se ha postulado que el caldesmon, un filamento delgado del músculo liso, participa durante la contracción de éste tejido (Hemric y col., 1993). La función del caldesmon es inhibir la interacción de los filamentos de actina y de miosina mediante la inhibición de la ATPasa de miosina y de esta forma evitar la contracción. Cuando el caldesmon es fosforilado, su efecto inhibitorio desaparece (Hemric y col., 1993). En 1997, Gerthoffer y col encontraron que el carbacol inducía la fosforilación del caldesmon en el músculo liso traqueobronquial mediante la activación de las cinasas activadoras de mitógenos (MAPK: ERK 1/2), estas proteínas forman parte de la cascada de cinasas activadas vía la cinasa de tirosina, comprobando que los agonistas colinérgicos tienen una vía alterna para inducir la contracción.

LEUCOTRIENOS

Los cisteinil leucotrienos como el LTC_4 , LTD_4 y LTE_4 son mediadores proinflamatorios originados del ácido araquidónico asociados a la membrana celular y sintetizados por la 5 - lipoxigenasa (Spector, 1997; Funk, 2001).

Estos leucotrienos, especialmente el LTC_4 y el LTD_4 son unos de los agentes broncoconstrictores más potentes de la naturaleza (Dahlen y col., 1980; Ellis y Udem, 1994). Los mecanismos inducidos por estos eicosanoides para producir la contracción del músculo liso han sido ampliamente estudiados y son similares para los descritos para otros agonistas broncoconstrictores. En este contexto, se ha propuesto que el LTD_4 , vía el receptor cys-LT_1 , está ligado a la elevación del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a través de la hidrólisis de los fosfoinosítoles (Dumitriu y col., 1997; Snetkov y col., 2001; Accomazzo y col., 2001), activación de los canales de Ca^{2+} tipo L y catiónico no específicos acoplados al receptor (Dumitriu y col., 1997; Snetkov y col., 2001), entrada capacitativa de Ca^{2+} (Snetkov y col., 2001). Adicionalmente, se han descrito mecanismos independientes de Ca^{2+} involucrados en la

contracción inducida por el LTD₄ como la activación de la PKC ϵ (Accomazzo y col., 2001). Por otro lado, la vía de cinasa de tirosina también ha sido involucrada en este proceso de contracción (Wong y col., 1997; Snetkov y col., 2001).

Sin embargo, se ha descrito muy poco en la literatura con respecto a los mecanismos que pudieran estar involucrados en la hiperreactividad inducida por los leucotrienos. En un trabajo reciente Setoguchi y col. (2001) encontraron en el músculo liso traqueal de porcino que la incubación con LTC₄ producía un incremento en la respuesta de contracción inducida por KCl y que la vía de la Rho cinasa era responsable de éste fenómeno.

BIOSÍNTESIS DE LEUCOTRIENOS

El ácido araquidónico puede ser metabolizado a prostanglandinas, tromboxano A₂ (TXA₂) y leucotrienos los cuales son formados por muchas células en nuestro cuerpo y actúan como mediadores lipídicos paracrinos. Son sintetizados de novo por la liberación del ácido araquidónico de la membrana cuando las células son activadas por trauma mecánico o por citocinas específicas, factores de crecimiento y otros estímulos. El ácido araquidónico se encuentra esterificado en los fosfolípidos de la membrana en células de mamíferos y su liberación es iniciada principalmente por la acción de la fosfolipasa A₂ citosólica tipo IV (cPLA₂). Posteriormente el ácido araquidónico liberado por cPLA₂ puede ser biotransformado vía ciclooxigenasa (COX) o la lipoxigenasa (5-LO). La COX cataliza el primer paso en el metabolismo del ácido araquidónico a prostanglandinas y TXA₂ (Claesson y col, 1999) mientras que la 5-LO lo hace para la formación de leucotrienos.

En contraste a las prostanglandinas, los leucotrienos son sintetizados predominantemente por células inflamatorias tales como neutrófilos, eosinófilos, basófilos macrófagos y células cebadas (Nicosia y col, 2001). El inicio de la síntesis de los leucotrienos es a partir de la activación celular la cual permite que la cPLA₂ citosólica sea translocada a la membrana nuclear para unirse a la proteína activadora de la 5 lipoxigenasa (FLAP). Esta molécula actúa como una proteína que transfiere el ácido araquidónico y facilita la presentación de éste a la

5-LO para su conversión a LTA_4 . La 5-LO produce la conversión del ácido araquidónico al ácido 5-hidroxiperoxi-eicosatetraenoico (5-HPETE) y la subsecuente formación de LTA_4 . Este leucotrieno se metaboliza a otros leucotrienos por dos vías diferentes: 1) La LTA_4 hidrolasa (LTA_4H) en el citoplasma, y principalmente en el núcleo convierte al LTA_4 en LTB_4 2) El LTA_4 se conjuga con glutatión para formar LTC_4 en la membrana nuclear a través de la LTA_4 sintasa (LTA_4S). Posteriormente el LTC_4 es transportado fuera de la célula a través de la proteína asociada a resistencia a multidrogas (MRPI), y una vez en el espacio extracelular el LTC_4 es metabolizado a LTD_4 por la enzima γ -glutamyl-leucotrienasa (GGLT) y consecutivamente a su metabolito inactivo LTE_4 a través de la enzima amino-peptidasa (Figura 3, Funk, 2001).

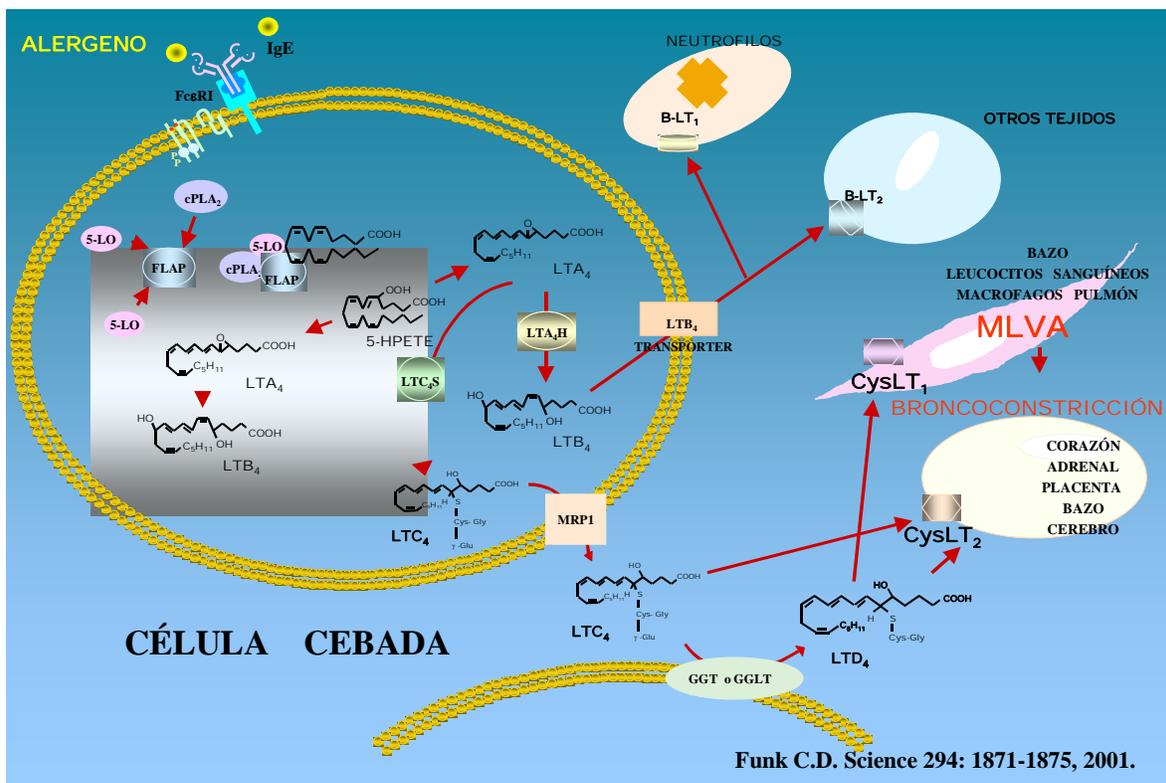


Figura 3. Biosíntesis de leucotrienos y sus acciones. La activación celular de una célula cebada o macrófago por complejos antígeno- inmunoglobulina E (IgE), ionóforos u otros estímulos permite que una cascada de eventos celulares se activen para que la biosíntesis de leucotrienos ocurra (Funk, 2001).

JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

En vista de que la regulación del Ca^{2+} citosólico en el músculo liso así como los procesos de fosforilación por las diferentes cinasas anteriormente descritas, pudieran estar jugando un papel fundamental en la hiperreactividad de las vías aéreas, resulta importante explorar si uno o varios de estos mecanismos están alterados durante la hiperreactividad inducida por el leucotrieno C_4 (LTC_4) y el leucotrieno D_4 (LTD_4). La identificación de tales mecanismos resulta de gran importancia para el mejor entendimiento de la fisiopatología del asma y asimismo tener mejores alternativas terapéuticas.

HIPÓTESIS

Los mediadores químicos proinflamatorios como el LTC_4 y el LTD_4 son capaces de inducir una mayor reactividad del músculo liso traqueal de bovino al carbacol y a la histamina, por un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, con la participación de la PKC o la cinasa de tirosina a través de la fosforilación de ERK-1 y ERK-2 y un aumento en la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico.

OBJETIVOS

1. ESTUDIOS FUNCIONALES EN ÓRGANOS AISLADOS

1.1 Determinar si el LTC₄ y el LTD₄ producen un incremento en la sensibilidad del músculo liso traqueal de bovino (MLVA) al carbacol y a la histamina.

1.2 Identificar la presencia del receptor de LTD₄ en el MLVA mediante el uso de MK-571, un antagonista del receptor CysLT1.

(Para los demás objetivos se seleccionó el mediador químico que produjo una mayor hiperreactividad del músculo liso).

2. MEDICIONES SIMULTÁNEAS (CONTRACCIÓN VS Ca²⁺ INTRACELULAR) EN TIRAS DE MLVA DE BOVINO.

2.1. Estudiar si el leucotrieno seleccionado (LTD₄) aumenta la concentración citosólica de Ca²⁺ y la contracción inducida por la histamina o el carbacol.

2.2. Evaluar la participación de la PKC y la cinasa de tirosina en el fenómeno inducido por el LTD₄ durante la respuesta a la histamina mediante dos inhibidores de la PKC (estaurosporina y cheleritrina) y uno de la cinasa de tirosina (genisteína).

3. ESTUDIOS EN CÉLULAS AISLADA DE MLVA DE BOVINO

3.1 En células aisladas de MLVA determinar si el carbacol o la histamina producen un incremento en la liberación de Ca²⁺ intracelular en la presencia de LTD₄.

3.2 Determinar si la ATPasa de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico estaba involucrada en la regulación del [Ca²⁺]_i en células de MLVA.

4. MEDICIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE ERK 1/2 MEDIANTE WESTERN BLOT EN TIRAS DE MLVA

4.1 Evaluar si la histamina y el carbacol fosforilan a las MAP cinasas ERK 1/2 del músculo liso traqueal de bovino.

4.2 Evaluar si el LTD₄ favorece la fosforilación de ERK 1/2 inducida por la histamina o el carbacol.

MATERIAL Y MÉTODOS

ÓRGANOS AISLADOS.

Se utilizaron tráqueas de bovino obtenidas en el Rastro de Temamatla, Edo de México. De éstas se obtuvieron tiras de músculo liso (2.0 - 2.5 mm de ancho x 6 mm largo) finamente disecadas y limpiadas del exceso de tejido conjuntivo y tejido epitelial adyacente con un microscopio estereoscópico.

Cada uno de los tejidos obtenidos se colocaron en una cámara de órganos aislados conteniendo 5 ml de solución de Krebs bicarbonatada de la siguiente composición (mM): NaCl 118, NaHCO₃ 25, KCl 4.6, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2 y glucosa 11. Se mantuvieron a una temperatura de 37 °C con un burbujeo constante de una mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂ a un pH 7.4. Los tejidos fueron atados a un transductor de tensión isométrica (modelo FT03, Grass Instruments, Rhode Island, E.U.A.) conectado a un amplificador-condicionador programable de señales (CyberAmp 380, Axon Instruments, California, E.U.A.), que a su vez estaba conectado a un convertidor analógico digital (Digidata 1200^a, Axon Instruments). La tensión isométrica fue registrada, almacenada y analizada en una microcomputadora y los datos procesados mediante un programa de Axoscope v. 7.0 (Axon). Las preparaciones se mantuvieron en reposo durante 30 min a una tensión de 1 g antes de iniciar los experimentos. Con el propósito de normalizar las respuestas de los tejidos, se estimularon tres veces con KCl (60 mM) durante 20 min hasta alcanzar la respuesta máxima. Se construyeron curvas acumulativas concentración-respuesta añadiendo a la cámara de órganos aislados concentraciones crecientes de carbacol (32 nM a 0.1 mM) o histamina (32 nM a 1 mM), previa preincubación (35 min) con o sin LTC₄ (10 nM) y LTD₄ (32 nM). Estas concentraciones de LTC₄ y LTD₄ fueron seleccionadas de experimentos piloto donde se demostró que no causan una respuesta contráctil o una pequeña contracción (aproximadamente 10 % de la respuesta a KCl 60 mM) que retornó a su nivel basal después de 30 min. También es importante evitar la biotransformación de los LTs a sus respectivos metabolitos inactivos, por lo tanto, cuando se usó LTC₄ se administró borato de L- serina (15 mM, fármaco que inhibe a la γ -glutamil leucotrienasa evitando la biotransformación del LTC₄ a LTD₄).

Similarmente, en los experimentos en el que utilizamos LTD₄ se usó L-cisteína (6 mM, fármaco que inhibe a la aminopeptidasa evitando la biotransformación de LTD₄ a LTE₄). Las respuestas de contracción al carbacol o a la histamina fueron expresadas como porcentaje de respuesta al tercer estímulo de KCl (60 mM).

Para identificar la presencia del receptor LTD₄, en las tiras de músculo liso traqueal de bovino se construyeron curvas acumulativas concentración-respuesta añadiendo a la cámara concentraciones crecientes de este leucotrieno (3.2nM a 100nM) en presencia o ausencia de MK-571 (100 nM), un antagonista del receptor CysLT1.

MEDICIONES SIMULTÁNEAS

La [Ca²⁺]_i se midió simultáneamente con la contracción muscular. Tiras de músculo liso de bovino se disecaron finamente bajo un microscopio estereoscópico, y se colocaron en 2 ml de Krebs con calcio (2 mM), se incubaron con 20 μM de fura 2-AM más 1 mM de probenecid y ácido plurónico al 0.01 %, a 37°C con burbujeo y agitación constante durante 3.5 h. Posteriormente, los tejidos fueron lavados con Krebs para remover el fura 2-AM del espacio extracelular. Cada preparación fue colocada verticalmente en una cubeta de polimetacrilato de 4 ml utilizando un adaptador especial de Photon Technology International (PTI, New Jersey, E.U.A). Esta cubeta fue llenada con solución de Krebs más indometacina 10 μM, burbujeada con una mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂ a un pH 7.4 y colocada en el interior de un fluorómetro de PTI. Las tiras musculares se colocaron en un transductor de tensión isométrica (FSG-01, Experimentria, Budapest, Hungría) conectado a un convertidor analógico digital de PTI y la [Ca²⁺]_i se determinó con el uso de fluorometría. El Fura 2-AM presente en las tiras musculares lisas se excitó alternadamente con luz de 340 y 380 nm de longitud de onda, y la emisión se colectó a 510 nm usando un fluorómetro de PTI. La [Ca²⁺]_i se calculó de acuerdo con la fórmula de Grynkiewicz y col. (1985):

$$[Ca^{2+}]_i = Kd \beta ((R-R_{min})/(R_{max}-R))$$

donde **R_{max}** y **R_{min}** fueron el cociente de fluorescencia 340/380 máximo y mínimo y se obtuvieron en presencia de Ca²⁺ saturante (5 mM) + ionomicina 50 μM y en ausencia de Ca²⁺ + EGTA 10 mM, respectivamente. El promedio de **R_{max} fue de 2.49 y el de R_{min} 1.19.** **R** corresponde al cociente de fluorescencia basal 340/380. **β** se calculó a partir del cociente de la fluorescencia observada a 380 nm en ausencia de Ca²⁺ y en presencia de Ca²⁺ saturante y el valor promedio fue de 1.36. La **K_d** del Fura-2, 386 nM, fue obtenida en células disgregadas de ML traqueal de bovino en una solución con la misma fuerza iónica que se utilizó en los experimentos del presente proyecto (Yamaguchi y col., 1995). Los registros obtenidos fueron almacenados en una microcomputadora y analizados usando un programa de análisis y adquisición de datos (Felix v. 1.2.1) de PTI.

Las tiras de músculo liso se mantuvieron en reposo durante 30 min a una tensión de 1- 1.5 g antes de iniciar los experimentos. Con el propósito de normalizar las respuestas de los tejidos, se estimularon dos veces con KCl (60 mM) durante 10 min hasta alcanzar la respuesta máxima. Después, se llevó a cabo una primera estimulación (E₁) del músculo con histamina 1.3 μM (CE₅₀), posteriormente una segunda estimulación (E₂) con histamina fue realizada 45 minutos después. En algunos experimentos, los tejidos fueron incubados con 1, 10 o 32 nM de LTD₄ más L-cisteína 3 mM durante 30 min antes de E₂. Nosotros corroboramos que la concentración de LTD₄ 32 nM no modificó la tensión del músculo liso en reposo, a pesar de causar un incremento pequeño en las [Ca²⁺]_i, el cual retorno a niveles basales antes de iniciar los experimentos. En otros experimentos, tiras de músculo liso preincubados con LTD₄ fueron también incubados con estaurosporina (un inhibidor inespecífico de la PKC, 10 nM), chelitrina (un inhibidor de la PKC, 1 μM), genisteína (un inhibidor de la cinasa de tirosina, 10 μM), o daidzeína (un análogo inactivo de genisteína que fue usado como control negativo para esta droga, 10 μM). También en otros experimentos utilizamos carbacol 0.1 μM o KCl 30 mM (equimolar).

MEDICIÓN DE $[Ca^{2+}]_i$ EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO TRAQUEAL DE BOVINO

Disgregación de células musculares lisas

Las células de músculo liso de las vías aéreas fueron obtenidas de tráquea de bovino. Aproximadamente 200 mg de tejido muscular se colocaron en una solución de Hank's (GIBCO, New York, E.U.A.) que contenía 2 mg de cisteína y 0.05 U/mL de papaína, y se incubaron durante 10 min a 37° C. Posteriormente el tejido fue lavado con una solución de Leibovitz (GIBCO, New York, E.U.A.) para remover el exceso de enzima y después se colocó en una solución de Krebs que contenía 0.144 mg/mL de colagenasa y una mezcla de proteasas neutras (Liberasa Blenzyme 2; Roche, Indiana, E.U.A.) durante aproximadamente 12 minutos hasta que las células se observaran disgregadas. Este procedimiento nos permitió obtener células con niveles consistentes en las $[Ca^{2+}]_i$ bajo condiciones basales (Montaño y col, 2003). Una vez disgregadas las células fueron incubadas con 0.5 μ M de Fura 2-AM en bajo Ca^{2+} (0.1 mM) a temperatura ambiente (22-25 °C) durante 1hr.

Microfluorimetría

Las células disociadas de músculo liso traqueal de bovino que se incubaron con Fura 2-AM fueron colocadas durante 45 minutos en una cámara de registro (la cámara contenía colágena de rata con el propósito de facilitar que las células se adhieran a la base de vidrio de ésta), posteriormente la cámara fue montada sobre un microscopio invertido (Diaphot 200; Nikon, Tokyo, Japón), y las células adheridas fueron perfundidas continuamente a una velocidad de 2-2.5 mL/min con solución de Krebs que contenía 1.5 mM de Ca^{2+} a 37 °C, pH 7.4 y burbujeado con una mezcla de 5% de CO_2 y 95% de O_2 .

El Fura 2-AM presente en las células musculares lisas se excitó alternadamente con luz de 340 y 380 nm de longitud de onda, y la emisión se colectó a 510 nm usando un microfluorómetro de PTI (modelo D-104). La fluorescencia basal fue restada automáticamente. La $[Ca^{2+}]_i$ se calculó de acuerdo con la fórmula de Grynkiewicz y col. (1985): donde **Rmax (6.06)** y **Rmin (0.39)** se

obtuvieron en presencia de Ca^{2+} saturante (10 mM) + ionomicina 10 μM y en ausencia de Ca^{2+} + EGTA 10 mM, respectivamente. β se obtuvo como se describió previamente en la técnica de mediciones simultáneas y la K_d del Fura-2, fue de 386 nM (Yamaguchi y col., 1995).

El efecto del LTD_4 sobre los cambios de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por histamina (100 μM) o carbacol (10 μM) fueron evaluados al preincubar las células musculares con o sin 32 nM de LTD_4 durante 20 min.

Para evaluar indirectamente la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} del RS, se midió la capacidad de los miocitos para rellenar al RS de Ca^{2+} . Antes de iniciar los experimentos, la viabilidad de las células se corroboró a través de la estimulación de éstas con cafeína en una solución de Krebs. Posteriormente los miocitos fueron perfundidos con una solución de Krebs libre de Ca^{2+} y un minuto más tarde fueron estimulados con cafeína (E_1) durante 10 min. La estimulación con cafeína en un medio libre de Ca^{2+} vació completamente el RS de Ca^{2+} (Bazán-Perkins y col., 2003). Posteriormente, las células fueron lavadas con Krebs sin Ca^{2+} para remover la cafeína y después se perfundió con Krebs (2.5 mM de Ca^{2+}) durante 10 min para permitir el rellenado de Ca^{2+} del RS. La estimulación con cafeína fue repetida nuevamente (E_2) bajo condiciones libres de Ca^{2+} . En estos experimentos, el cociente E_2/E_1 corresponde al grado de rellenado de Ca^{2+} del RS. En algunos experimentos las células fueron preincubadas con LTD_4 (32 nM) o genisteína (10 μM) más LTD_4 antes del segundo estímulo a cafeína (E_2).

Finalmente, el papel de la ATPasa de Ca^{2+} del RS en las respuestas normales a carbacol (3.1 μM) o histamina (3.1 μM) fueron evaluadas a través de la inhibición parcial de la bomba con ácido ciclopiazónico (CPA, 1 μM , preincubado durante 20 min antes de cada respuesta). Esta concentración de CPA redujo la respuesta a 10 mM de cafeína en aproximadamente un 69%, corroborando una inhibición parcial de la actividad de la bomba.

MEDICIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE ERK-1 Y ERK-2

Obtención de las muestras de músculo liso

Se obtuvieron tiras de músculo liso de 10 mg de peso finamente disecadas y limpiadas del exceso de tejido conjuntivo y tejido epitelial adyacente. Cada tejido se colocó en tubos de plástico de 13 ml (Sarstedt, New York, E.U.A.) y se les añadió 1 ml de Krebs con Ca^{2+} (2 mM) e indometacina 10 μM . Todos los tubos se incubaron durante 1 hr a 37 °C con burbujeo y agitación constante. Posteriormente se estimularon con carbacol, histamina, L-cisteína + LTD₄ durante 5 min, después las tiras se transfirieron a criotubos de plástico (1.5 mL, Corning, New York, E.U.A.) y se congelaron inmediatamente al introducir los tubos en nitrógeno líquido para detener la reacción, una vez congeladas las muestras se almacenaron a -80 °C. Otro grupo de tiras se preincubaron durante 45 min con LTD₄ y posteriormente se estimularon con los diferentes agonistas antes mencionados.

Extracción de proteínas: Las muestras congeladas se preincubaron con 250 μL del buffer de lisis (Tritón X-100 1%, Tris 50 mM [pH 7.4], NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM, fenil metil sulfonil fluoruro 1mM, aprotinina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, leupeptin 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Na_3VO_4 , y NaF 50 mM en agua destilada) sobre hielo frapé durante 30 min, después los tejidos se homogenizaron y centrifugaron a 20,000 g durante 15 minutos a 4 °C, posteriormente el sobrenadante se recupero (Breslin y col., 2003). La concentración de proteínas se determinó a través del método de Lowry.

Electroforesis: Se obtuvieron muestras de 10 μL con 40 μg de proteínas de cada sobrenadante, a cada muestra se le añadió 10 μL del buffer de carga (glicerol 20 %, 2-mercaptoetanol 10 %, dodecil sulfato de sodio (SDS) 10 % y Tris 0.5 M [pH 6.8], azul de bromofenol); después se calentaron a 90 °C durante 1 min a baño maría, posteriormente la separación de proteínas se realizó mediante geles de poli(acrilamida) dodecil sulfato de sodio (**gel separador:** poli(acrilamida) 30 %, Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 10 %, agua 2.175 mL, N, N, N', N'- tetrametilendiamina (TEMED) 5 μL y persulfato de amonio 10 %; **gel concentrador:** poli(acrilamida) 30 %, Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, agua 1.525 mL, TEMED 5 μL y persulfato de

amonio 10%) en un buffer de corrimiento (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS 1 %) bajo condiciones reductoras a 10 °C y 100 V durante 2 hr (Laemmli U.K., 1970).

Electrotransferencia: La electrotransferencia de las proteínas se realizó sobre una membrana de nitrocelulosa en un buffer de transferencia (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M y metanol al 20 %) a 10 °C y 100 V durante 1 hr.

Inmunodetección: Las membranas de nitrocelulosa con las proteínas y marcadores de peso transferidos se bloquearon con un buffer salino-Tris (TBS) conteniendo 5 % de leche descremada y 0.1 % de Tween-20 durante 1 hr a temperatura ambiente. Para distinguir entre las proteínas fosforiladas (ERK 1/2) y totales no fosforiladas (ERK 1/2) se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo comerciales (anticuerpo primario) contra cada una de estas proteínas a una dilución de 1:1000 en TBS-Tween 20. Después de su incubación durante toda la noche (12 hr a 4 °C) cada membrana de nitrocelulosa fue lavada 3 veces con TBS-Tween 20. A continuación se adicionó un reactivo secundario que contenía un anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa (HRP) (1:2000), que permitió detectar el anticuerpo primario y un anticuerpo anti-biotina conjugado con peroxidasa HRP (1:1000), que permitió identificar los marcadores de peso; estos anticuerpos se incubaron durante 1 hr con agitación constante a temperatura ambiente. La detección de las proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia usando 5 mL del reactivo comercial (LumiGLO, Cell signaling, Massachussets, E.U.A.) agitando suavemente durante 1 min a temperatura ambiente, después se eliminó el exceso de la solución a las membranas y se procedió a exponerlas sobre una película Biomax ML (Kodak, New York, E.U.A) durante 30 segundos y posteriormente se revelaron (RP X-OMAT Processor, Kodak). Los inmunoblots de ERK 1/2 fueron analizados por densitometría utilizando un software de Kodak digital science ID versión 2.03 (Eastman Kodak, Conneticut, E.U.A).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se evaluaron mediante la prueba t de Student pareada y no pareada. La reactividad al carbacol o a la histamina fue evaluada a través de la concentración efectiva 50 % (CE₅₀). La CE₅₀ fue calculada, por regresión lineal de los valores transformados a $-\log$ aritmo de la concentración y la respuesta como probits. En algunos experimentos se utilizó análisis de varianza y pruebas de comparación múltiples como Dunnett. Los valores $p < 0.05$ bimarginal fueron considerados estadísticamente significativos. Los valores de "n" representarán el número de bovinos en cada experimento. Los resultados están expresados como promedio \pm error estándar.

FÁRMACOS

Fura 2-AM, probenecid, ácido plurónico F-127, ionomicina, dihidrocloruro de histamina, cloruro de carbamilcolina (carbacol, CCh), LTC₄, LTD₄, L-cisteína, L-serina, ácido bórico, estaurosporina, cloruro de queleritina, clorhidrato de metoxyverapamil (D600), indometacina y ácido ciclopiazónico (CPA) fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, Missouri, E.U.A.). Fura 2-AM, ionomicina y CPA fueron disueltos en DMSO (la concentración final en los experimentos fue de 0.025%, una concentración que no generó ningún efecto sobre las respuestas de contracción y $[Ca^{2+}]$). Genisteína fue comprada de GIBCO-BRL (Maryland., E.U.A.). Daidzeína fue obtenida de Biomol (Pennsylvania, E.U.A.).

RESULTADOS

1. ESTUDIOS FUNCIONALES EN ÓRGANOS AISLADOS

Presencia funcional de receptores a leucotrienos (LTs) en el músculo liso traqueal de bovino.

En estos experimentos se disecaron tiras de músculo liso traqueal de bovino y se realizaron curvas concentración-respuesta tanto para el LTC₄ como para el LTD₄ (0.1nM a 100 nM). Encontramos que la administración de 0.1 nM a 100 nM de LTC₄ y de LTD₄ (n=3) produjeron una respuesta de contracción del MLVA que fue dependiente de la concentración (Figura 4A). Estas respuestas de contracción por lo regular eran transitorias y regresaban a la basal.

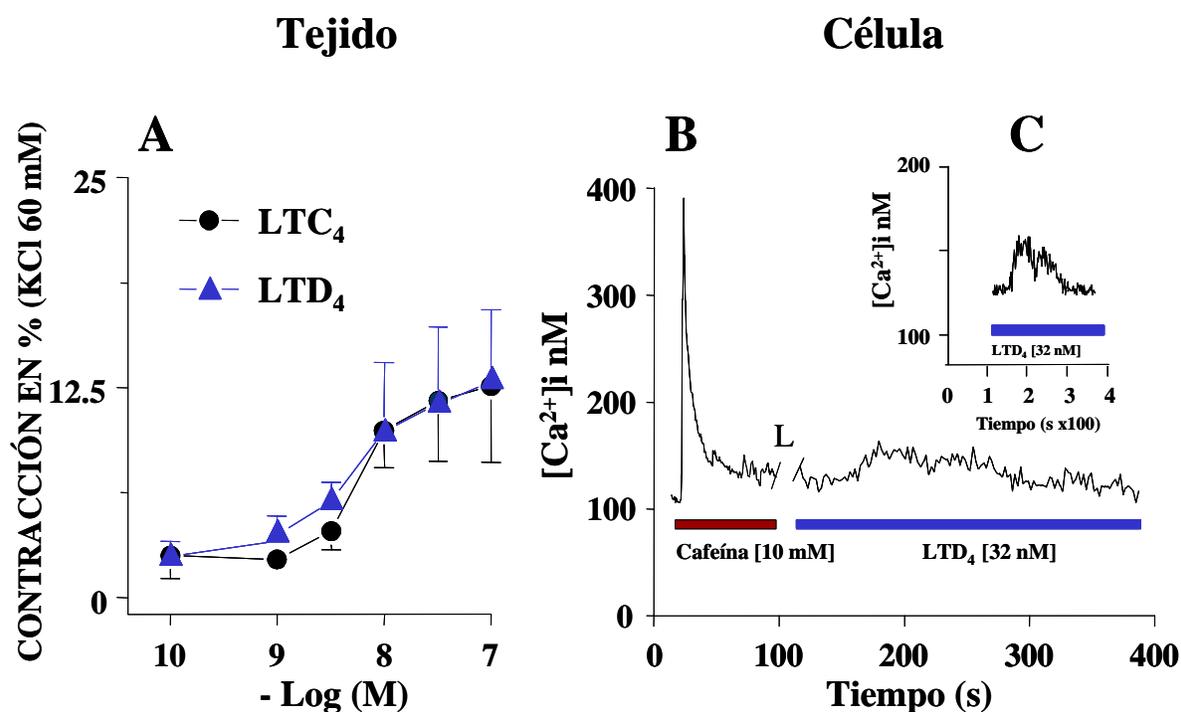


Figura 4. A) Efecto del LTC₄ y LTD₄ sobre tiras de músculo liso traqueal de bovino y B) efecto del LTD₄ (32 nM) sobre célula única de músculo liso traqueal de bovino. L= lavado. C) Amplificación de la señal de Ca²⁺ inducida por el LTD₄.

Por otro lado, se realizaron experimentos en célula única de músculo liso traqueal de bovino para corroborar que la respuesta obtenida en las tiras de músculo liso era debido a la presencia de receptores al LTD₄ en este tejido. Las células se estimularon inicialmente con un agonista que es capaz de liberar Ca²⁺ de retículo sarcoplásmico, cafeína 10 mM, para verificar que estuvieran en buenas condiciones, posteriormente se estimularon con LTD₄ 32 nM. En la Figura 4B se puede observar un pequeño incremento transitorio en las [Ca²⁺]_i al estímulo del LTD₄.

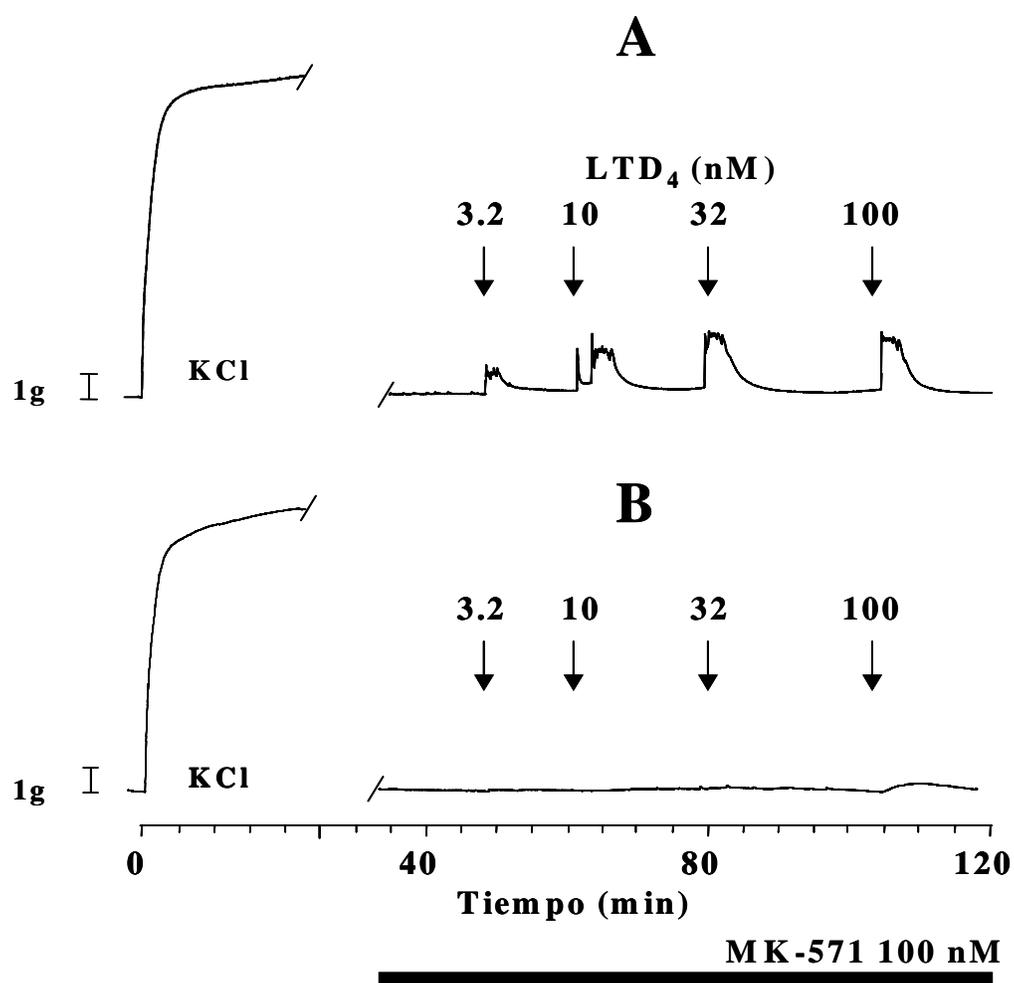


Figura 5. Efecto del MK-571, antagonista del receptor CysLT₁, en el MLVA de bovino. A) curva concentración-respuesta a el LTD₄ (3.2 a 100 nM). B) En presencia de MK-571 (100 nM).

Finalmente, lo que nos permitió definir la presencia de los receptores CysLT1 en el MLVA de bovino fue a través del uso de un antagonista de este receptor, el MK-571. Como se puede observar en la Figura 5, el MK-571 a una concentración de 100 nM bloqueo la respuesta del LTD₄. Estos resultados nos sugieren la existencia del receptor Cys-LT₁ en este tipo de músculo.

Efecto del LTC₄ y LTD₄ sobre la sensibilidad del MLVA de bovino al carbacol o a la histamina.

La incubación previa de las tiras traqueales de bovino con LTC₄ (10 nM, n=8) o con LTD₄ (32 nM, n=8) no modificaron las curvas concentración–respuesta al carbacol, ni la respuesta máxima. El $-\log CE_{50}$ (M) para el grupo control de carbacol (7.1494 ± 0.1192) no fue estadísticamente diferente del $-\log CE_{50}$ en los grupos de LTC₄ (7.2118 ± 0.1088) o LTD₄ (7.2102 ± 0.1326) y lo mismo ocurrió para la respuesta máxima de contracción (Figura 6).

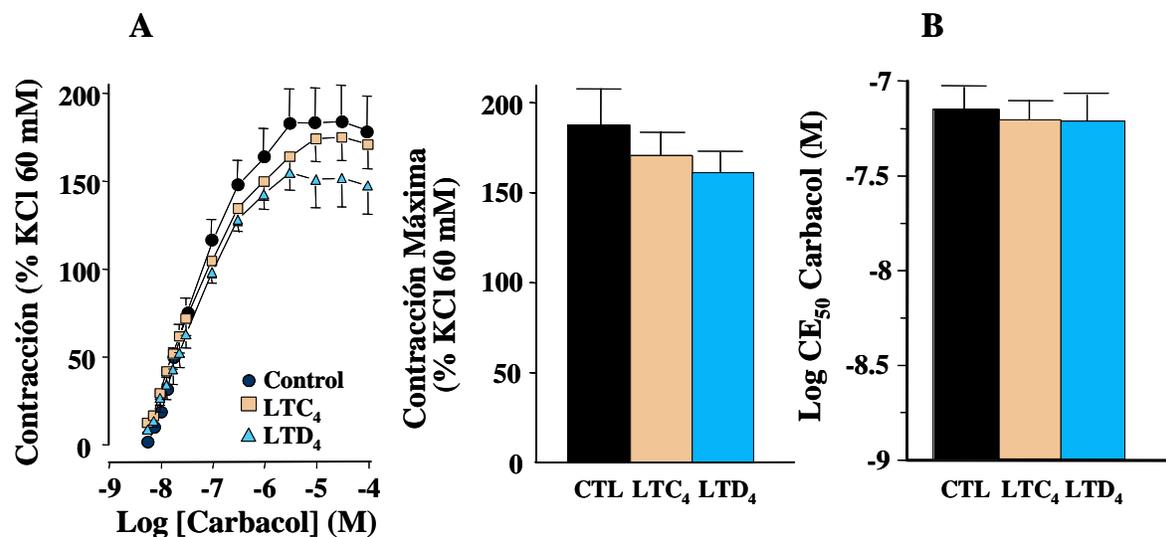


Figura 6. A) Efecto del LTC₄ (10 nM) y del LTD₄ (32 nM), en la reactividad del músculo liso traqueal al carbacol. El LTC₄ y LTD₄ se preincubaron durante 30 min. B) Logaritmo negativo de la concentración efectiva 50% (Log CE₅₀) a el carbacol con y sin LTC₄ o LTD₄.

Por otro lado, la preincubación de las tiras traqueales con LTD₄ (n=8) pero no con LTC₄ (n=8) produjo un desplazamiento hacia la izquierda de la curva concentración respuesta a la histamina (5.8638 ± 0.0691 , $p < 0.01$ y 5.4511 ± 0.1658 , respectivamente) comparado con el grupo control (5.4246 ± 0.0740). Ninguno de los dos leucotrienos, LTC₄ o LTD₄, modificaron la respuesta máxima de contracción a la histamina (Figura 7).

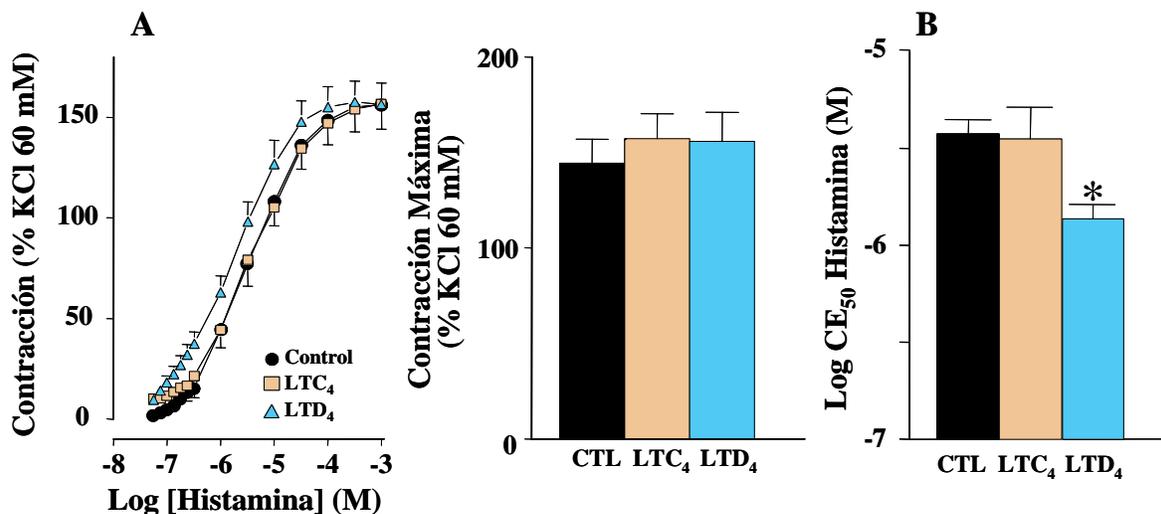


Figura 7. A) Efecto del LTC₄ (10 nM) y del LTD₄ (32 nM), en la reactividad del músculo liso traqueal a la histamina. El LTC₄ + borato de serina 15 mM y LTD₄ + L-cisteína 6 mM se preincubaron durante 30 min. B) Logaritmo negativo de la concentración efectiva 50 % (Log CE₅₀) a la histamina con y sin LTC₄ o LTD₄. * $p < 0.05$.

También encontramos que el grupo control incubado con solo L-cisteína tiene un efecto similar a L-cisteína + LTD₄, es decir, causa un desplazamiento hacia la izquierda de la curva concentración-respuesta a la histamina (Figura 8). Estos resultados nos permiten sugerir que L-cisteína pudiera estar induciendo la acumulación LTD₄ endógeno y producir el mismo efecto que el LTD₄ exógeno.

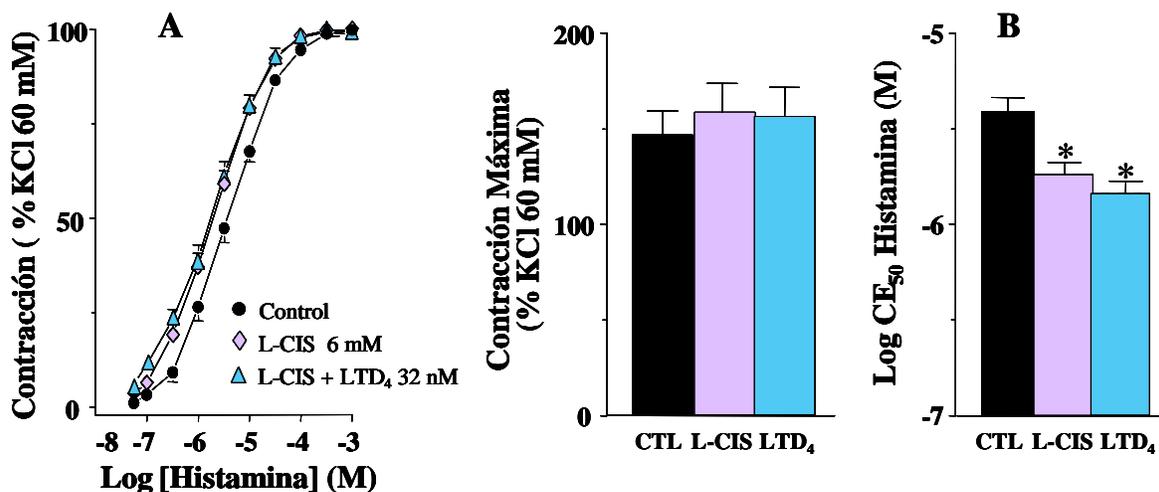


Figura 8. Efecto de la L-cisteína (L-CIS) + LTD₄ y L-cisteína, en la reactividad del músculo liso traqueal a la histamina. La L-CIS y LTD₄ se preincubaron durante 30 min. B) Logaritmo negativo de la concentración efectiva 50 % (Log CE₅₀) a la histamina con y sin L-CIS o L-CIS + LTD₄. * p < 0.05.

2. MEDICIONES SIMULTÁNEAS DE Ca²⁺ INTRACELULAR Y CONTRACCIÓN

Efecto del LTD₄ sobre los cambios de [Ca²⁺]_i y contracción inducido por histamina, carbacol y KCl.

De acuerdo a los resultados obtenidos en órganos aislados, seleccionamos al LTD₄ para continuar los experimentos de mediciones simultáneas de contracción y Ca²⁺ intracelular. Nuestros resultados son los siguientes: La [Ca²⁺]_i basal de las tiras de músculo liso de bovino fue de 92 ± 4 nM (n=97). Como se observa en los registros típicos en la Figura 9, todas las estimulaciones (E₁ ó E₂) con histamina o carbacol produjeron un cambio bifásico en las [Ca²⁺]_i, consistente de un pico de Ca²⁺ transitorio seguido de una meseta, mientras que KCl solo produjo un incremento en las [Ca²⁺]_i sin un pico transitorio notable. Todas estas respuestas se dieron simultáneamente a la respuesta de contracción del músculo liso. En los grupos control las respuestas en E₂ de las [Ca²⁺]_i fueron siempre más pequeñas que en E₁, por lo que el valor del cociente E₂/E₁ fue menor a 1, mientras que la

contracción fue casi la misma, tanto en E_2 como en E_1 , con un cociente E_2/E_1 aproximadamente a 1, Figura 10).

En cuanto a la respuesta a histamina, la preincubación con 1, 10 o 32 nM de LTD₄ antes del segundo estímulo (E_2) causó un incremento dependiente de la concentración en los cocientes E_2/E_1 del pico de Ca^{2+} y contracción. Así, comparado con el grupo control (0.67 ± 0.07 , $n=11$), 10 y 32 nM de LTD₄ incrementaron la respuesta del pico de Ca^{2+} (1.12 ± 0.15 , $n=5$, $p < 0.01$, y 1.64 ± 0.23 , $n=7$, $p < 0.01$, respectivamente). Este mismo efecto fue observado en la respuesta de contracción máxima, ya que los tejidos preincubados con 10 y 32 nM de LTD₄, la contracción máxima fue mayor (1.36 ± 0.14 , $p < 0.05$, 1.55 ± 0.17 , $p < 0.02$, respectivamente; Figuras 9C, 9D, y 10) comparada con el grupo control (1.05 ± 0.06). Por otro lado, el LTD₄ no modificó la respuesta a carbacol ($n=7$), ya que este leucotrieno no alteró los cocientes E_2/E_1 de los cambios bifásicos en $[Ca^{2+}]_i$ y la contracción.

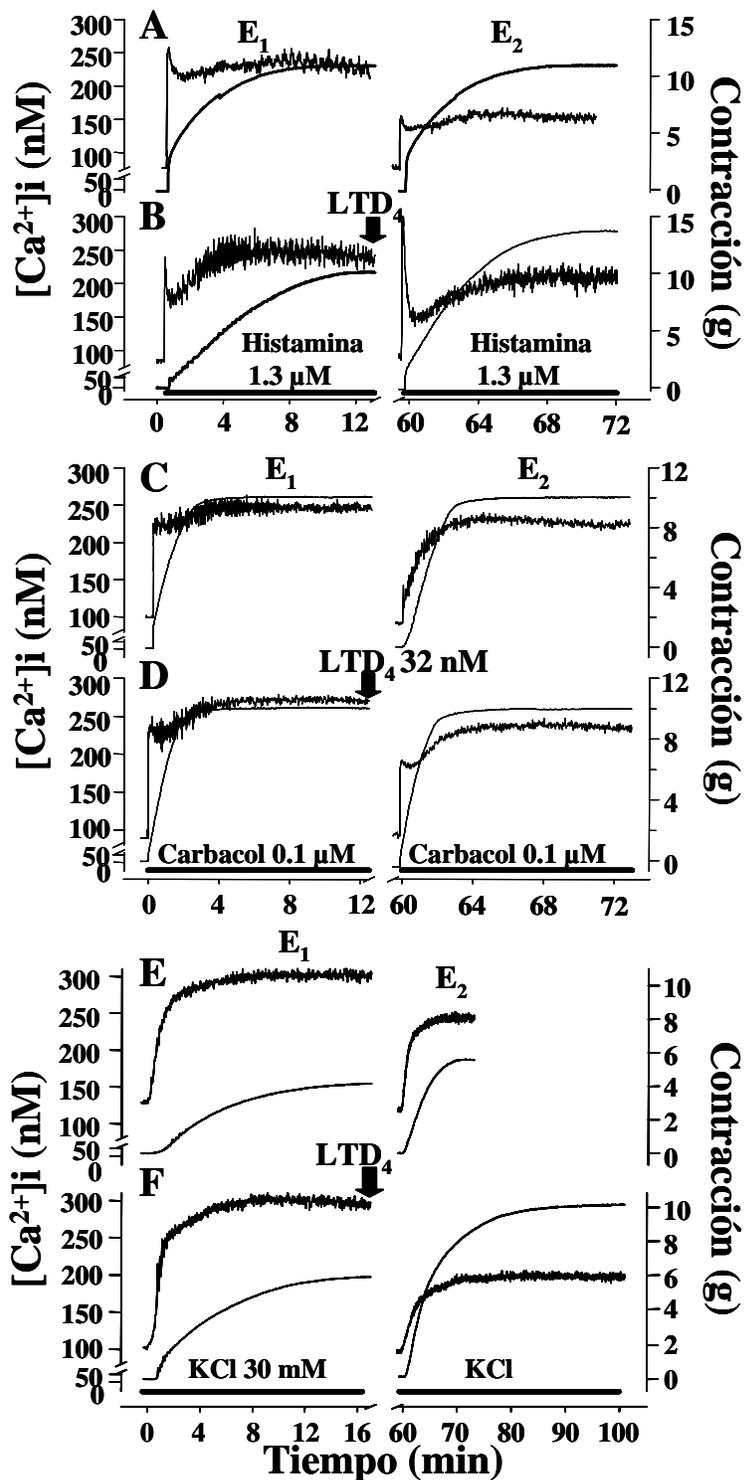


Figura 9. Registros típicos de mediciones simultáneas de la concentración de Ca²⁺ intracelular (registros oscilatorios) y contracción (líneas lisas) en tiras de músculo liso traqueal de bovino. Dos estimulaciones sucesivas (E₁ y E₂) con carbacol, histamina o KCl estuvieron sin (A,C,E) o con (B,D,F) la presencia de LTD₄.

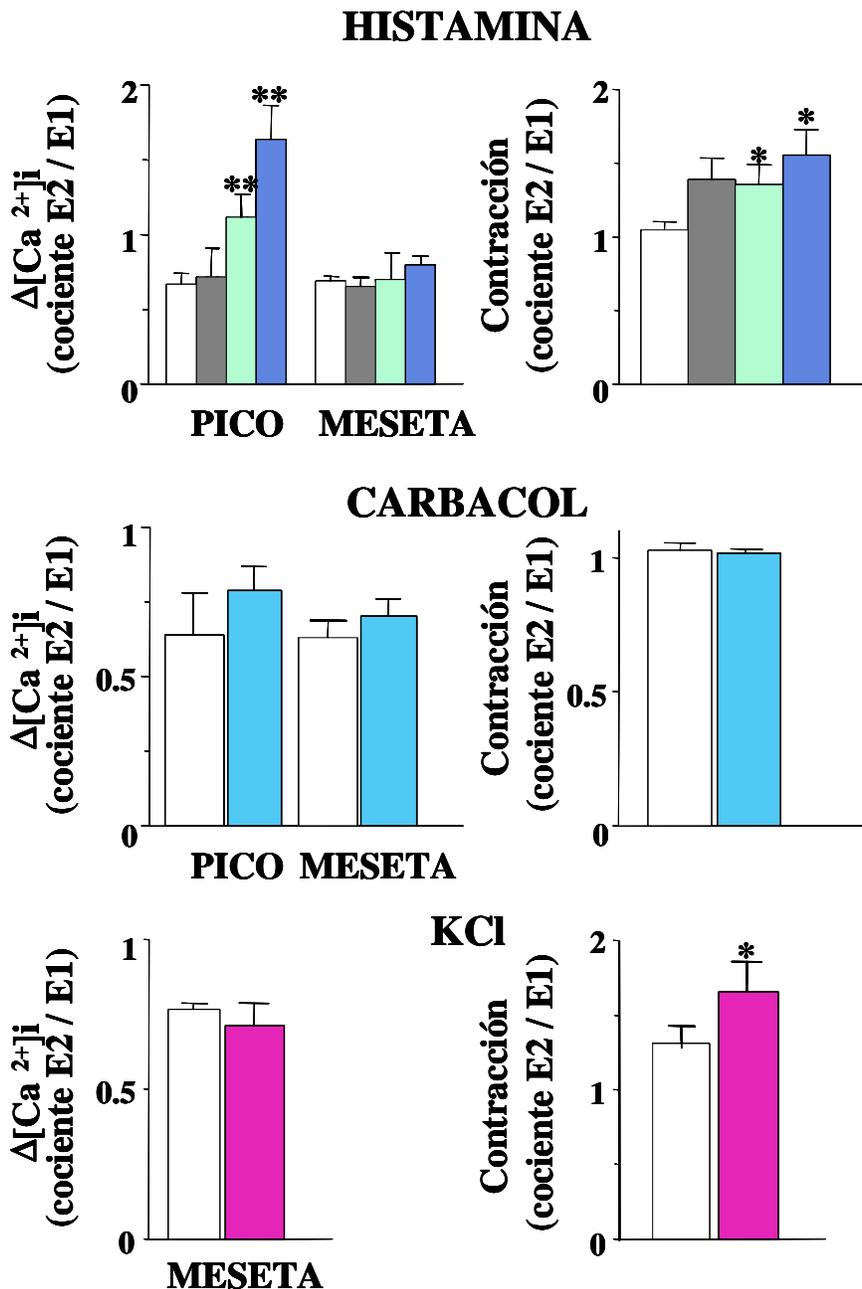


Figura 10. Efecto del LTD₄ sobre los cambios de la concentración de Ca²⁺ intracelular y contracción inducidos por histamina (His, 1.3 μM, n=7), Carbacol (Cch, 0.1 μM, n=7), o KCl (30 mM, n=5) en tiras de músculo liso traqueal de bovino. Las barras blancas indican la respuesta obtenida a diferentes fármacos usados, en la ausencia de LTD₄. Las barras en gris, verde y azul rey corresponden a la preincubación de los tejidos con 1, 10 y 32 nM de LTD₄ respectivamente. **p< 0.01, *p< 0.05.

Efecto de los diferentes inhibidores de cinasas sobre el aumento a la reactividad a histamina inducido por el LTD₄.

Los cambios inducidos por el LTD₄ (32 nM) no fueron modificados por la administración de estaurosporina (n=4) o cheleritrina (n=8), a pesar de que este último agente causó una disminución significativa en la meseta de la $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 11). En contraste, genisteína (10 μ M, n=5) completamente abolió los cambios inducidos por el LTD₄ en el pico transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ (0.53 ± 0.07 , $p < 0.01$) y la contracción (0.72 ± 0.04 , $p < 0.01$), por lo tanto, este inhibidor anuló la hiperreactividad de las vías aéreas a la histamina inducida por el LTD₄. Adicionalmente, los cambios en la meseta de $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por la histamina en tejidos preincubados con LTD₄ (0.80 ± 0.06) fueron también significativamente disminuidos por genisteína (0.25 ± 0.05 , $p < 0.01$, Figura 11).

En experimentos por separado, corroboramos que 10 μ M de genisteína (n=6) no modificó la respuesta a la histamina (cociente E_2/E_1 de pico de Ca^{2+} , 0.55 ± 0.07 ; meseta de Ca^{2+} , 0.73 ± 0.08 ; y la respuesta de contracción máxima, 1.13 ± 0.06). Además, también verificamos que la daidzeína (control negativo para la genisteína, n=4) no modificó la hiperreactividad inducida por el LTD₄ (cociente E_2/E_1 contracción, 2.04 ± 0.28 , Figura 12).

En vista de que la daidzeína modifica la fluorescencia del fura-2 AM, las mediciones de $[Ca^{2+}]_i$ no se realizaron cuando se utilizó este fármaco.

Efecto de la genisteína sobre la hiperreactividad inducida por el LTD₄ a KCl.

Por otro lado, para evaluar si el Ca^{2+} extracelular juega un papel en el desarrollo de la hiperreactividad inducida por el LTD₄, el efecto de la incubación de LTD₄ sobre la respuesta de KCl fue también evaluada. Nosotros encontramos que LTD₄ (n=5) promueve un aumento del cociente E_2/E_1 de la contracción inducida por KCl (1.66 ± 0.20 vs control 1.31 ± 0.12 , n=5, $p < 0.05$) a pesar de la falta de efecto sobre los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por KCl (Figura 9E y F, y 10). Mientras que

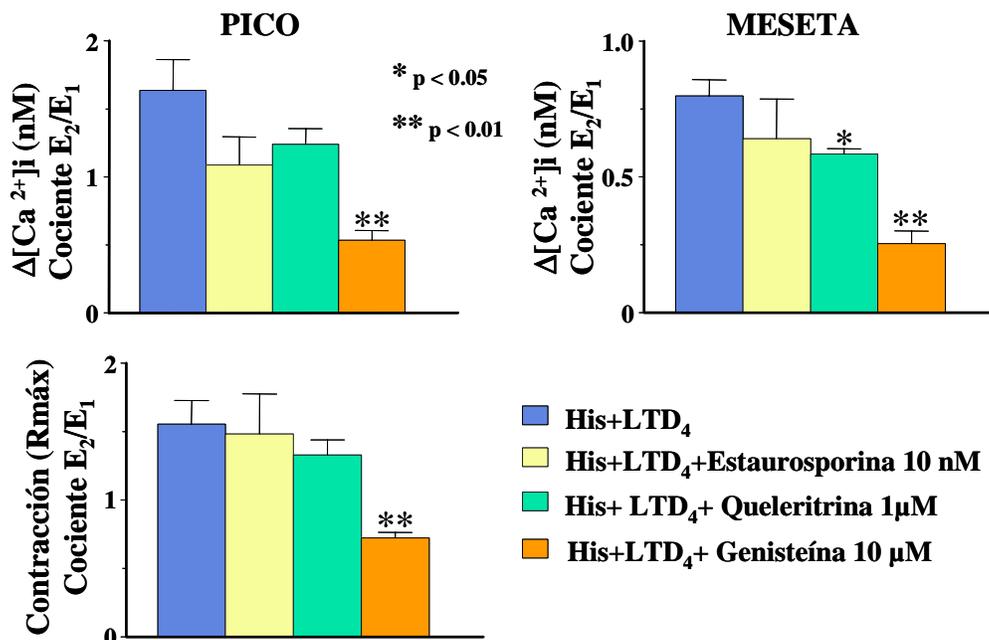


Figura 11. Efecto de diferentes inhibidores de cinasas sobre las modificaciones inducidas por el LTD₄ en el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la constracción producidos por la histamina (1.3 μM) en tiras de músculo liso traqueal de bovino. Estaurosporina (0.01 μM , n=4) y quelerritrina (1 μM , n=8), inhibidores de la cinasa de proteína C (PKC), no modificaron el efecto de LTD₄ sobre el pico de Ca^{2+} intracelular y constracción máxima inducida por histamina. Genisteína (10 μM , n=5) completamente abolió el efecto de LTD₄ sobre los cambios de Ca^{2+} intracelular y constracción inducida por la histamina. ** p<0.01, * p < 0.05.

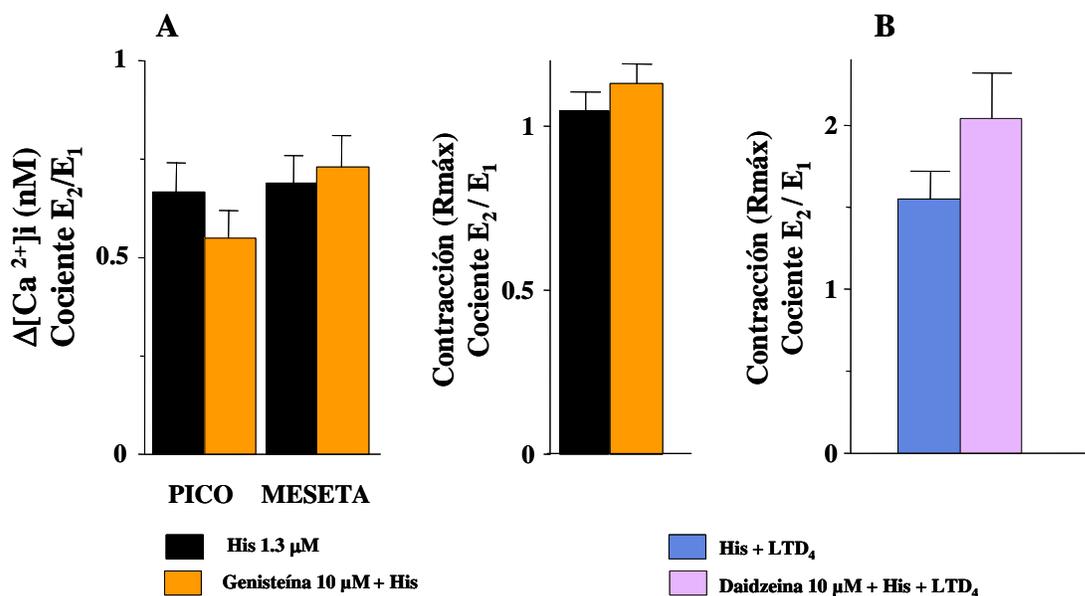


Figura 12. A) Efecto de la genisteína (10 μM) sobre la respuesta máxima de constracción y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a la histamina. B) Efecto de la daidzeína (10 μM , control negativo de genisteína) sobre el efecto de hiperreactividad del LTD₄ sobre la respuesta de histamina en tiras de músculo liso traqueal de bovino.

la preincubación con genisteína (n=8) evitó el incremento inducido por el LTD₄ de la contracción del músculo liso a KCl (1.20 ± 0.11 , $p < 0.05$). Este compuesto también causó una ligera disminución pero estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de la respuesta de contracción a KCl (1.05 ± 0.05 , n=8, $p < 0.05$, Figura 13). Daidzeína (n=6), el control negativo para genisteína, no modificó la respuesta a KCl (cociente E_2/E_1 de contracción, 1.36 ± 0.21).

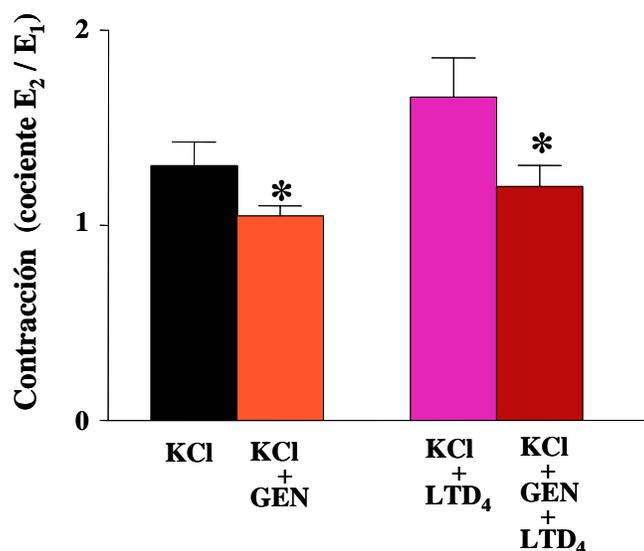


Figura 13. Efecto de la genisteína (GEN, n=8) sobre la hiperreactividad inducida por el LTD₄ a KCl (30 mM, n=5) en tiras de músculo liso traqueal de bovino. * $p < 0.05$ vs su grupo respectivo sin genisteína.

Participación de los canales de Ca^{2+} tipo L en la respuesta de carbacol o de histamina en tiras de músculo liso traqueal de bovino.

El bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo L con metoxiverapamil (D-600, 30 μ M) causó una disminución del 67 % de la respuesta de contracción inducida por histamina (10 μ M), acompañado con una reducción del 83 y 59 % en el pico transitorio de Ca^{2+} y la meseta, respectivamente (n=6). En contraste, D-600 no afectó la contracción inducida por carbacol (1 μ M), a pesar de una moderada reducción de 54 y 24 % del pico transitorio de Ca^{2+} y la meseta, respectivamente (n=7, Figura 14).

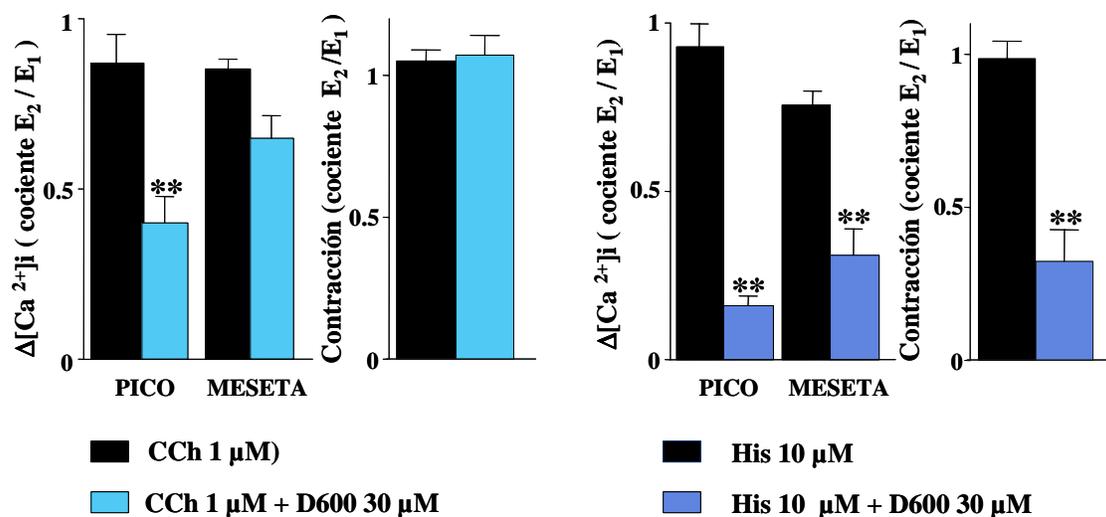


Figura 14. Efecto del clorhidrato de metoxiverapamil (D-600, 30 μM) sobre la respuesta a carbacol (1 μM, n=5) e histamina (10 μM, n=6). ** p < 0.01.

3. MEDICIÓN DEL $[Ca^{2+}]_i$ EN CÉLULAS ÚNICAS DE MLVA DE BOVINO

Efecto del LTD₄ sobre los cambios de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por histamina o carbacol en células de MLVA de bovino

Similar a nuestros hallazgos en las mediciones de Ca^{2+} intracelular en las tiras de músculo liso traqueal, en los experimentos con células aisladas de músculo liso, encontramos que la preincubación con LTD₄ causó un incremento en el pico transitorio de Ca^{2+} inducido por histamina (n=4), pero no para carbacol (n=7, Figura 15).

Efecto del ácido ciclopiazónico (CPA) sobre la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} del Retículo Sarcoplásmico.

En estos experimentos utilizamos 1 μM de CPA, esta concentración bloqueó parcialmente la ATPasa de Ca^{2+} de RS. A pesar de que este bloqueo con CPA redujo el pico transitorio de Ca^{2+} inducido por carbacol o histamina, este inhibidor de la ATPasa afectó principalmente la respuesta de histamina (65 % de disminución, p < 0.05, n=4) comparado con el carbacol (5.4 % de disminución, n=4, Figura 16). Con el propósito de demostrar que la respuesta a estos

agonistas no se modifica en el tiempo, corroboramos que 2 estimulaciones consecutivas, con 20 minutos de diferencia, producían respuestas similares.

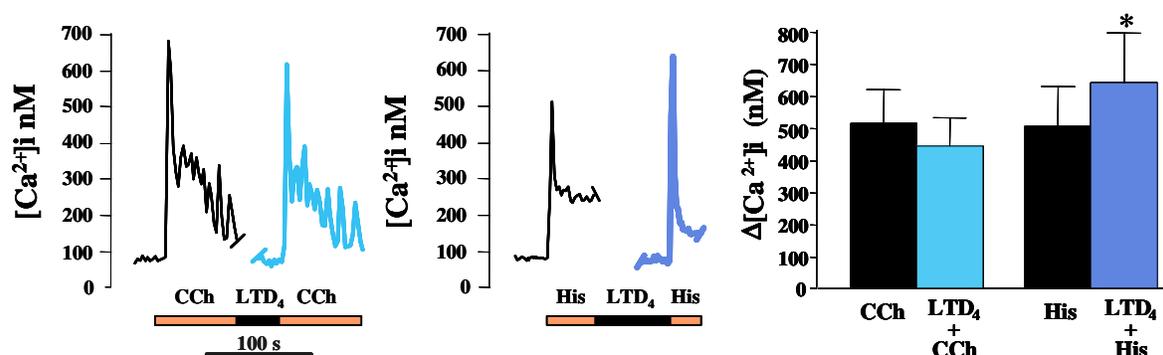


Figura 15. Efecto del LTD₄ (32 nM) sobre la respuesta a carbacol (CCh 10 μ M) o histamina (His, 100 μ M) en células de músculo liso traqueal de bovino. * $p < 0.05$ comparado con el grupo de His.

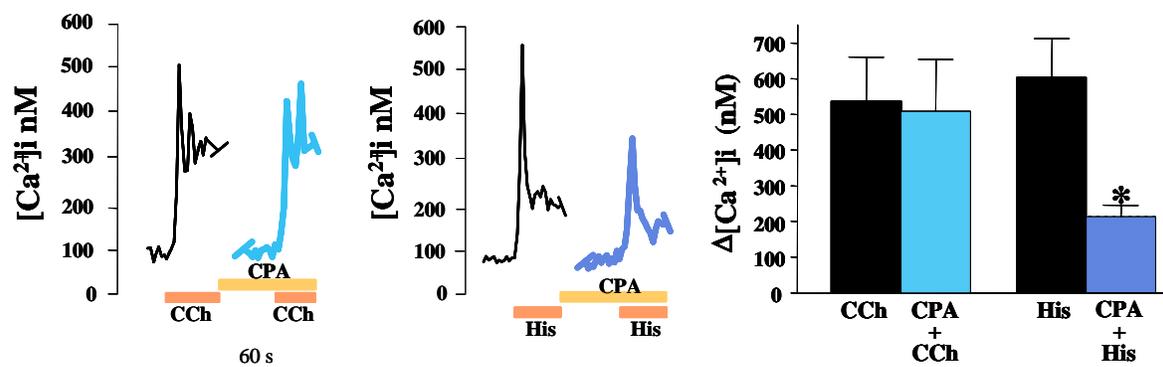


Figura 16. Efecto del ácido ciclopiazónico (CPA, 1 μ M) sobre la respuesta a carbacol (CCh, 3.1 μ M) o histamina (His, 3.1 μ M) en células de músculo liso traqueal de bovino.

Efecto del LTD₄ sobre la actividad de la ATPasa de Ca²⁺ del RS en células únicas de MLVA de bovino.

Para poder determinar si en el incremento del pico transitorio de Ca²⁺ inducido por LTD₄ a la histamina estaba involucrada la ATPasa de Ca²⁺ del RS, medimos indirectamente la actividad de la ATPasa evaluando el relleno de Ca²⁺ del RS por la respuesta de las células musculares lisas a la cafeína (ver metodología). Encontramos que el relleno de Ca²⁺ del RS en el grupo control fue de 0.716 ± 0.059 (E_2/E_1 , $n=13$). La perfusión de las células con 32 nM de LTD₄ ($n=9$) produjo

un incremento en el relleno de Ca^{2+} del RS (1.11 ± 0.14 , $p < 0.01$, Figura 16). La preincubación con genisteína ($10 \mu\text{M}$) significativamente anuló el efecto inducido por el LTD_4 (0.780 ± 0.036 , $n=9$, $p < 0.05$). Asimismo, corroboramos que el efecto de la genisteína no fuera debido a un efecto directo sobre el relleno de Ca^{2+} del RS, ya que el cociente E_2/E_1 (0.666 ± 0.145 , $n=4$), después de incubar con genisteína, no fue diferente de los controles ($p=0.71$). Adicionalmente, descartamos que el incremento en la respuesta a cafeína después de la incubación con LTD_4 no fuera debido a un efecto directo de este leucotrieno sobre el receptor de rianodina, ya que la respuesta a cafeína en Krebs normal no fue afectada por la preincubación con LTD_4 (cociente E_2/E_1 de 0.95 ± 0.08 vs control de 0.96 ± 0.08 , $n= 6-7$).

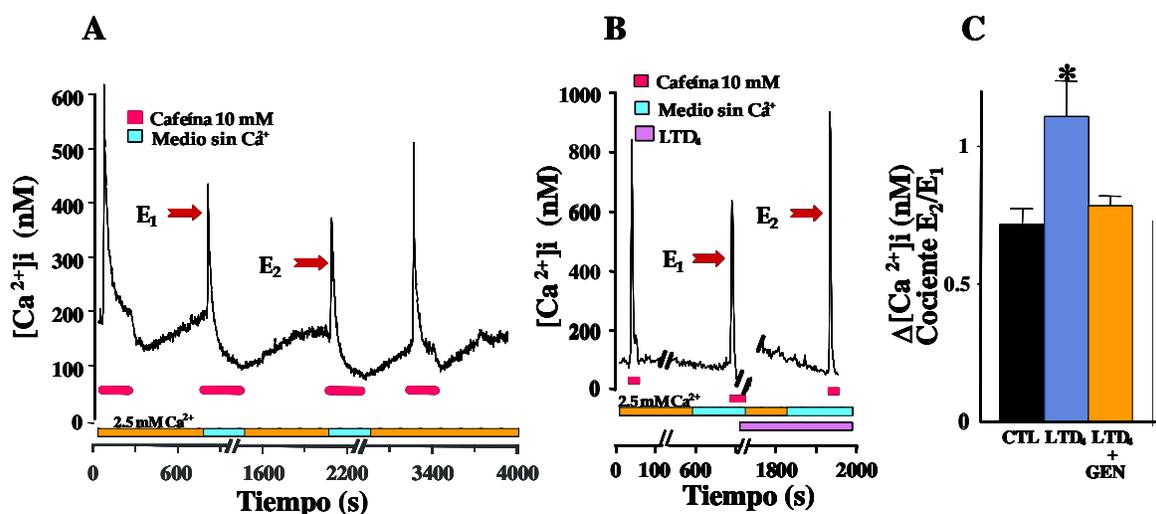


Figura 17. Efecto del LTD_4 (32 nM) sobre el relleno de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS) en células de músculo liso traqueal de bovino. A) Protocolo experimental para evaluar el relleno del RS usando cafeína (10 mM). B) Registros típicos del efecto del LTD_4 sobre el relleno de Ca^{2+} del RS. C) LTD_4 induce un incremento en el relleno de Ca^{2+} del RS, expresado como cociente E_2/E_1 , comparado con el grupo control (CTL). Genisteína (GEN, $10 \mu\text{M}$), completamente abolió el efecto de LTD_4 . E_1 , primera estimulación con cafeína; y E_2 segunda estimulación con cafeína. * $p < 0.01$.

4. DETERMINACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE ERK 1/2 EN TIRAS DE MÚSCULO LISO TRAQUEAL MEDIANTE ANÁLISIS DE WESTER BLOT

Participación de la vía de la cinasa de tirosina (TK) en la hiperreactividad inducida por el LTD₄ a la histamina.

El hecho de que la genisteína y no la daidzeína atenuó la hiperreactividad inducida por LTD₄ a la histamina sugiere la posible participación de la vía de la cinasa de la tirosina en este fenómeno por lo cual se decidió explorar su participación mediante la fosforilación de las MAP cinasas ERK 1/2, ya que estas proteínas participan en la cascada de transducción de esta vía. El análisis por densitometría de nuestros datos de Western Blots (n=5, para cada grupo) mostraron que LTD₄ causa un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.01$) de la fosforilación de ERK1 (2.4 veces el nivel basal). El efecto del LTD₄ fue notablemente aumentado al preincubarlo con L-cisteína al prevenir su degradación a LTE₄ ($p < 0.02$ para ERK1 y $p < 0.05$ para ERK2). La estimulación única con carbacol, pero no la de histamina produjo un incremento significativo ($p < 0.05$) de la fosforilación de ERK 1/2.

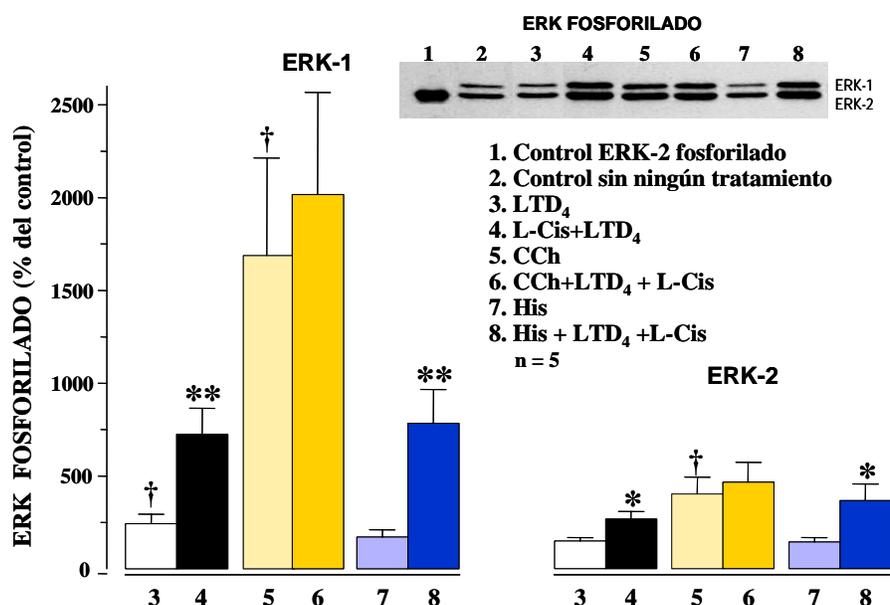


Figura 18. Análisis de Western Blot por densitometría de la MAPK-ERK-1y ERK-2 en el músculo liso traqueal de bovino sometido a diferentes tratamientos. Las barras blancas, representan los tejidos estimulados con los diferentes agonistas; las barras negras, tejidos estimulados con L-cisteína (L-Cis) + LTD₄; las barras en diagonal y cruzados, tejidos que fueron preincubados con L-Cis + LTD₄ antes de la estimulación de carbacol (Cch) o histamina (His), respectivamente. Todos los experimentos corresponden a una n=5. † $p < 0.05$ con respecto al grupo control sin ningún tratamiento (basal). * $p < 0.05$ y ** $p < 0.02$ con respecto a los tejidos estimulados solo con el agonista.

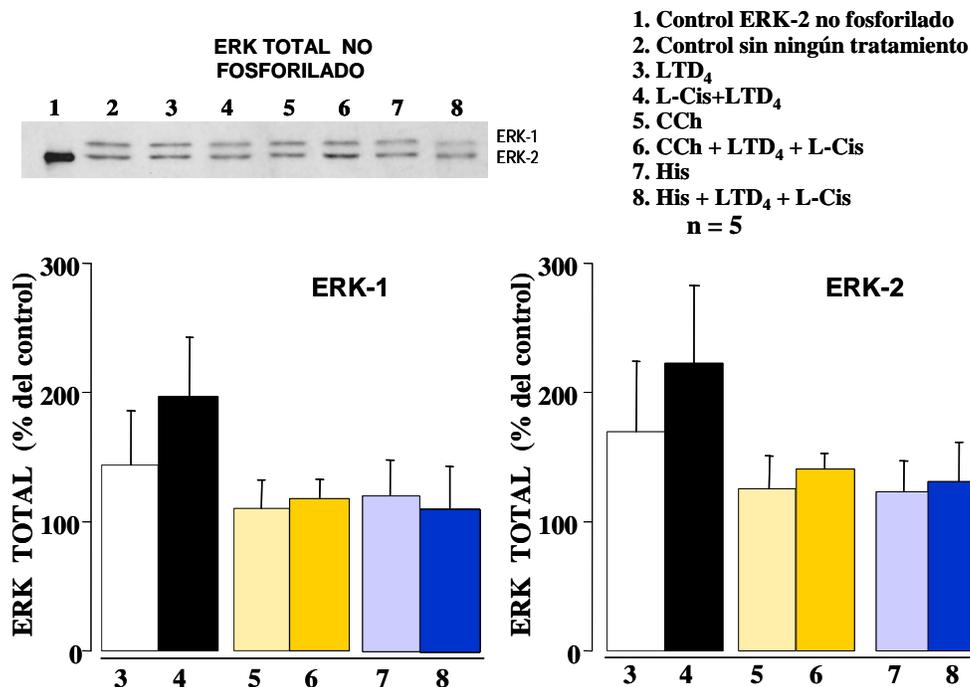


Figura 19. Análisis de Western Blot por densitometría de la MAPK ERK-1 y ERK-2 no fosforilada en el músculo liso traqueal de bovino sometido a diferentes tratamientos. Las barras blancas, representan los tejidos estimulados con los diferentes agonistas; las barras negras, tejidos estimulados con L-cisteína (L-Cis) + LTD₄; las barras en diagonal y cruzados, tejidos que fueron preincubados con L-Cis + LTD₄ antes de la estimulación de carbacol (Cch) o histamina (His), respectivamente. Todos los experimentos corresponden a una n=5.

LTD₄ no modificó la fosforilación inducida por carbacol pero causó un notable incremento en la fosforilación inducida por histamina tanto de ERK1 ($p < 0.02$) como de ERK2 ($p < 0.05$). (Figura 18).

Por otro lado, no hubo diferencias significativas en el análisis por densitometría de la MAPK ERK 1/2 no fosforilada (proteína total, Figura 19).

DISCUSIÓN

Los cisteinil-leucotrienos son mediadores químicos lípidicos responsables de producir obstrucción de las vías aéreas en humanos. Se sabe que los leucotrienos son mil veces más potentes para producir contracción que la histamina en el músculo liso de las vías aéreas de humanos y cobayos (Dahlen y col., 1983). Sin embargo, en algunos tejidos como el músculo liso traqueal de mono los LTs son menos activos que la histamina (Smedegard y col., 1982), e inclusive en vías aéreas de perro, cerdo y rata los LTs tienen una actividad menor o ninguna (Krell y col., 1981, Abela & Daniel, 1994, Setoguchi y col., 2001). Esto sugiere la existencia de una considerable variación en la respuesta de contracción a los LTs entre las diferentes especies. Por lo tanto, decidimos realizar algunos experimentos para demostrar que en el músculo liso traqueal de bovino se encuentran receptores a LTs. Los resultados que obtuvimos mostraron que tanto el LTC₄ como el LTD₄ contraen de manera modesta el músculo liso traqueal de bovino. Asimismo, también encontramos que la movilización de Ca²⁺ inducido por el LTD₄ (32 nM) era pequeña, lo cual fue equiparable con su respuesta de contracción (Figura 4).

Es bien conocido que para iniciar la contracción del músculo liso es necesario que primero exista un incremento en las [Ca²⁺]_i. Sin embargo, Accomazzo y col. en el 2001 demostraron que el LTD₄ producía contracción del músculo liso bronquial de humano con solo cambios muy pequeños en las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ intracelular y concluyeron que esta contracción se daba a través de la activación de mecanismos independientes a Ca²⁺, tales como la activación de la PKC-ε. Es muy probable, que la contracción inducida por el LTD₄ en el músculo liso traqueal de bovino se presente también a través de estos mecanismos independientes de Ca²⁺. Sin embargo, se requiere de mayor investigación al respecto para corroborar esta hipótesis.

Por otro lado, MK-571 inhibió casi completamente la contracción inducida por el LTD₄ (Figura 5). Estas evidencias nos sugiere la existencia de receptores a LTs en este tejido.

Los mecanismos inducidos por estos leucotrienos para producir la contracción del músculo liso han sido ampliamente estudiados y son similares a los descritos para los agonistas colinérgicos. Sin embargo, hay pocos estudios en los cuales se demuestre que estos leucotrienos potencien el efecto de contracción generado por agonistas histaminérgicos y/o colinérgicos (hiperreactividad). En este trabajo encontramos que el LTD₄ no modificó la respuesta de contracción producida por el carbacol (Figura 6). Estos resultados en cierta forma contrastan con lo reportado en las vías aéreas de sujetos asmáticos donde se ha encontrado hiperreactividad a la metacolina (Wubbel y col, 2004). Por lo tanto, la incapacidad del LTD₄ para inducir hiperreactividad a carbacol sugiere que, otras moléculas diferentes a LTD₄ pudieran estar involucradas en la generación de hiperreactividad de las vías aéreas, probablemente a través de diferentes mecanismos. Por ejemplo, Deshpande y col. (2003) encontraron que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) induce hiperreactividad a la acetilcolina (ACh) en células de músculo liso de las vías aéreas de humano, la cual parece estar mediada a través de un incremento en la producción de CD38/cADP ribosa, una vía que involucra la liberación de Ca²⁺ del RS a través de la activación del receptor-canal a rianodina (RyR). Por lo tanto, es muy probable que durante la hiperreactividad de las vías aéreas, cada mediador químico involucrado en el fenómeno esté induciendo un mecanismo diferente.

Es bien conocido que la L-cisteína es un inhibidor de la aminopeptidasa, enzima capaz de biotransformar al LTD₄ en LTE₄, el cual es un metabolito inactivo. En 1991 Ro y col. encontraron en traqueas de cobayo sensibilizadas pasivamente con IgG1, que la presencia de 10 mM de L-cisteína producía una disminución en la formación de LTE₄, con acumulación de LTD₄ en el líquido de perfusión. Por otro lado, Bäck y col. (2001), encontraron que LTD₄ producía contracción del músculo liso traqueal de cobayo y en presencia de L cisteína (5 mM) potenciaba significativamente la contracción inducida por este eicosanoide. Asimismo, cuando el metabolismo de [³H]-LTD₄ a [³H]-LTE₄ fue inhibido con 5 mM de L-cisteína, ellos encontraron un incremento en la concentración de [³H]-LTD₄ hasta de un 90% del total de los leucotrienos y una disminución significativa de [³H]-LTE₄. En este

contexto, nosotros encontramos que la L-cisteína (6 mM) causaba un desplazamiento hacia la izquierda de la curva concentración-respuesta a la histamina (Figura 8), es decir produjo hiperreactividad. Una posible explicación a este fenómeno es que este inhibidor permite la acumulación de LTD₄ endógeno y por lo tanto puede producir el mismo efecto del LTD₄ exógeno en las tiras de músculo liso traqueal de bovino.

El hecho que el LTD₄ produjo hiperreactividad a la histamina y no al carbacol nos llevo a preguntarnos si existía alguna diferencia en cuanto a los mecanismos inducidos por ambos agonistas para producir contracción. El inicio de la contracción del músculo liso traqueobronquial depende del incremento del Ca²⁺ citosólico. Los mecanismos responsables de llevar a cabo dicha acción son variables y dependen del estímulo aplicado. En el caso de los agonistas colinérgicos, que son los más estudiado, producen los siguientes efectos vía la estimulación de los receptores muscarínicos (M₃): a) liberación de Ca²⁺ del RS por la vía de 1,4,5 trifosfato de inositol (IP₃) (Baron y col., 1984; Montañó y col., 1996; Bazán y col. 1998) y b) entrada de Ca²⁺ extracelular a través de canales operados por receptor y por canales dependientes de voltaje tipo L (Montañó y col., 1996; Janssen y col., 1997; Fleischmann y col., 1997). Por otro lado, los agonistas histaminérgicos también liberan Ca²⁺ del RS por la vía de IP₃, pero se ha propuesto que el incremento de las [Ca²⁺]_i depende principalmente de la entrada de Ca²⁺ extracelular (Kannan y col., 1987). En este estudio encontramos que el LTD₄ no modificó la respuesta de contracción ni los incrementos de [Ca²⁺]_i inducidos por el carbacol, pero si produjo hiperreactividad a la histamina al incrementar la respuesta de Ca²⁺ intracelular y contracción máxima (Figura 9 y 10). Se conoce que ambos agonistas comparten mecanismos de transducción similares, pero es bien conocido que la respuesta muscarínica a diferencia de la histaminérgica, depende fuertemente de la producción de IP₃ con la subsecuente liberación de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico (Baron y col., 1984; Bazán-Perkins y col., 1998). Asimismo, y como ha sido observado por otros (Kannan y col., 1987), encontramos que la participación de los canales de Ca²⁺ tipo L en la respuesta de contracción a agonistas muscarínicos es mínima, mientras que la tensión

desarrollada por la histamina depende principalmente de pozas de calcio extracelular.

Nosotros descartamos que el incremento en la respuesta de calcio intracelular a la histamina inducido por LTD₄ fuera debido a la participación de los canales de Ca²⁺ tipo L, ya que la incubación del tejido con LTD₄ no modificó los cambios de Ca²⁺ inducidos por KCl. Sin embargo este leucotrieno incrementó la respuesta de contracción inducida por el KCl (Figura 9 y 10). Estos hallazgos sugieren que el aumento en la tensión del músculo liso de las vías aéreas producido por la histamina no fue debido a un incremento en la entrada de calcio extracelular y que otros mecanismos, probablemente a través de procesos de fosforilación pueden estar involucrados.

El aumento en la reactividad a KCl inducido por el LTD₄ fue anulado por la genisteína, sugiriendo la participación de la vía de la cinasa de tirosina. Sin embargo, la genisteína también produjo una reducción significativa de la respuesta de KCl, por eso no está claro hasta que punto la disminución de la hiperreactividad inducida por LTD₄ causada por la genisteína fue el resultado de un efecto directo de este fármaco sobre la respuesta de KCl. Por otro lado, en un estudio reciente, Setoguchi y col. (2001) exploraron por primera vez los posibles mecanismos para explicar la hiperreactividad inducida por LTC₄ en tiras de músculo liso traqueal de cerdo. Ellos encontraron que la preincubación de LTC₄ casi duplicaba la respuesta de contracción a 40 mM de KCl sin afectar el cociente de fluorescencia de Ca²⁺ y que la vía de la rho-cinasa era responsable de este fenómeno. También encontraron que la genisteína no modificaba la hiperreactividad inducida por el LTC₄ a KCl. A pesar de que estos resultados difieren de los nuestros con respecto a la participación de la cinasa de tirosina en la hiperreactividad inducida por los leucotrienos al KCl, es muy probable que esta diferencia se deba a que se utilizaron diferentes especies.

Por otro lado, se ha descrito, en diversos estudios, que la cinasa de tirosina está involucrada en la contracción del músculo liso y la movilización de Ca²⁺. Esta cinasa está acoplada a una cascada de fosforilación de proteínas que incluye a las cinasas activadoras de mitógenos (MAPK: ERK 1/2). Se ha sugerido que las

MAPK regulan la miosina indirectamente a través de caldesmon (Somlyo y col., 2003; Gethoffer y col., 1997). En diversos trabajos se han utilizado inhibidores de estas cinasas tales como genistéina y tirfostina y se ha demostrado que estos compuestos atenúan la contracción del músculo liso inducido por factores de crecimiento y diferentes péptidos vasoactivos (Srivastava y col., 1997). Además, la participación de la cinasa de tirosina en la actividad del LTD₄ ha sido postulada para explicar su efecto contráctil sobre el músculo liso (Snetkov y col., 2001; Wong y col., 1997). En este contexto, nosotros encontramos que los cambios inducidos por LTD₄ en las tiras de músculo liso y en miocitos fueron anulados por genistéina (Figura 11).

A pesar de que la genistéina es considerada como un inhibidor de la vía de la cinasa de tirosina, también posee otros efectos no específicos (Geissler y col., 1990). Por lo tanto, para descartar tales acciones no específicas, utilizamos daidzeína (control negativo), una sustancia que tiene todos los efectos de la genistéina excepto la capacidad de inhibir a la cinasa de tirosina. Nosotros encontramos que la genistéina, pero no la daidzeína, anuló la hiperreactividad inducida por el LTD₄ a la histamina tanto en el incremento de calcio como en la contracción. Estos resultados nos sugieren la participación de la vía de la cinasa de tirosina en este fenómeno (Figura 11 y 12). Esta posibilidad fue corroborada por el análisis de fosforilación de las MAPK ERK 1/2 (estas proteínas forman parte de la cascada de cinasas activadas vía la cinasa de tirosina). En estos experimentos encontramos que la preincubación de los tejidos con LTD₄ notablemente incrementa la cantidad de proteínas fosforiladas de ERK 1/2 (Figura 18).

Se sabe que el LTD₄ actúa a través de su receptor cys-LT1 (Dumitriu y col., 1997; Snetkov y col., 2001; Accomazzo y col., 2001) que se encuentra acoplado a proteínas G, específicamente Gq (Howard y col., 1992) y actualmente está bien documentado que existe una comunicación cruzada entre la vía de señalización de los receptores acoplados a proteínas G y la vía de la cinasa de tirosina (Jin y col., 1996; Tolloczko y col., 2000). Esta situación significa que el LTD₄ puede estimular ambas vías de señalización, es decir, la tradicional que involucra la

liberación de Ca^{2+} del RS y la cinasa de tirosina. Un gran número de estudios en el músculo liso han demostrado que una consecuencia de la activación de ERK 1/2 es la fosforilación de caldesmon (Gethoffer y col., 1997; Hedges y col., 2000). La función de caldesmon es inhibir la interacción de los filamentos de actina y miosina mediante la inhibición de la ATPasa de miosina y de esta forma evitar la contracción, cuando caldesmon es fosforilado su efecto inhibitorio desaparece permitiendo la contracción del músculo liso (Katsuyama y col., 1992). Por lo tanto, si LTD_4 induce la activación de ERK 1/2, entonces pudiera estar produciendo la fosforilación de caldesmon, facilitando la contracción. Por lo tanto, este efecto del LTD_4 puede constituir uno de los mecanismos involucrados en la hiperreactividad inducida por este compuesto a la histamina.

También encontramos que por si solo el carbacol es capaz de inducir una fosforilación intensa de ERK 1/2, y que en presencia de LTD_4 no aumentó esta acción, lo cual está de acuerdo con la falta de efecto de este eicosanoide sobre la contracción inducida por carbacol. En contraste, la histamina no modificó los niveles basales de fosforilación de ERK 1/2, pero un notable aumento de este efecto puede ser observado cuando los tejidos de músculo liso fueron incubados con LTD_4 (Figura 18). Estos resultados podrían explicar el aumento de la respuesta a histamina cuando los tejidos fueron preincubados con LTD_4 .

Hasta este momento, los hallazgos anteriores nos sugieren que el mecanismo de fosforilación implicado en el incremento de contracción del músculo liso traqueal de bovino inducido por el LTD_4 a la histamina es a través de la vía de la cinasa de tirosina, pero ¿qué mecanismos estarán implicados en el incremento del pico de Ca^{2+} intracelular en el fenómeno inducido por el LTD_4 ? Como lo mencionamos anteriormente, la participación de los canales de Ca^{2+} tipo L en la hiperreactividad inducida por el LTD_4 fue descartada. Por otro lado, es bien conocido que la respuesta colinérgica depende fuertemente de la producción de IP_3 , con la subsecuente liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS) (Baron y col., 1984; Bazán-Perkins y col., 1998), mientras que la contracción inducida por histamina depende principalmente de fuentes de Ca^{2+} extracelular (Figura 14). Aunque la histamina puede inducir la producción de IP_3 , la cantidad de este

segundo mensajero es mucho más baja que la cantidad producida por agentes muscarínicos (Bazan-Perkins y col., 1998; Rueda y col., 2002). Además, se ha descrito en el músculo liso de la vejiga que la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} del RS es requerida para una apropiada respuesta a la histamina, pero no así para la estimulación colinérgica (Aguilar-Maldonado y col., 2003; Rueda y col., 2002). En este contexto, encontramos que la ATPasa de Ca^{2+} del RS juega un papel fundamental en el caso de histamina, ya que cuando deterioramos parcialmente esta bomba con ácido ciclopiazónico (CPA, bloqueador de la bomba de Ca^{2+} del RS) disminuyó hasta un 65% la respuesta de Ca^{2+} inducida por este agonista. Sin embargo, afectó minimamente la respuesta a carbacol (5.4%) (Figura 16).

Estos hallazgos nos llevaron a preguntarnos si el incremento en el pico transitorio de Ca^{2+} inducido por LTD_4 a la histamina participaba la ATPasa de Ca^{2+} del RS. Nosotros encontramos que el LTD_4 produjo un incremento significativo en la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} del RS (Figura 17), lo cual podría explicar el porque este eicosanoide incrementó el pico transitorio de Ca^{2+} inducido por la histamina sin afectar la respuesta al carbacol. Asimismo, también encontramos que la genisteína disminuyó significativamente el incremento en la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} del RS inducida por el LTD_4 . Un mecanismo que explique la relación entre la vía de la cinasa de tirosina y la actividad de la bomba de Ca^{2+} no ha sido descrito aún. Se conoce que la ATPasa de Ca^{2+} puede ser inhibida por el fosfolamban (proteína que en su estado no fosforilado inhibe la actividad de la ATPasa del RS), pero tal efecto inhibitorio finaliza cuando esta proteína es fosforilada por la cinasa de proteína A (PKA) dependiente de AMPc, por la cinasa de proteína G (PKG), por la PKC, o la cinasa dependiente de calmodulina (Cornwell y col., 1991; Nobe y col., 2001; Grover y Khan, 1992). En este sentido, también se ha postulado que la cinasa dependiente de calmodulina fosforila directamente a la bomba de Ca^{2+} activándola (Grover y col., 1996). De acuerdo a lo anterior, puede ser posible que la vía de la cinasa de tirosina, juegue un papel similar como las cinasas de proteína mencionadas previamente, ya que podría fosforilar a fosfolamban o fosforilar directamente a la bomba y como consecuencia

incrementar la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} . Sin embargo esta posibilidad tendría que ser demostrada.

La cinasa de proteína C (PKC) es un componente central en el metabolismo de los fosfolípidos en la membrana plasmática. En el músculo liso la PKC se considera que juega un papel significativo en mediar respuestas celulares tales como crecimiento celular, diferenciación, e hipertrofia. Además de estas funciones, esta implicada en la regulación de la señalización de calcio inducida por agonistas (Smeets y col., 1998). Se considera que la PKC está involucrada en la fase sostenida de la contracción del músculo liso al incrementar la sensibilidad de la maquinaria contráctil (Rasmussen y col., 1987; Al-Hassani y col., 1993; Gerthoffer, 1991; Roux y col., 1995). Sin embargo, nosotros encontramos que los cambios inducidos por el LTD_4 a las respuestas producidas por la histamina en las tiras de músculo liso traqueal de bovino no fueron modificados por la estaurosporina ni por la cheleritrina, sugiriendo que la PKC no participa en la hiperreactividad inducida por el LTD_4 .

En conclusión nuestros resultados sugieren que el LTD_4 induce hiperreactividad a la histamina en el músculo liso traqueal de bovino a través de la activación de la vía de la cinasa de tirosina, probablemente por la activación de las MAPK ERK 1/2, e incrementar la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} del RS. Los canales de Ca^{2+} tipo L parecen no participar.

PERSPECTIVAS

En este trabajo encontramos que el LTD₄ induce hiperreactividad a la histamina pero no al carbacol. Estos hallazgos experimentales nos permiten proponer que los mediadores químicos involucrados en producir hiperreactividad de las vías aéreas, tales como el LTD₄, TXA₂, PGD₂ y TNF- α , parecen tener más bien efectos específicos y que cada una de estas sustancias podrían tener una vía de señalización independiente. Esta situación explicaría el porque los antagonistas de los leucotrienos están clasificados como ahorradores de esteroides en el tratamiento del asma.

Por otro lado, aunque en este trabajo describimos algunos de los mecanismos involucrados en la hiperreactividad producida por el LTD₄, aún quedan cabos sueltos que requieren de nuestra atención por lo que en un futuro próximo exploraremos si la activación de la cinasa de tirosina por el LTD₄, vía las MAPK ERK 1/2, fosforilan al fosfolamban o actúan directamente sobre la ATPasa de Ca²⁺ del RS. Asimismo, investigaremos si estas cinasas fosforilan al caldesmon en el músculo liso de la vía aérea como ha sido reportado en otros tejidos.

REFERENCIAS

Accomazzo M.R., Rovati G.E., Viganò T., Hernández A., Bonazzi A., Bolla M., Fumagalli F. and Viappiani S. Leukotriene D₄-induced activation of smooth-muscle cells from human bronchi is partly Ca²⁺-independent. *Am J Respir Crit Care Med* 163(1): 266-72, 2001.

Abela A. and E.E. Daniel. Neural and myogenic effects of leukotrienes C₄, D₄, and E₄ on canine bronchial smooth muscle. *Am J Physiol* 266 (Lung Cell Mol Physiol 10): L414-L425, 1994.

Aguilar-Maldonado B., Gomez-Viquez L., García L, Del Angel R.M., Arias-Montano J.A. and Guerrero-Hernández A. Histamine potentiates IP₃-mediated Ca²⁺ release via thapsigargin-sensitive Ca²⁺ pumps. *Cell Signal* 15:689-697,2003.

Al-Hassani M.H., García J.G. and Gunst S.J. Different Ca²⁺ mobilization by muscarinic agonist in tracheal smooth muscle. *Am J Physiol* 264 (Lung Cell Mol Physiol 8): L53-L59, 1993.

Amrani Y., Magnier C., Enouf J., Wuytack F. and Bronner. Ca²⁺ increase and Ca²⁺ -influx in human tracheal smooth muscle cells: role of Ca²⁺ pools controlled by sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2 isoform. *Br J Pharmacol* 115: 1205-1210, 1995.

Amrani Y. and Panettieri Jr. R.A. Cytokines induce airway smooth muscle cell hyperresponsiveness to contractile agonists. *Thorax* 53(8): 713-716, 1998.

Bäck M., Kumlin M., Cotgreave I.A. and Dahmén S.E. An alternative pathway for metabolism of leukotriene D₄: effects on contractions to cysteinyl leukotrienes in the guinea-pig trachea. *Br. J. Pharmacol* 133: 1134-1144, 2001.

Barnes N. C. Are leukotrienes involved in causing bronchial hyperresponsiveness?. *Eur Respir J* 10: 2701-2703, 1997.

Barnes P. J. Inflammatory mechanisms and nocturnal asthma. *Am J Med* 85 (1B): 64-70, 1988.

Barnes P.J. Overview of neural mechanisms in asthma. *Pulm Pharmacol* 8: 151-159, 1995.

Barnes P.J. Respiratory Pharmacology. General Pharmacology Principles. Sección C, 1994.

Baron C.B., Cunningham M., III Straus J.F. and Coburn R.F. Pharmacomechanical coupling in smooth muscle may involve phosphatidylinositol metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 81: 6899-6903, 1984.

Bazan-Perkins B., Carbajal V., Sommer B., Macias-Silva M., Gonzalez M., Valenzuela F. and L.M. Montaña. Involvement of different Ca^{2+} pools during the canine bronchial sustained contraction in Ca^{2+} -free medium: lack of effect of PKC inhibition. *Naunyn Schm Arch Pharmacol* 358(5): 567-573, 1998.

Bazán-Perkins B., Flores-Soto E., Barajas-López C., and Montaña L.M. Role of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content in Ca^{2+} entry of bovine airway smooth muscle cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 368: 277-283, 2003.

Bittleman D.B. and T.B. Casale. Allergic Models and Cytokines. *Am J Respir Crit Care Med* 150: S72-S76, 1994.

Breslin J.W., Pappas P.J., Cerveira J.J., Hobson R.W. 2nd, and Duran W.N. VEGF increases endothelial permeability by separate signaling pathways involving ERK-1/2 and nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284(1): H92-H100, 2003.

Chiba Y. and M. Misawa. Alteration in Ca^{2+} availability involved in antigen-induced airway hyperresponsiveness in rats. *Eur J Pharmacol* 278: 79-82, 1995.

Claesson H.E. and Dahlén S.E. Asthma and Leukotrienes: antileukotrienes as novel anti-asthmatic drugs. *J Intern Med* 245: 205-227, 1999.

Cornwell T.L., Pryzwansky K.B., Wyatt T.A. and Lincoln T.M. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 40: 923-931, 1991.

Croxton T.L., Lande B. and Hirshman C.A. Role of G proteins in agonist-induced Ca^{2+} sensitization of tracheal smooth muscle. *Am J Physiol* 275 (Lung Cell Mol Physiol 19): L748-L755, 1998.

Dahlen S.E., Hedqvist P., Hammarstrom S. and Samuelsson B. Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. *Nature* 288: 484-486, 1980.

Dahlen S.E., Hedqvist P., Westlund P., Granstrom E., Hammarstrom S., Lindgren J. A. and Radmark O. Mechanisms of leukotriene-induced contractions of guinea pig airways: leukotriene C_4 has a potent direct action whereas leukotriene B_4 acts indirectly. *Acta Physiol Scand* 118: 393-403, 1983.

Deshpande D. A., Walseth T.F., Panettieri R. A. and Kannan M.S. CD38/cyclic ADP-ribose-mediated Ca^{2+} signaling contributes to airway smooth muscle hyperresponsiveness. *FASEB J* 17: 452-454, 2003.

Devillier P., Baccard N. and Advenier C. Leukotrienes, leukotriene receptor antagonists and leukotriene synthesis inhibitors in asthma: An update. Part I: Synthesis, receptors and role of leukotrienes in asthma. *Pharmacol Res* 40(1): 3-13, 1999.

Dumitriu, D., Prie, S., Bernier, S.G., Guillemette, G. and Sirois, P. Mechanism of action of leukotriene D₄ on guinea pig tracheal smooth muscle cells: roles of Ca⁺⁺ influx and intracellular Ca⁺⁺ release. *J Pharmacol Exp Ther* 280: 1357-1365, 1997.

Ellis J.L. and Udem B.J. Role of cysteinyl-leukotrienes and histamine in mediating intrinsic tone in isolated human bronchi. *Am J Respir Crit Care Med* 149(1): 118-22, 1994.

Endo M. and M. Iino. Calcium mobilization from intracellular stores in smooth muscle cells. *Biomedical Research* 14 (Suppl. 2):29-33, 1993.

Expert Panel Report 2. Guidelines for the diagnosis and management of Asthma Bethesda, Md: National Institute of Health Pub 97: 4051, 1997.

Fawcett D.W. Tratado de Histología. 11ª edición. México, Interamericana, 1989. 1026 pp.

Fleischmann B.K., Y-X. Wang and M.I. Kotlikoff. Muscarinic activation and calcium permeation of nonselective cation currents in airway myocytes. *Am J Physiol* 272 (Cell Physiol 41): C341-C349, 1997.

Funk C.D. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871-1875, 2001.

Geissler J.F., Traxler P., Regenass U., Murray B.J., Roesel J.L., Meyer T., McGlynn E., Storni A. and Lydon N.B. Thiazolidine-diones. Biochemical and biological activity of a novel class of tyrosine protein kinase inhibitors. *J Biol Chem* 265: 22255-22261, 1990.

Gerthoffer W.T. Regulation of the contractile element of airway smooth muscle. *Am J Physiol* 261 (Lung Cell Mol Physiol 5): L15-L28, 1991.

Gerthoffer W.T., Yamboliev I.A., Pohl J., Haynes R., Dang S. and McHugh J. Activation of MAP kinases in airways smooth muscle. *Am J Physiol* 272 (Lung Cell Mol Physiol) 16: L-244-L252, 1997.

Grippi M.A. Pulmonary pathophysiology. Lippincott's Pathophysiology Series. E.U.A. Lippincott company, 1995. 77-95 p-p.

Grover A.K. and Khan I. Calcium pump isoforms: diversity, selectivity and plasticity. *Cell Calcium* 13: 9-17, 1992.

Grover A.K., Xu A., Samson S.E. and Narayanan N. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in pig coronary artery smooth muscle is regulated by a novel pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 271: C181-C187, 1996.

Gryniewicz G., M. Poenie and R.Y. Tsien. A new generation of Ca^{++} indicators with greatly improved fluorescences properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450, 1985.

Hargreave, F.E., J. Dolovich, P. M. O'byrne, H Ramsdale and E.E. Daniel. The origin of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 78 : 825-832, 1986.

Hargreave, F.E., G. Ryan, N. C. Thomson, P. M. O'byrne, K. Latimer, E.F. Juniper and H. Dolovich. Bronchial responsiveness to histamine or methacoline in asthma: measurement and clinical significance. *J Allergy Clin Immunol* 68: 347-355, 1981.

Hedges J., Oxborn B.C., Carty M., Adam L.P., Yamboliev I.A. and Gerthoffer W.T. Phosphorylation of caldesmon by ERK MAP kinases in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: C718-C726, 2000.

Hemric ME, Lu F.W.M., Shrager R., Carey J., and Chalovich J.M. Reversal of caldesmon binding to myosin with calcium-calmodulin or by phosphorylating caldesmon. *J. Biol. Chem.* 268: 15305-15311, 1993.

Howard S., Chan-Yeung M., Martin L., Phaneuf S. and Salari H. Polyphosphoinositide hydrolysis and protein kinase C activation in guinea pig tracheal smooth muscle cells in culture by leukotriene D_4 involve a pertussis toxin sensitive G-protein. *Eur J Pharmacol* 227:123-129, 1992.

Janssen, L.J. Acetylcholine and caffeine activate Cl^- and suppress K^+ conductance in human bronchial smooth muscle. *Am J Physiol* 270 (Lung Cell Mol Physiol 14): L772-L781, 1996.

Janssen, L.J., D.K. Walters and J. Wattie. Regulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in canine airway smooth muscle by Ca^{2+} -ATPase and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange mechanisms. *Am J Physiol* 273 (Lung Cell Mol Physiol 17): L322-L330, 1997.

Jeffery P.K., A.J. Wardlaw, F. Nelson, J.V. Collins and A.B. Kay. Bronchial biopsies in asthma. An ultra structural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 140: 1745-1753, 1989.

Jin N., Siddiqui RA, English D. and Rhoades RA. Communication between tyrosine kinase pathway and myosin light chain kinase pathway in smooth muscle. *Am J Physiol* 271:H1348-55, 1996.

Kannan M.S., Davis C., Ladenius A.R. and Kannan L. Agonist interactions at the calcium pools in skinned and unskinned canine tracheal smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 65: 1780-1787, 1987.

Kajita J. and H. Yamaguchi. Calcium mobilization by muscarinic cholinergic stimulation in bovine single airways smooth muscle. *Am J Physiol* 264 (Lung Cell Mol Physiol 8): L496-L503, 1993.

Katsuyama H., Wang C.L. and Morgan K.G. Regulation of vascular smooth muscle tone by caldesmon. *J Biol Chem* 267: 14555-14558, 1992.

Kitazawa T., Masuo M. and Somlyo A.P. G-protein-mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle. *Proceed Natl Acad Sci USA* 88: 9307-9310, 1991.

Krell R.D., Osborn R., Vickery L., Falcone K., O'Donnell M., Gleason J., Kinzig C. and Bryan D. Contraction of isolated airway smooth muscle by synthetic leukotrienes C₄ and D₄. *Prostaglandins* 22: 387-409, 1981.

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-5, 1970.

Montaño L.M., G.L. Jones, P.M. O'byrne and E.E. Daniel. Effect of ozone exposure in vivo on response of bronchial rings in vitro: Role of Intracellular Ca²⁺. *J Appl Physiol* 75(3): 1315-1322, 1993.

Montaño L.M., C. Barajas-Lopez and E.E. Daniel. Canine bronchial sustained contraction in Ca²⁺-free medium: role of intracellular Ca²⁺. *Can J Physiol Pharmacol* 74: 1236-1248, 1996.

Montano LM, Carbajal V, Arreola JL, Barajas-Lopez C, Flores-Soto E, Vargas MH. Acetylcholine and tachykinins involvement in the caffeine-induced biphasic change in intracellular Ca²⁺ in bovine airway smooth muscle. *Br J Pharmacol* 139:1203-11, 2003.

Nicosia S., Capra V. and Rovati G.E. Leukotrienes as mediators of asthma. *Pulmonary Pharmacology Therapeutics* 14: 3-19, 2001.

Nobe K., Sutliff R.L., Kranias E.G. and Paul R.J. Phospholamban regulation of bladder contractility: evidence from gene-altered mouse models. *J Physiol* 535: 867-878, 2001.

O'Byrne P.M. Airway inflammation and asthma. *Aliment Pharmacol Ther* 10 (Suppl 2): 18-24, 1996.

O'Byrne P.M. and Mark D.I. Airway Hyperresponsiveness. *Chest*. 123: 411S-416S, 2003.

Pennings, H.J., K. Kramer, A. Bast, W.A. Buurman and E.F.M. Wouters. Tumour necrosis factor- α induces hyperreactivity in tracheal smooth muscle of guinea-pig in vitro. *Eur Respir J* 12: 45-49, 1998.

Perpiña M., J. Cortijo, E. Fornas, M. Palau, J.L. Ortiz and E. Morcillo. Hyperreactivity and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ movements in sensitized guinea-pig tracheal muscle. *Eur Res J* 4: 450-457, 1991.

Petrolani M. and M. Goldman. Cytokines involved in the downregulation of allergic airway inflammation. *Biology of airway inflammation*. 68th Forum in Immunology. 33-38, 1996.

Rasmussen H., Takuwa Y. and Park S. Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction. *FASEB J* 1: 177-185, 1987.

Ro J.Y., Buckner C.K., Brendel J.K., Fishleder R.I. and Graziano F.M. Influence of indomethacin and L-cysteine on histamine and peptidoleukotriene release from superfused tracheas taken from guinea pigs passively sensitized with IgG1 and IgE antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 87: 1150-1160, 1991.

Roux F., Mavoungou E., Naline E., Lacroix H., Tordet C., Advenier C. and Gandordy B.M. Role of 1,2-sn diacylglycerol in airway smooth muscle stimulated by carbachol. *Am J Resp Crit Care Med* 151: 1745-1751, 1995.

Rueda A, García L. and Guerrero-Hernandez A. Luminal Ca^{2+} and the activity of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pumps modulate histamine-induced all-or-none Ca^{2+} release in smooth muscle cells. *Cell Signal* 14: 517-527, 2002.

Setoguchi H., Nishimura J., Hirano K., Takahashi S. and Hideo K. Leukotriene C_4 enhances the contraction of porcine tracheal smooth muscle through the activation of Y-27632, a rho kinase inhibitor, sensitive pathway. *Br J Pharmacol* 132: 111-118, 2001.

Smedegard G., Hedqvist P., Dahlen S.E., Revenas B., Hammarstrom S. and Samuelsson B. Leukotriene C_4 affects pulmonary and cardiovascular dynamics in monkey. *Nature* 295 (5847): 327-9, 1982.

Smeets R.L., Rao R.V., Van Emst-de Vries S.E., de Pont J.J.H.H.M., Miller L.J. and Willems P.H. Reduced cholecystinin receptor phosphorylation and restored signaling in protein kinase C down-regulated rat pancreatic acinar cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 435: 422-428, 1998.

Snetkov V.A., Hapgood K.J., Mcvicker C.G., Lee T.H. and Ward J.P. Mechanisms of leukotriene D_4 -induced constriction in human small bronchioles. *Br J Pharmacol* 133(2): 243-52, 2001.

Somlyo A.P., Kitazawa T., Himpens B., Matthijs G., Horiuti K., Kobayashi S., Goldman Y. E. and A.V. Somlyo. Modulation of Ca^{2+} -sensitivity and of the time course of contraction in smooth muscle: a major role of protein phosphatases? *Advances in Protein Phosphatases*. 5: 181-195, 1989.

Somlyo A.P. and A.V. Somlyo. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature Lond.* 372: 231-236, 1994.

Somlyo A.P. and A.V. Somlyo. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol* 522(2): 177-185, 2000.

Somlyo, Andrew P. and Avril V. Somlyo. Ca^{2+} Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. *Physiol Rev* 83: 1325–1358, 2003.

Spector S.L. Leukotriene activity modulation in asthma. *Drugs* 54 (3): 369-384, 1997.

Srivastava A.K. and St-Louis J. Smooth muscle contractility and protein tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biochem* 176 (1-2): 47-51, 1997.

Takata S., H. Aizawa, M. Shigyo, K. Matsumoto, H. Inoue, H. Koto and N. Hara. Thromboxane A_2 mimetic (U-46619) induces hyperresponsiveness of smooth muscle in the canine bronchiole, but not in the trachea. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 54 (2): 129-134, 1996.

Takuwa Y., Takuwa N. and Rasmussen H. Measurement of cytoplasmic free Ca^{2+} concentration in bovine tracheal smooth muscle using aequorin. *Am J Physiol* 253: (Cell Physiol 22): C817-C827, 1987.

Tolloczko B., Tao F.C., Zacour M.E. and Martin J.G. Tyrosine kinase-dependent calcium signaling in airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278(6): L1138-45, 2000.

Tortora G.J. and Grabowski S.R. *Principios de Anatomía y Fisiología*. 9ª Edición. México, Oxford University Press, 2003. 783-793 p-p.

Vargaftig B.B. and P.G. Braquet. PAF-acether today- Relevance for acute experimental anaphylaxis. *British Medical Bulletin* 43(2): 312-335, 1987.

Yamaguchi H., Kajita J. and Madison M. Isoproterenol increases peripheral $[Ca^{2+}]_i$ and decreases $[Ca^{2+}]_i$ in single airways smooth muscle cells. *Am J Physiol* 268 (Cell Physiol 37): C770-C779, 1995.

Wong W.S., Koh D.S., Koh A.H., Ting W.L. and Wong P.T. Effect of tyrosine kinase inhibitors on antigen challenge of guinea pig lung in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 131-137, 1997.

Wubbel C., Asmus M.J., Stevens G., Chesrown S.E. and Hendeles L. Methacoline challenge testing: Comparison of the two American Thoracic Society-recommended methods. *Chest* 125: 453 –458, 2004.

ANEXO I

Publicación generada por esta tesis:

Verónica Carbajal, Mario H. Vargas, Edgar Flores-Soto, Erasmo Martínez-Cordero, Blanca Bazán-Perkins and Luis M. Montaña. LTD₄ induces hyperresponsiveness to histamine in bovine airway smooth muscle: role of SR-ATPase Ca²⁺ pump and tyrosine kinase. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 288: L84-L-92, 2005.