

11261



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

3 ~~2es.~~

CONTRACCION BRONQUIAL SOSTENIDA EN UN MEDIO SIN CALCIO: PARTICIPACION DEL TRIFOSFATO DE INOSITOL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS (F A R M A C O L O G I A) P R E S E N T A : Biól. Exp. VERONICA E. CARBAJAL SALINAS ^{stela}

MEXICO, D. F.

MARZO 1998.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

259234



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**CONTRACCION BRONQUIAL SOSTENIDA EN UN MEDIO SIN
CALCIO: PARTICIPACION DEL TRIFOSFATO DE INOSITOL**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

P R E S E N T A :

BIOL. EXP. VERONICA ESTELA CARBAJAL SALINAS

TUTOR:

DRA. MARIA GUADALUPE CAMPOS LARA.

COASESORES:

**DR. LUIS MANUEL MONTAÑO RAMIREZ.
DRA. MARINA MACIAS SILVA.
DR. MARCO GONZALEZ MARTINEZ**

**MEXICO, D.F.
1998**

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores:

Dra. María Guadalupe Campos Lara.

Por motivarme en cada momento a seguir adelante y brindarme toda su amistad

Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez.

No tengo palabras para agradecerle todo lo que ha hecho por mí. Gracias por brindarme su tiempo, paciencia y conocimientos.

Dra. Marina Macías Silva.

Por su esfuerzo en enseñarme y transmitirme todos sus conocimientos y su paciencia. Mil gracias Marina

Dr. Marco González Martínez.

Gracias por las sugerencias al trabajo realizado, así como su amistad.

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

***Al Dr. J. Adolfo García Sáinz por su valiosa ayuda y permitirme realizar el montaje de la técnica de IP₃ en su laboratorio, así como el uso de los reactivos y equipos.**

***A Carlos Ramos Abraham y Martha Montañó por permitirme el uso de su laboratorio para la realización de los experimentos con radiactividad.**

***Al personal del bioterio del INER:**

Calixto Vargas Schimpf, Graciela Bonilla y Jorge Becerril. En especial a David y Arturo por su amable ayuda en la obtención de los tejidos.

***Al Depto de Cirugía Experimental por compartir sus animales de experimentación**

***A los Doctores Mario H. Vargas Becerra y Raquel Trejo Albarrán por su amable interés y por las valiosas sugerencias aportadas durante la revisión del presente trabajo.**

A alguien muy especial que estará siempre en mi corazón y mente toda la vida. Gracias Señor por que sino hubiera sido por tú gran amor hacia mí simplemente no tendría lo que hoy tengo y no se hubieran hecho realidad muchos de mis sueños.

A Juan Carbajal Roldán.

Gracias papá por todas las oportunidades que me has dado para seguir adelante, yo sé que tú has hecho todo el esfuerzo para darnos una educación y te lo agradezco. Gracias por tu confianza hacia mí y todo el cariño y amor que me has dado.

A Virginia Salinas García.

A tí mamá por todo el cariño y amor que siempre me has dado y me has impulsado a salir adelante. Gracias.

A mis hermanos.

Juan Carlos, Guillermo, Luz María, y Jaime por estar siempre conmigo cuando más los necesito.

Armando y Bety

Por su paciencia, apoyo y estímulo a seguir con la maestría, por sus consejos y amor hacia mí

Los quiero mucho.

A mis sobrinos.

Ricardo, Vicky, Karen, Elizabeth, Juanito, Luz Elena, Joaquín, Edgar, Carlitos y Dennis.

A mis compañeros y amigos de trabajo.

Blanca, Edgar, Bettina, Patty, Elizabeth, y Jaime .

CONTENIDO

Abreviaturas	8
Resumen	10
I. Introducción	11
* Mecanismo de contracción del músculo liso de las vías aéreas	11
* Metabolismo de fosfoinosítidos en el músculo liso de las vías aéreas	14
* Participación de la proteína cinasa C en el músculo liso de las vías aéreas	16
II. Planteamiento del problema.....	18
III. Objetivos.....	19
IV. Métodos.....	20
* Soluciones.....	20
* Tejidos	21
* Incubación de los tejidos con mio-inositol tritiado.....	22
* Cromatografía de intercambio iónico	22
* Acumulación de fosfatos de inositol	23
* Experimentos en cámaras de órganos aislados.....	23
* Fármacos.....	25
* Análisis estadístico	25
V. Resultados	26
* Influencia de la glucosa en la formación de fosfatos de inositol inducida por carbacon en las preparaciones de músculo liso de las vías aéreas y bronquiales.....	26
* Efecto de histamina o carbacol sobre la acumulación de fosfatos de inositol en solución de Krebs Ringer con o sin Ca^{2+}	27
* Efecto de los ésteres de forbol sobre la acumulación de fosfatos de inositol inducida por carbacol	28
* Efecto de la calfofostina C sobre la acción del 12,13-dibutirato de 4 β forbol en la preparación de músculo liso de las vías aéreas	28
* Efecto de 12-miristato 13 acetato de 4 β forbol y 12, 13 dibutirato de 4 β forbol sobre la contracción inducida por carbacol en las preparaciones de músculo liso de las vías aéreas y bronquiales.	29
VI. Discusión.....	30
VII. Conclusiones	35
VIII. Figuras	36
IX. Referencias	46

ABREVIATURAS

ATP	trifosfato de adenosina
ATPasa	enzima adenosintrifosfatasa
Ca ²⁺	calcio
[Ca ²⁺] _i	concentración de calcio intracelular
CDP	citidina difosfocolina
CE ₅₀	concentración efectiva 50 %
CICR	calcio induce la liberación de calcio
CMPPA	monofosforilfosfatidato de citidina
CPA	ácido ciclopiazónico
CTP	citidina trifosfato
Da	dalton
DG	1,2 diacilglicerol
EGTA	N,N,N,N-tetrácetico (etilen glicol-bis (β-aminoetil éter))
g	gravedad
GBq	gigabecquerelios (unidad de medida de radiactividad)
Gq	Proteína G insensible a toxina pertussis
H ₁	receptor histamínico subtipo I
[H ³]	tritio
IP ₁	4- fosfato de inositol
IP ₁ *	1- fosfato de inositol
IP ₁ **	3- fosfato de inositol
IP ₂	1,4 bifosfato de inositol
IP ₂ *	3,4 bifosfato de inositol
IP ₂ **	1,3 bifosfato de inositol
IP ₃	1,4,5 trifosfato de inositol
IP ₃ *	1,3,4 trifosfato de inositol
IP ₄	1,3,4,5 tetrafosfato de inositol
IP ₄ *	1,3,4,6 tetrafosfato de inositol

IPs	fosfatos de inositol
[H ³]IPs	fosfatos de inositol tritiados
KDa	kilodaltones
KR	Krebs Ringer
KR+Ca ²⁺	Krebs Ringer con calcio
KR-Ca ²⁺	Krebs Ringer sin calcio
KH+Ca ²⁺	Krebs con calcio, Hepes y glucosa
KH-Ca ²⁺	Krebs sin calcio, Hepes y glucosa
Li ⁺	litio
M ₃	receptor muscarínico subtipo 3
mCi	mili Curie (unidad de medida de radiactividad)
MLC ₂₀	cadena ligera reguladora de miosina de 20 KDa
MLCK	cinasa de la cadena ligera de miosina
MLVA	músculo liso de las vías aéreas
PA	ácido fosfatídico
PB	preparación bronquial
PC	fosfatidil colina
PDB	12,13 dibutirato de 4β forbol
PI	fosfatidil inositol
[H ³]PI	fosfatidil inositol tritiado
PIP	4- fosfato de fosfatidil inositol
PIP ₂	4,5 bifosfato de fosfatidil inositol
PKC	protein cinasa C
PLC	fosfolipasa C
PLCβ	fosfolipasa C isoforma β
PLD	fosfolipasa D
PMA	13 acetato 12-miristato de 4β forbol
RS	retículo sarcoplásmico

RESUMEN

La contracción del músculo liso de las vías aéreas (MLVA) inducida por agonistas colinérgicos, como el carbacol y la acetilcolina se inicia por un incremento de la concentración de calcio (Ca^{2+}) citosólico. Este aumento se origina mediante la entrada Ca^{2+} extracelular a través de canales operados por receptor, entrada de Ca^{2+} extracelular por canales dependientes de voltaje (tipo L), liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares como el retículo sarcoplásmico (RS) por la vía 1,4,5 trifosfato de inositol (IP_3) y probablemente de las caveolas membranales. En un medio libre de Ca^{2+} , la estimulación de las preparaciones bronquiales con carbacol produce una contracción sostenida, mientras que, en las mismas condiciones, la contracción que se observa en el músculo liso traqueal es transitoria. Se ha sugerido que la fuente de Ca^{2+} para la contracción bronquial sostenida proviene del Ca^{2+} liberado del RS el cual es reutilizado. En vista de que los fosfoinosítidos participan directamente como mensajeros involucrados en la liberación de Ca^{2+} del RS, el propósito de este estudio fue analizar la participación del IP_3 en la contracción sostenida observada en un medio sin Ca^{2+} . Se utilizaron preparaciones de MLVA y bronquiales (1ª y 3ª generación) y se determinaron los fosfatos de inositol (IPs) mediante cromatografía de intercambio iónico. La acumulación de IPs inducida por carbacol o histamina se midió por medio de curvas concentración-respuesta a estos agonistas en el rango de 10 nM - 1 nM y 10 nM - 100 μM , respectivamente. Adicionalmente, se estudió el efecto de la incubación de 12-miristato 13-acetato de 4 β forbol (PMA) y 12, 13-dibutirato de 4 β forbol (PDB), durante 1h a 37°C sobre la acumulación de IPs inducida por carbacol. En otra serie de experimentos se estudió el efecto de la calfofina C (1 μM , durante 1h) sobre la acción del PDB en la acumulación de IPs inducida por carbacol en el MLVA. También se determinó el efecto de PMA y PDB (1 μM) sobre la contracción inducida por carbacol en las preparaciones de MLVA y bronquiales. En este trabajo, encontramos que en ambas preparaciones la acumulación de IPs inducida por histamina fue significativamente menor que la producida por carbacol, lo que sugiere que la contracción inducida por histamina depende principalmente, de la entrada de Ca^{2+} extracelular más que de la formación de IP_3 y liberación de Ca^{2+} del RS. El carbacol indujo un incremento de IPs, dependiente de la concentración, en una solución con o sin Ca^{2+} . Por otro lado, el PMA produjo una ligera inhibición que no fue estadísticamente significativa, en la acumulación de IPs inducida por carbacol en las preparaciones de MLVA y bronquiales. Además, no modificó la contracción inducida por carbacol en estas preparaciones en ninguna de las soluciones empleadas. El PDB inhibió significativamente la formación de IPs, y la respuesta de contracción sostenida en un medio sin Ca^{2+} la abatió casi completamente en ambos tejidos. La calfofina C no revirtió el efecto inhibitorio inducido por PDB en la acumulación de IPs en el MLVA. Estos hallazgos sugieren que durante la contracción bronquial sostenida en un medio sin Ca^{2+} la formación de IP_3 juega un papel importante y que la inhibición de los IPs producida por el PDB es a través de un mecanismo independiente de la PKC

I. INTRODUCCION

El músculo liso de las vías aéreas (MLVA), es uno de los tejidos del aparato respiratorio que juega un papel importante para mantener un diámetro adecuado de las vías aéreas para permitir el paso del aire hacia los alvéolos. Cuando la homeóstasis de este tejido es alterada se puede presentar el fenómeno de hiperreactividad de las vías aéreas; que consiste en un aumento en la sensibilidad del músculo liso ante estímulos físicos o químicos (Hargreave y col., 1986). Esta situación hace que las vías aéreas respondan en forma exagerada ante ciertos estímulos físicos (aire frío, inhalación de soluciones hipotónicas) o químicos (metacolina, histamina) produciendo una disminución en su calibre y dificultando el paso del aire. Este fenómeno, que es reversible, es un rasgo característico del asma bronquial. Por lo tanto, resulta de vital importancia conocer con mayor precisión los mecanismos fisiológicos por los cuales el músculo liso se contrae y se relaja para poder entender mejor el fenómeno de hiperreactividad de las vías aéreas.

Mecanismo de contracción en el MLVA

Para que la contracción del MLVA tenga lugar es necesario un incremento de la concentración de calcio (Ca^{2+}) citosólico. Este aumento se origina por tres mecanismos (Baron y col., 1989; Coburn, 1979; Daniel y col., 1991; Hashimoto y col., 1985; Marmy y col., 1993; Fujimoto, 1993; Montaña y col., 1996; Janssen, 1997):

- 1) Entrada de Ca^{2+} extracelular a través de los canales operados por receptor.
- 2) Entrada de Ca^{2+} extracelular por canales dependientes de voltaje (tipo L).
- 3) La liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares como el retículo sarcoplásmico (RS) por la vía de 1,4,5 trifosfato de inositol (IP_3) y probablemente de las caveolas membranales.

En este tipo de tejido, se ha observado también la presencia de canales sensibles a Ca^{2+} en la membrana del RS. Estos canales se identifican con las siglas CICR que significa Ca^{2+} induce la liberación de Ca^{2+} y son activados por niveles micromolares de Ca^{2+} , rianodina, nucleótidos de adenina y cafeína (Endo e Iino, 1993), pero aún no se ha determinado todavía su participación en la contracción.

Como consecuencia del incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} , se genera una cascada de eventos que culmina en la contracción muscular por activación de los mecanismos que llevan a producir el deslizamiento de las proteínas contráctiles.

En el MLVA, la estimulación de los receptores muscarínicos M_3 (Al-Hassani y col., 1993) e histaminérgicos H_1 (Douglas y Brink, 1989; Hall y Hill, 1988; Kotlikoff y col., 1987), por sus respectivos agonistas, activa a la fosfolipasa C β ($\text{PLC}\beta$, Yoshida e Imai, 1997), a través de una proteína G (Gq) insensible a toxina pertussis (Challis y col., 1993; Neer, 1995) con la subsecuente hidrólisis del 4,5 bifosfato de fosfatidil inositol (PIP_2) y la consecutiva generación de dos segundos mensajeros, IP_3 y el 1,2 diacilglicerol (DG). El IP_3 se une a sus receptores específicos de la membrana del RS induciendo la liberación de Ca^{2+} al citosol (Somlyo y col., 1985), y el DG activa a la proteína cinasa C (PKC). Esta última parece estar involucrada en fosforilar la cadena ligera de miosina y favorecer la contracción del músculo liso (Kamm y col., 1989).

En el músculo liso se han descrito dos mecanismos de acoplamiento excitación/contracción, uno farmacomecánico y otro electromecánico: El primero opera a través de varias señales de transducción celular, mediadas por la activación de receptores de membrana, que pueden cambiar los niveles de contracción sin una modificación necesaria en el potencial de membrana. Los mecanismos producidos por el acoplamiento farmacomecánico son la liberación de Ca^{2+} del RS por el IP_3 generado por la cascada de fosfoinositol y la fosforilación de la MLC_{20} (Horowitz y col., 1996; Somlyo y Somlyo, 1994) y son los responsables de iniciar la contracción.

El acoplamiento electromecánico opera a través de cambios en el potencial de membrana plasmática (depolarización) generados por la apertura de canales catiónicos operados por receptor. Esta depolarización produce la apertura de canales de Ca^{2+} tipo L, que son sensibles al voltaje, siendo una de sus funciones la de abastecer de Ca^{2+} al retículo sarcoplásmico (Bourreau y col., 1991; Montaña y col., 1996).

La respuesta de contracción inducida por carbacol (un agonista colinérgico) está compuesta de dos fases, la fásica y la tónica. El componente fásico es la respuesta de contracción inicial que se caracteriza por un incremento de Ca^{2+} citoplásmico hasta por más de 10 veces (de 100 nM a 800-1000 nM) y constituye el principal mecanismo que inicia la contracción (Rodger, 1985; Kajita y Yamaguchi, 1993). El Ca^{2+} se une a la calmodulina, y la asociación del complejo Ca^{2+} -calmodulina con la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) activa a esta enzima para fosforilar a la serina en la posición 19 sobre la cadena ligera reguladora de miosina (MLC_{20} , 20.000 Da). Esta fosforilación permite a la ATPasa de miosina ser activada por la actina y, en consecuencia, el músculo se contrae (Somlyo y Somlyo, 1994).

En la contracción del músculo liso existe una correlación muy estrecha entre el inicio de la contracción y las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Sin embargo, durante la contracción sostenida, esta correlación no existe, es decir, existe una independencia entre la contracción del tejido y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En este sentido, se ha observado que durante esta fase tónica existe una disminución tanto de la fosforilación de la cadena ligera de miosina como un rápido regreso de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cercano a niveles basales sin que se produzca una pérdida de la tensión (Aksoy y col., 1982; Park y Rasmussen, 1986).

La adición de carbacol a la preparación de músculo liso traqueal de perro en un medio libre de Ca^{2+} induce una contracción rápida y transitoria, mientras que, en la preparación de bronquio, induce una contracción sostenida. Esta diferencia en la

respuesta de contracción ha sido atribuida a la presencia de cartílago en el tejido bronquial.

En 1983 Foster y colaboradores postularon que el cartílago de las vías aéreas podría actuar como un reservorio de Ca^{2+} y proveer de este ion al tejido para la contracción inducida por un agonista en un medio sin Ca^{2+} . Sin embargo, Montañó y colaboradores (1996) demostraron que el cartílago no es la fuente principal de Ca^{2+} ya que, al incubar el tejido bronquial con ácido ciclopiazónico (CPA, bloqueador de la ATPasa del RS), anularon totalmente la contracción bronquial sostenida inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} . Actualmente se ha propuesto que para mantener la contracción sostenida es posible que el Ca^{2+} se recicle a través de los canales tipo L de un compartimento localizado fuera de la membrana plasmática (caveolas) hacia el RS, y que este fenómeno depende de la toma funcional de Ca^{2+} en el RS (Montañó y col., 1996).

Metabolismo de fosfoinosítidos en el MLVA

La interacción de agonistas (bradicinina, histamina, carbacol, etc.) con su receptor provoca el rompimiento fosfodiéster del PIP_2 por la PLC, dando lugar al IP_3 y DG (Berridge, 1988). El IP_3 es desfosforilado por la 5-fosfatasa a (1,4) bifosfato de inositol (IP_2), el cual a su vez, se cree que es desfosforilado casi exclusivamente a (4) fosfato de inositol (IP_1) por la (1,3,4) trifosfato de inositol/(1,4) bifosfato de inositol-1-fosfatasa. Por otro lado, en algunos tejidos existe la 3-cinasa que transfiere un fosfato de ATP a la posición 3 del IP_3 para formar (1,3,4,5) tetrafosfato de inositol (IP_4). Asimismo, esta molécula puede ser desfosforilada por la misma 5-fosfatasa que degrada IP_3 para formar un inositol trifosfato isomérico (1,3,4) trifosfato de inositol (IP_3^*). Este isómero es desfosforilado por la (1,3,4)trifosfato de inositol/(1,4)bifosfato de inositol-1-fosfatasa a (3,4)bifosfato de inositol (IP_2^*) y (1,3)bifosfato de inositol (IP_2^{**}). Estos bifosfatos, a su vez, son desfosforilados a una mezcla de estereoisómeros (1)fosfato de inositol (IP^*) y (3)fosfato de inositol

(IP^{**}). Estos fosfatos de inositol son desfosforilados a inositol por la IP fosfatasa para ser incorporados al fosfatidilinositol (PIP) de la membrana celular a través de la enzima CDP-diacilglicerol-inositol 3-fosfatidiltransferasa.

La complejidad de la vía metabólica del IP₃ sugiere que, además de la acción de movilización de Ca²⁺, otras funciones biológicas pueden ser reguladas por uno o más de estos metabolitos (Berridge, 1985, 1988; Hughes y col., 1990; Ragan, 1990) (Fig. A).

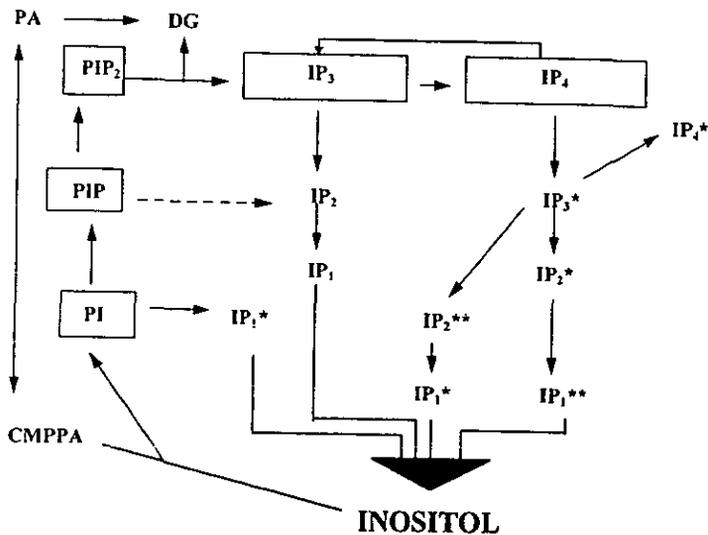


Fig. A. Metabolismo de fosfoinosítidos. La activación del receptor de membrana activa a la PLC, la cual rompe al 1,4 bifosfato de fosfatidil inositol (PIP₂) en dos segundos mensajeros 1,2 diacilglicerol (DG) e IP₃. Los dos están directamente relacionados a través de una secuencia de reacciones químicas para posteriormente formar fosfatidil inositol (PI) y PIP₂. Los ciclos requieren de la presencia continua de ATP y citidina trifosfato (CTP), los cuales son las fuentes de los grupos fosfatos. Algunos metabolitos son además citidina monofosforilfosfatidato (CMPPA), ácido fosfatídico (PA).

Participación de la proteína cinasa C en el MLVA

La PKC toma parte en la regulación de varias respuestas celulares como crecimiento, diferenciación, metabolismo, secreción y contracción (Nishizuka, 1992). En general, la PKC traduce señales extracelulares (ej. hormonas, neurotransmisores y algunos factores de crecimiento) por fosforilación de proteínas celulares sobre residuos específicos de treonina y serina, para producir una respuesta fisiológica. La enzima se activa cuando aumenta la concentración de DG (activador fisiológico de la PKC) y por concentraciones micromolares de Ca^{2+} en presencia de fosfolípidos ácidos, particularmente fosfatidil serina (Takai y col., 1979). El DG es generado por la hidrólisis de PIP_2 inducida por el agonista en la membrana plasmática a través de la activación de la PLC específica de fosfoinosítidos (Berridge, 1984) y además por la hidrólisis de fosfatidil colina (PC) a través de la fosfolipasa D (PLD).

Existen numerosas isoformas de PKC con diferentes características bioquímicas y substratos (Hug y Sarre, 1993; Nelsestuen, 1991). Las isoformas de PKC varían tanto en su distribución en los tejidos como en su función y han sido clasificadas principalmente en tres grupos (Nishizuka, 1992):

- 1) Grupo A: isoenzimas dependientes de Ca^{2+} convencional (cPKC- α , β I, β II, y γ)
- 2) Grupo B: isoenzimas independientes de Ca^{2+} (nPKC- δ , ϵ , η , y θ)
- 3) Grupo C: isoenzimas atípicas (aPKC- ζ , μ , ι , λ).

Las isoenzimas expresadas en el MLVA de perro son PKC- β I, β II, δ , ϵ , θ y ζ lo cual sugiere un papel multifuncional de la PKC en el MLVA de perro (Donnelly y col., 1995).

Se considera que la PKC está involucrada en la fase sostenida de la contracción del músculo liso ya que los ésteres de forbol, activadores de la PKC, causan contracción sostenida de una variedad de músculos lisos vasculares y en el traqueobronquial.

Sin embargo, también se ha propuesto que la activación de la PKC, por los

ésteres de forbol (12,13-dibutirato de 4 β forbol [PDB], 12-miristato 13-acetato de 4 β forbol [PMA], etc), pueden inhibir a la PLC (Griendling y col., 1991), y evitar la liberación de Ca²⁺ de los almacenes intracelulares por la disminución de la biosíntesis de IP₃, lo que hace a estos compuestos una buena herramienta farmacológica para estudiar los mecanismos intracelulares de liberación de Ca²⁺.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante la contracción de las preparaciones del MLVA inducida por acetilcolina se produce IP_3 el cual, al unirse al receptor específico en el retículo sarcoplásmico, libera el Ca^{2+} necesario para iniciar la contracción del tejido. En un medio libre de Ca^{2+} , la estimulación de las preparaciones de MLVA con carbacol produce una contracción transitoria, mientras que, en las mismas condiciones, la contracción que se observa en las preparaciones bronquiales es sostenida. En este sentido también se ha demostrado que la fuente de Ca^{2+} para esta contracción bronquial sostenida, proviene de las reservas intracelulares, y se ha sugerido que dicho Ca^{2+} es recapturado en estos almacenes intracelulares. En vista de que los fosfoinosítidos participan directamente en el señalamiento transmembranal y en la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares, el propósito de este estudio fue analizar si el IP_3 participa en la contracción sostenida observada en un medio sin Ca^{2+} .

HIPOTESIS

¿El IP_3 juega un papel primordial en el desarrollo de la contracción sostenida en un medio sin Ca^{2+} ?

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la contracción sostenida del músculo liso traqueal y bronquial de las vías aéreas inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} es dependiente del trifosfato de inositol.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Investigar si durante la contracción bronquial sostenida inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} se generó trifosfato de inositol en las siguientes preparaciones:
 - a) Preparación bronquial (PB) constituida por bronquio con músculo liso y cartilago, sin epitelio.
 - b) Preparación muscular (MLVA, solamente músculo liso traqueal)
 - c) Preparación de cartilago (solamente cartilago)
2. Explorar si en la contracción inducida por histamina en un medio sin Ca^{2+} se generó trifosfato de inositol en las mismas preparaciones del apartado anterior.
3. Estudiar si los ésteres de forbol (PMA y PDB) bloquean la formación del trifosfato de inositol.
4. Determinar la participación de la PKC en la formación de IP_3 , utilizando un inhibidor específico de esta proteína (calfofistina C).

IV. MÉTODOS

Se ha observado en células de músculo liso arterial que la utilización de una alta concentración de glucosa en la solución fisiológica empleada permite la acumulación de sorbitol dentro de las células de músculo liso. Esta acumulación esta asociada con la depleción de mio-inositol dando como resultado la supresión del metabolismo de los fosfoinosítidos (Sakakibara y col., 1993). Por lo tanto, se utilizaron diferentes soluciones fisiológicas para determinar su efecto sobre la acumulación de fosfatos de inositol (IPs) en las preparaciones de MLVA y bronquiales.

SOLUCIONES

La composición de las soluciones usadas fue la siguiente:

1) **Krebs Ringer con Ca^{2+} (KR+ Ca^{2+})**, [mM]: NaCl 115, NaHCO_3 22, KCl 4.6, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.16, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.16, CaCl_2 2.5, glucosa 11, indometacina 10 μM (utilizada para suprimir la producción de prostanglandinas). *Esta solución solo se utilizó para disecar el tejido.*

2) **Krebs con Ca^{2+} , HEPES y glucosa (KH+ Ca^{2+})**, (mM): NaCl 115, HEPES 25, KCl 4.6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.16, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5, glucosa 11.

3) **Krebs sin Ca^{2+} , HEPES y glucosa (KH- Ca^{2+})**: con la misma composición que la anterior sin incluir CaCl_2 y añadiendo EGTA 0.1 mM.

4) **KR+ Ca^{2+} y sin glucosa**. (mM): NaCl 115, NaHCO_3 22, KCl 4.6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.16, CaCl_2 2.5, indometacina 10 μM .

5) **KR- Ca^{2+} y sin glucosa**, añadiendo EGTA 0.1 mM.

Las soluciones se burbujearon con una mezcla de O_2/CO_2 , 95-5 % respectivamente, y se mantuvieron a pH 7.4.

TEJIDOS

Se utilizaron perros criollos adultos (18-25 kg) de sexo indistinto, donados por el Centro de Control Canino de Azcapotzalco. Estos animales se mantuvieron en cuarentena en el bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Los perros se sacrificaron por una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg de peso, Anestesia).

Preparación Bronquial

La preparación bronquial se obtuvo del bronquio 1^a generación. Se realizó un corte en el espacio intercostal derecho, entre la cuarta y quinta costillas, retirando el corazón y cortando la aorta y la vena cava para separar el árbol bronquial. El bronquio de primera generación se colocó inmediatamente en solución KR+Ca²⁺. Se retiraron el parénquima pulmonar, el epitelio y el tejido conectivo obteniendo una preparación solamente con músculo liso y cartilago. Usando un microscopio estereoscópico, se cortaron tiras de aproximadamente 2 mm de ancho x 5 mm de largo, y de 100 a 120 mg de peso.

Preparación de músculo liso

La preparación muscular se obtuvo del músculo liso de la tráquea. Se realizó un corte en la porción ventral del cuello por la línea media para disecar la tráquea que inmediatamente se colocó en solución KR+Ca²⁺. Se cortó longitudinalmente a través de los anillos de cartilago traqueal para disecar el MLVA hasta dejarlo prácticamente sin epitelio ni cartilago. Se obtuvieron tiras de aproximadamente 2 mm de ancho x 5 mm de largo, y de 100 a 150 mg de peso.

Preparación cartilaginosa

La preparación de cartilago se obtuvo de los anillos de cartilago traqueales disecándolos perfectamente; se obtuvieron muestras de 100 a 120 mg.

INCUBACIÓN DE LOS TEJIDOS CON MIO-INOSITOL [H³]

La incubación de los tejidos antes mencionados con mio-inositol [H³] se realizó con las soluciones fisiológicas descritas anteriormente:

Después de dos lavados con la solución de Krebs respectiva, se colocó cada uno de los tejidos en 10 mL de solución de Krebs y se les agregaron 150 µl de mio-inositol [H³] (Inositol-myo-[2-³H(N)]- 5mCi, actividad específica 777 GBq/mmol, DuPont). Se incubaron en un baño metabólico GCA (Precision Scientific) a 37°C durante 4 h, con burbujeo y agitación constantes.

Posteriormente se eliminó el exceso de marca radiactiva de los tejidos lavándolos dos veces con una solución de KR-Ca²⁺. Cada tejido se colocó en tubos de plástico (13 ml, 95x16 mm; Sarstedt) y se les añadió 1ml de cualquiera de las soluciones antes mencionadas con o sin Ca²⁺ + LiCl (10mM); el propósito de añadir Li⁺ en las preparaciones es la de inhibir a la enzima monofosfatasa para permitir la acumulación de IPs (Ragan, 1990) . Todos los tubos se incubaron por 10 min a 37°C con burbujeo y agitación constantes. Los tejidos una vez marcados, se estimularon con carbacol durante 30 min. A cada tubo se le añadieron 200 µl de ácido perclórico al 30% para detener la reacción . Posteriormente todas las muestras se sonicaron y congelaron durante 24 h a -7°C.

CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

La cromatografía de intercambio iónico fue realizado como lo propusieron Berridge y colaboradores (1983) de la siguiente manera: todas las muestras se descongelaron y se centrifugaron a 3000 g durante 15 min. Los sobrenadantes se decantaron a otros tubos y se neutralizaron con 755 µl de KOH (1.5 M) + Hepes 75 mM) a pH de 7.0-7.5, y se aplicaron a una columna de cromatografía de intercambio iónico (AG1-X8, malla 100-200, Bio -Rad). La resina de intercambio iónico (AG1-X8, tipo formato) se lavó previamente 2 veces con 10 mL de agua destilada y 10 mL de formato de amonio 60 mM + tetraborato de sodio 5 mM para eliminar el mio-

inositol[H^3] libre y el glicerofosfoinositol, respectivamente. Las fracciones de los fosfatos de inositol se recuperaron en viales de líquido de centelleo de la siguiente manera: se realizaron 2 eluciones de 4 mL de borato de sodio 5mM + formato de sodio 180 mM para recuperar el IP_1 , 2 eluciones de 3 mL de ácido fórmico 0.1M + formato de amonio 0.4 M para recuperar el IP_2 , y una elución de 4 mL de ácido fórmico 0.1M + formato de amonio 1M para recuperar el IP_3 . A cada vial se le añadieron 4 mL de líquido de centelleo y se agitaron vigorosamente. Finalmente se determinó la cantidad de [H^3]IPs empleando un contador de centelleo líquido (Beckman LS 6000SE).

ACUMULACIÓN DE FOSFATOS DE INOSITOL (IPs).

La acumulación de IP_s inducida por carbacol o histamina se estudió por medio de la realización de curvas concentración-respuesta a estos agonistas (10 nM - 1 mM y 10 nM - 100 μ M, respectivamente). Se utilizó histamina con el propósito de corroborar la técnica con un agonista que no utiliza la vía del IP_3 . Para cada concentración los tejidos se estimularon durante 30 min con su respectivo agonista. Adicionalmente, se estudió el efecto de la incubación de PMA y PDB (1 nM - 1 μ M) durante 1h a 37°C sobre la acumulación de IPs inducida por carbacol. En otra serie de experimentos se estudió el efecto de la calfofostina C (1 μ M, durante 1h) sobre la acción del PDB en el MLVA.

Por ser la calfofostina C extremadamente fotosensible, los experimentos se realizaron en la obscuridad. En experimentos previamente realizados se comprobó que la calfofostina C no estaba inactiva.

EXPERIMENTOS EN CÁMARAS DE ÓRGANOS AISLADOS.

Para estos experimentos se utilizaron las siguientes soluciones:

- 1) KR+Ca²⁺
- 2) KR-Ca²⁺

En estos experimentos se utilizaron preparaciones de MLVA (este tejido fue disecado como se describió anteriormente) y bronquiales (se disecaron anillos bronquiales de 3ª generación del lóbulo pulmonar superior izquierdo de perro sin quitar estructuras adyacentes al MLVA como cartílago y epitelio).

Las preparaciones bronquiales y de MLVA se colocaron en cámaras de órganos aislados que contenían 5 mL de KR+Ca²⁺, pH 7.4, a 37°C, burbujeado con una mezcla O₂-CO₂ (95-5%). La tensión isométrica se registró en un dinógrafo Beckman R 612 (Beckman Instruments, USA) a través de un transductor Gould Statham UC3. Las preparaciones se estabilizaron en reposo durante 30 min a una tensión 1.0 - 1.5 g antes de iniciar los experimentos. Durante ese tiempo la solución KR+Ca²⁺ se cambió una sola vez.

Los tejidos se estimularon tres veces con KCl (60 mM) en KR+Ca²⁺. Cada respuesta de contracción a KCl se mantuvo durante 20 min antes de lavar el tejido, con el propósito de estabilizar la respuesta. Las respuestas de contracción se expresan como porcentaje de respuesta al tercer estímulo de KCl (60 mM).

Contracción inducida por carbacol en KR-Ca²⁺ en el MLVA y PB.

La sensibilidad de los almacenes intracelulares al carbacol fue evaluada indirectamente estimulando con la concentración efectiva 50% de carbacol (CE₅₀ = 0.42 µM) durante 20 min en KR-Ca²⁺ en las preparaciones de MLVA y bronquiales. En estas condiciones, la contracción máxima inducida por carbacol representó en forma indirecta, la cantidad total de Ca²⁺ intracelular disponible (Bourreau y col., 1991; Marthan y col., 1987; Montaña y col., 1996).

Efecto de los ésteres de forbol PMA y PDB sobre la contracción inducida por carbacol

Para evaluar el papel de la PKC sobre la respuesta de contracción del MLVA y bronquio al carbacol, las preparaciones se incubaron durante 1h con PMA y PDB

(1 μ M) en KR+Ca²⁺ y KR-Ca²⁺.

FÁRMACOS

La mayoría de los fármacos se obtuvieron de Sigma Chem. (ST Louis, MO USA), excepto el ácido perclórico (69.72%), el KOH y el CaCl₂ (Baker Analyzed) y el mio-inositol [H³] (New England Nuclear Boston, MA, USA). El diclorhidrato de histamina y el cloruro de carbamil colina (carbacol) se disolvieron en agua desionizada. La indometacina y el EGTA se disolvieron en Na₂CO₃ al 1% y se añadieron a la solución KR (concentración final de Na₂CO₃ 0.001%). El PMA, el PDB y la calfofostina C (RBI, Natick, MA, USA) se disolvieron en N,N-dimetil formamida.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se evaluaron mediante análisis de varianza de una vía y prueba de Dunnett. En otras comparaciones se utilizó la prueba t de Student no pareada para una muestra. La reactividad a carbacol fue evaluada a través de la concentración efectiva 50% (CE₅₀). La CE₅₀ fue calculada, para cada curva, por regresión lineal de los valores transformados a -logaritmo de la concentración y la respuesta como probits. Los valores p<0.05 bimarginal se consideraron estadísticamente significativos. Los valores de "n" representan el número de perros en cada experimento. Los resultados que aparecen en el texto y las figuras corresponden al promedio \pm error estándar. Los resultados de IPs se expresaron en % con respecto a la basal.

V. RESULTADOS

INFLUENCIA DE LA GLUCOSA EN LA FORMACIÓN DE FOSFATOS DE INOSITOL INDUCIDA POR CARBACOL EN LAS PREPARACIONES DE MLVA Y BRONQUIALES

El incremento en la acumulación de IPs se presentó en función de la concentración del agonista (Fig. 1). En $\text{KH}+\text{Ca}^{2+}$, la concentración de carbacol con la que se obtuvo la respuesta máxima de la preparación de MLVA fue de $100\ \mu\text{M}$ ($n=6$, $304.62\pm 100.04\%$), mientras que en el $\text{KH}-\text{Ca}^{2+}$ se obtuvo con 1mM ($n=6$, $252.98\pm 86.09\%$). Para la preparación bronquial en $\text{KH}+\text{Ca}^{2+}$ la respuesta máxima se alcanzó con $10\ \mu\text{M}$ ($n=6$, $334\pm 131\%$) y con $\text{KH}-\text{Ca}^{2+}$ a $1\ \mu\text{M}$ de carbacol ($n=6$, $286.3\pm 118\%$).

La acumulación de IPs producidos por carbacol en las preparaciones de MLVA en $\text{KR}+\text{Ca}^{2+}$ y $\text{KH}+\text{Ca}^{2+}$ fue dependiente de la concentración. Sin embargo, como se observa en la Fig. 2 A la utilización de $\text{KR}+\text{Ca}^{2+}$ produjo un incremento en la acumulación de IPs con respecto a $\text{KH}+\text{Ca}^{2+}$. Este incremento fue altamente significativo ($p<0.01$, Fig. 2B) cuando se evaluó el % de la respuesta máxima en la acumulación de IPs inducida por carbacol en $\text{KR}+\text{Ca}^{2+}$ ($n=5$, 1.08 ± 0.147) y $\text{KH}+\text{Ca}^{2+}$ ($n=6$, 0.387 ± 0.09); no hubo diferencias significativas con respecto a la CE_{50} . Estos hallazgos sugirieron que la glucosa estaba interfiriendo en la producción de fosfatos de inositol por lo que para los siguientes experimentos solo se utilizó KR sin glucosa.

EFEECTO DE HISTAMINA O CARBACOL SOBRE LA ACUMULACIÓN DE FOSFATOS DE INOSITOL EN SOLUCIÓN DE KREBS RINGER con o sin Ca^{2+}

Efecto de histamina en las preparaciones de MLVA y bronquiales

En el MLVA, la histamina indujo un leve incremento de la acumulación de IPs dependiente de la concentración empleada del agonista (Fig. 3). La acumulación máxima de IPs inducida por este agonista se obtuvo con 10 μ M (n= 4, 77.81 \pm 24.97 %) en KR+Ca²⁺, mientras que con 100 μ M (n=4, 34.64 \pm 17.64 %) en KR-Ca²⁺. Por otro lado, en el bronquio se observó que la acumulación máxima de IPs inducida por 100 μ M de histamina en KR+Ca²⁺ fue 76.12 \pm 22.14% (n=4), y 15.02 \pm 29.58% (n=4) con 10 μ M de histamina en KR-Ca²⁺. Sin embargo, todos estos incrementos no fueron estadísticamente significativos cuando se compararon con su basal.

Efecto de carbacol en el MLVA y PB

En KR+Ca²⁺ y sin Ca²⁺ el incremento en la acumulación de IPs en la preparación de MLVA fue dependiente de la concentración de carbacol empleada (Fig. 4). La acumulación máxima de IPs inducida por carbacol en el KR+Ca²⁺ se observó con 1mM (n=5, 1103.96 \pm 154.48 %) y en KR-Ca²⁺ a 100 μ M (n=5, 786.13 \pm 160.80 %). Por otro lado, en el bronquio la acumulación de IPs también fue dependiente de la concentración del agonista (Fig 5). La acumulación máxima de los IPs se observó con 100 μ M en el KR+Ca²⁺ y fue de 353.73 \pm 50.35 % (n=7) y para KR-Ca²⁺ de 428.18 \pm 24.49 % (n=7). También observamos que la presencia o ausencia de Ca²⁺ en el medio no modificó el -Log CE₅₀; así como en la respuesta máxima de acumulación de IPs en ambos tejidos.

Efecto del carbacol en tejido cartilaginoso

La acumulación de IPs inducida por carbacol en el cartílago se mantuvo por abajo de su propia basal en todas las concentraciones sin ser significativamente

menor (n=3, Fig. 6).

EFFECTO DE LOS ÉSTERES DE FORBOL SOBRE LA ACUMULACIÓN DE FOSFATOS DE INOSITOL INDUCIDA POR CARBACOL

PMA

En las preparaciones de MLVA (n=8) y bronquiales (n=6) el PMA produjo un efecto inhibitorio mínimo en la acumulación de IPs inducida por carbacol (100 μM) sin que se observaran diferencias significativas (Fig. 7). En la preparación de MLVA el efecto máximo de inhibición del PMA sobre la formación de los IPs se observó con 0.1 μM , y en el KR+Ca²⁺ fue de 19.98 ± 14.42 %, y para KR-Ca²⁺ fue de 35.90 ± 21.23 %. En el caso del bronquio, PMA (1 μM) inhibió la formación de IPs un 30.94 ± 15.36 % en KR+Ca²⁺; pero en KR-Ca²⁺ PMA (0.1 μM) tuvo un efecto inhibitorio máximo de 24.02 ± 16.9 %.

PDB

El efecto máximo inhibitorio del PDB (0.1 μM) en la acumulación de IPs inducida por carbacol en la preparación de MLVA (n=11), fue de 63.46 ± 16 % y para el bronquio (n=7) de 38.75 ± 15.27 %, ambos en KR+Ca²⁺ (p<0.05). En KR-Ca²⁺ se observó que la máxima inhibición producida por PDB (0.1 μM) en el MLVA fue de 74.14 ± 12.38 % y para el bronquio (1 μM) de 46.64 ± 13.64 % (p< 0.05, Fig. 8).

EFFECTO DE LA CALFOSTINA C SOBRE LA ACCIÓN DEL PDB EN EL MLVA

El efecto inhibitorio inducido por PDB (1 μM , n=6) en la acumulación de IPs en las preparaciones de MLVA fue de 57.33 ± 4.4 %. Este efecto inhibitorio no fue modificado por la preincubación con de 1 μM de calfofostina C (n=6, Fig. 9).

EFEECTO DEL PMA Y PDB SOBRE LA CONTRACCIÓN INDUCIDA POR CARBACOL EN LAS PREPARACIONES DE MUSCULO LISO Y BRONQUIO

En KR+Ca²⁺ y sin Ca²⁺ la incubación de las preparaciones de MLVA y bronquiales (Fig. 10) con PMA (1μM, n=9) produjo una mínima inhibición en la contracción inducida por 0.42 μM de carbacol (20.64 ± 9.76 %, 12.98 ± 9.92 %, 24.95 ± 13.31 % y 23.63 ± 14.57 %, respectivamente). Este efecto del PMA no fue estadísticamente significativo comparado con sus respectivos controles. El PDB en un medio con Ca²⁺ inhibió significativamente (p<0.05) la contracción inducida por carbacol en ambas preparaciones (68.96 ± 7.87 % y 41.61 ± 7.27 %, respectivamente). En un medio sin Ca²⁺ el PDB anuló casi totalmente estas respuestas en las preparaciones de MLVA y bronquiales (97.95 ± 1.80 % y 97.16 ± 1.74%, p<0.01).

VI. DISCUSION

INFLUENCIA DE LA GLUCOSA SOBRE LA ACUMULACION DE IPs INDUCIDA POR CARBACOL

Greene y Lattimer (1984); y Greene y colaboradores (1987) observaron que las altas concentraciones de glucosa permite la acumulación de sorbitol dentro de las células de músculo liso, teniendo como consecuencia la depleción del mio-inositol y por lo tanto una disminución del metabolismo de los fosfoinosítidos. También Sakakibara y colaboradores (1993) al estudiar células de músculo liso de aorta de cobayo con diferentes concentraciones de glucosa (0-40 mM), encontraron que al incubarlas con 5mM de glucosa no había diferencias con respecto a la basal, pero cuando las incubaron con 30 mM de glucosa el contenido de sorbitol fue incrementado rápidamente (4.5 veces), y observaron una disminución gradual de los niveles de mio-inositol (55%) comparado con el control. En este trabajo encontramos que la utilización de glucosa en el medio produjo una disminución muy importante (61.44%) en la acumulación de IPs inducida por el carbacol en el MLVA. Estos datos corroboran que la presencia de glucosa (11mM) en el KR utilizado interfiere en el metabolismo de los fosfoinosítidos debido probablemente a una depleción del mio-inositol en estos tejidos. Por otro lado Hiroshi Yamaguchi en una comunicación personal sugiere que el Hepes disminuye la respuesta a la liberación de Ca^{2+} por lo que el recomienda no utilizar Hepes en estos experimentos ya que pudiera afectar la acumulación de IPs posiblemente mediante otro mecanismo independiente al de la glucosa.

LA HISTAMINA NO INDUCE LA FORMACION DE 1,4,5 IP₃ EN LAS PREPARACIONES DE MLVA Y BRONQUIALES

Algunos autores han observado que la histamina induce la formación de fosfatos de inositol en preparaciones de MLVA (bovino, cobayo y humano) por medio de la activación del receptor de histamina H₁(Hall y Hill, 1988; Daykin y col., 1993; Marmy y col., 1993, Jansen y Sims, 1993). Sin embargo, en los experimentos realizados en este trabajo en el MLVA y bronquiales de perro, la acumulación de IPs inducida por este agonista fue significativamente menor que la producida por carbacol. Además la formación de fosfoinosítidos en el KR+Ca²⁺ fue baja sin alcanzar diferencias significativas con respecto a la basal y en KR-Ca²⁺ la acumulación fue casi nula. Estos datos nos indican claramente que el mantenimiento de la contracción en las preparaciones de MLVA y bronquiales inducida por histamina depende más de la entrada de Ca²⁺ del medio extracelular a través de los canales tipo L y operados por el receptor que del metabolismo de los fosfatos de inositol (Kannan y col., 1987; Cuthbert y col., 1994; Bazán y col., 1998). Por lo tanto, este agonista parece no participar en la movilización de Ca²⁺ intracelular a través de la producción de IP₃.

EL 1,4,5, IP₃ PARTICIPA EN LA CONTRACCION BRONQUIAL SOSTENIDA INDUCIDA POR CARBACOL EN UN MEDIO SIN Ca²⁺

La procedencia del Ca²⁺ que utilizan diferentes agonistas que contraen el MLVA de perro, cobayo y conejo son variados e incluyen múltiples fuentes. Se ha observado que la respuesta de contracción producida por KCl, serotonina o histamina depende del Ca²⁺ extracelular, mientras que la contracción del MLVA

producida por un estímulo colinérgico utiliza una fuente adicional de Ca^{2+} , los almacenes intracelulares del RS. Esta fuente adicional de Ca^{2+} es accesible a los agonistas colinérgicos porque la interacción con su receptor induce la producción de IP_3 que, al actuar sobre sus receptores en el RS, libera el Ca^{2+} necesario para iniciar la contracción del tejido, mientras que la fase sostenida es mantenida por la entrada continua de este ión desde el espacio extracelular mediante canales de Ca^{2+} operados por receptor y tipo L (Baba y col., 1989; Kajita y Yamaguchi, 1993; Kannan y col., 1987; Sneyd y Kalachev, 1994). Por lo tanto, el metabolismo de fosfoinosítidos juega un papel importante en el acoplamiento farmacomecánico de la contracción del músculo liso mediado por receptores muscarínicos (Baron y col., 1984). En este sentido se ha demostrado que el carbacol estimula un rápido incremento en los fosfatos de inositol y DG en el músculo liso traqueal de bovino y canino (Baron y col., 1984; Hashimoto y col., 1985; Duncan y col., 1987; Grandordy y col., 1986; Takuwa y col., 1986). Nosotros encontramos que el carbacol induce un incremento, dependiente de la concentración, en los niveles de IPs en el MLVA y bronquio de perro en una solución con o sin Ca^{2+} . En este sentido, cabe resaltar que en las preparaciones bronquiales la acumulación de IPs inducida por carbacol es menor que en el MLVA. Esta diferencia se podría explicar por la poca cantidad de músculo liso presente en el tejido bronquial, otra alternativa pudiera ser que la densidad de los receptores muscarínicos sea diferente en ambas preparaciones.

Se ha sugerido que en ausencia de Ca^{2+} extracelular existe una disminución en la actividad de la PLC ya que esta enzima es muy sensible a cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Best, 1986). Esta situación traería como consecuencia una disminución en la acumulación de IPs inducida por un agonista. Sin embargo, la acumulación de IPs inducida por carbacol en el MLVA y bronquio no fue diferente en presencia o ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular, lo cual nos sugiere, por lo menos para el carbacol, que el metabolismo de fosfoinosítidos no depende de la presencia extracelular de este ión durante este período de experimentación.

Se ha observado que la estimulación del MLVA con carbacol en un medio sin Ca^{2+} induce una respuesta de contracción transitoria (Bourreau y col., 1991, Montaña y col., 1993) mientras que en preparaciones bronquiales produce una contracción sostenida (Foster y col., 1983; Reaburn y Rodger, 1984; Montaña y col., 1996). En este sentido, Montaña y colaboradores (1996) encontraron que para el mantenimiento de la contracción bronquial sostenida se requiere que el Ca^{2+} liberado del RS sea reutilizado y no eliminado hacia el espacio extracelular como ocurre en el MLVA. Algunos investigadores han propuesto que durante la fase de contracción sostenida, la activación de la PKC juega un papel importante (Park y Rassmusen, 1986), sin embargo, en un trabajo reciente, Bazán y colaboradores (1998) encontraron que esta enzima no participa durante la contracción bronquial sostenida inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} .

En este trabajo encontramos, que las preparaciones bronquiales en un medio sin Ca^{2+} , el carbacol induce la biosíntesis de IPs así como una contracción sostenida. Es muy probable que el incremento en el IP_3 libere el Ca^{2+} del RS y sea responsable de iniciar la contracción y que para esta respuesta sea sostenida se requiere que este ión sea reciclado por el RS como lo ha sugerido Montaña y colaboradores (1996).

INHIBICION DE 1,4,5 IP_3 POR LOS ESTERES DE FORBOL

La liberación de calcio de los almacenes intracelulares es controlado por el metabolismo de fosfolípidos con la subsecuente formación de IP_3 . Se sabe que el DG es otro producto del metabolismo de fosfoinosítidos y que puede activar a la PKC. Esta enzima ha sido involucrada en inhibir la liberación de Ca^{2+} interfiriendo en diferentes sitios en la cascada de eventos que llevan a su liberación del RS. Se ha propuesto que la PKC fosforila la PLC β (Griendling y col., 1991; Ryu y col., 1990) evitando la hidrólisis del 1,4-bifosfato de fosfadil inositol (PIP_2), así como fosforilar

el receptor a IP_3 del RS (Ferris y col., 1991). Ambos fenómenos llevarían a una inhibición en la liberación del Ca^{2+} intracelular inducida por un agonista. Asimismo, también se ha postulado que la activación de la PKC por los ésteres de forbol pueden atenuar la elevación de IP_3 por un incremento de su degradación a través de la activación de una fosfomonoesterasa específica para IP_3 (Connolly y col., 1986; Lapetina y col., 1986).

Se ha descrito que el PMA y PDB son activadores específicos de la PKC (Ashendel, 1985). Sin embargo, nuestros resultados con PMA y PDB sugieren que éste último parece inducir otros efectos diferentes a la activación de la PKC. El PMA no indujo una inhibición significativa en la acumulación de IPs, además de que tampoco inhibió la contracción inducida por carbacol tanto en el MLVA como en el bronquio, en ninguna de las soluciones empleadas. Por otro lado, PDB inhibió significativamente la producción de IPs en ambos tejidos. Esta inhibición se ve reflejada por el abatimiento de la contracción inducida por carbacol tanto en $KR+Ca^{2+}$ (68.96% y 41.61%) como en $KR-Ca^{2+}$ (97.95% y 97.16 %). Asimismo, los resultados obtenidos con calfofostina C (inhibidor específico de PKC) demuestran que el efecto del PDB no está mediado por la activación de la PKC, ya que la calfofostina C no revirtió la inhibición inducida por PDB en la acumulación de IPs en el MLVA. Estos hallazgos sugieren que la inhibición de los IPs producida por el PDB es a través de un mecanismo independiente de la PKC. En este sentido, se ha postulado en hepatocitos de rata que el PMA fosforila al receptor adrenérgico α_1 , inhibiendo la ureogénesis inducida por la (-)-epinefrina (Corvera y col., 1986). Una posible explicación al efecto inhibitorio del PDB sobre la acumulación de IPs pudiera ser que este fármaco pudiera estar fosforilando al receptor mÚscarínico y así bloquear cualquier respuesta inducida por el carbacol.

CONCLUSIONES

- En las preparaciones de MLVA y bronquiales de perro, la histamina, comparada con el carbacol, tiene una producción muy baja de IPs. Es muy probable que la contracción inducida por histamina dependa principalmente de la entrada de Ca^{2+} extracelular más que de la formación de IP_3 y liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares.
- El PMA no es un buen inhibidor de la formación de IPs inducido por carbacol, por lo menos en las preparaciones utilizadas en este trabajo.
- El PDB inhibe significativamente la formación de IP_3 y bloquea casi en su totalidad la contracción muscular inducida por carbacol.
- En un medio sin Ca^{2+} la formación de IP_3 contribuye a la contracción bronquial sostenida inducida por carbacol.
- La calfostina C no revierte el efecto inhibitorio de PDB sobre la formación de IPs inducida por carbacol en la preparación de MLVA, por lo que la inhibición de los IPs producida por este fármaco parece ser a través de un mecanismo independiente de la PKC.

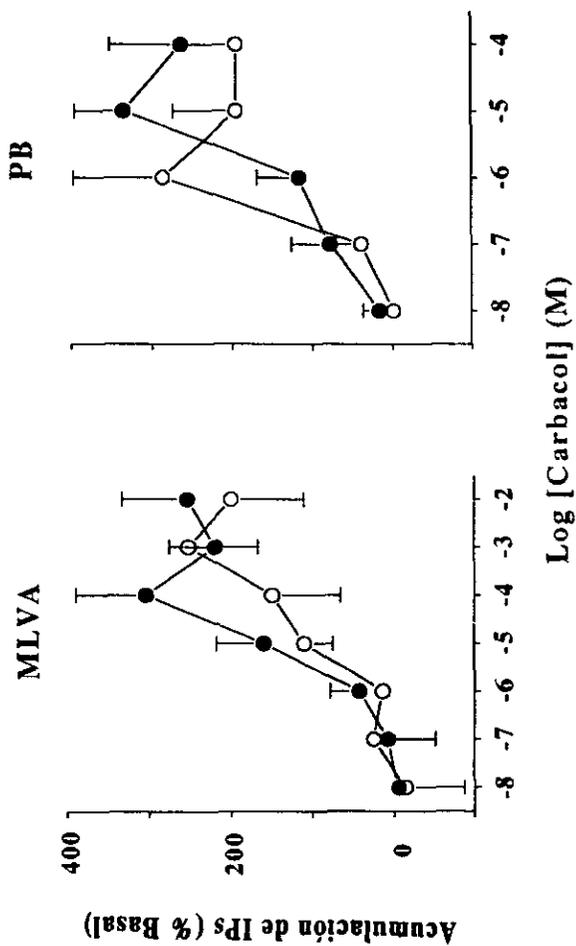


FIG 1. Acumulación de fosfatos de inositol (IPs) generados por carbacol (10^{-8} - 10^{-4} M) en preparaciones de músculo liso de las vías aéreas (MLVA, n=5) y bronquiales (PB, n=5) en Krebs Hepes con Ca^{2+} y glucosa (●) y Krebs Hepes sin Ca^{2+} y glucosa (○).

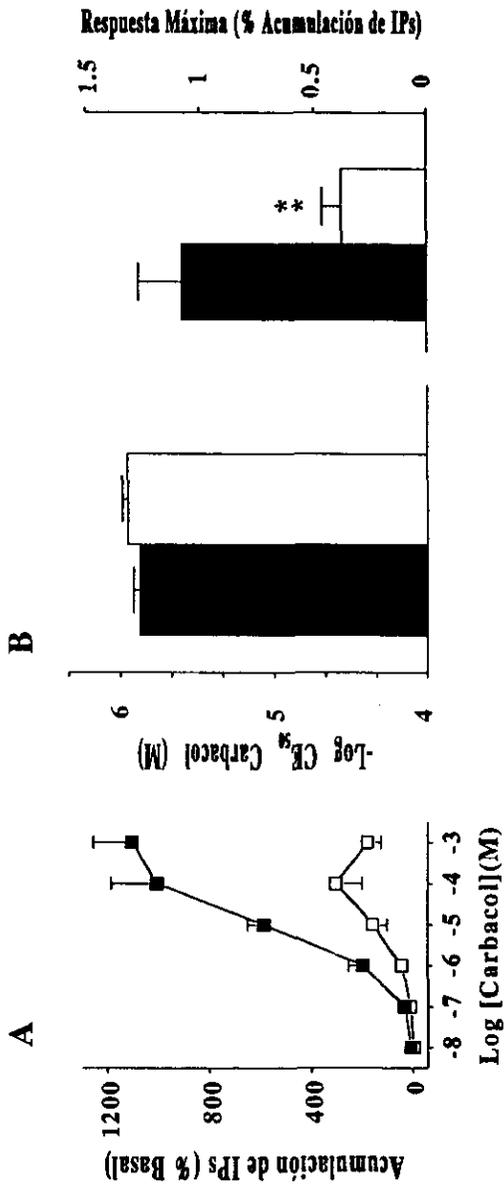


FIG 2. A) Influencia de la glucosa sobre la acumulación de IPs inducida por carbacol (10^{-8} - 10^{-3} M) en las preparaciones de MLVA. Las soluciones empleadas fueron Krebs HEPES con Ca^{2+} y glucosa ($n=6$, □) y Krebs Ringer con Ca^{2+} y sin glucosa ($n=5$, ■). **B)** Se puede observar el $-\log CE_{50}$ y respuesta máxima para la acumulación de IPs inducida por carbacol. $**p<0.01$.

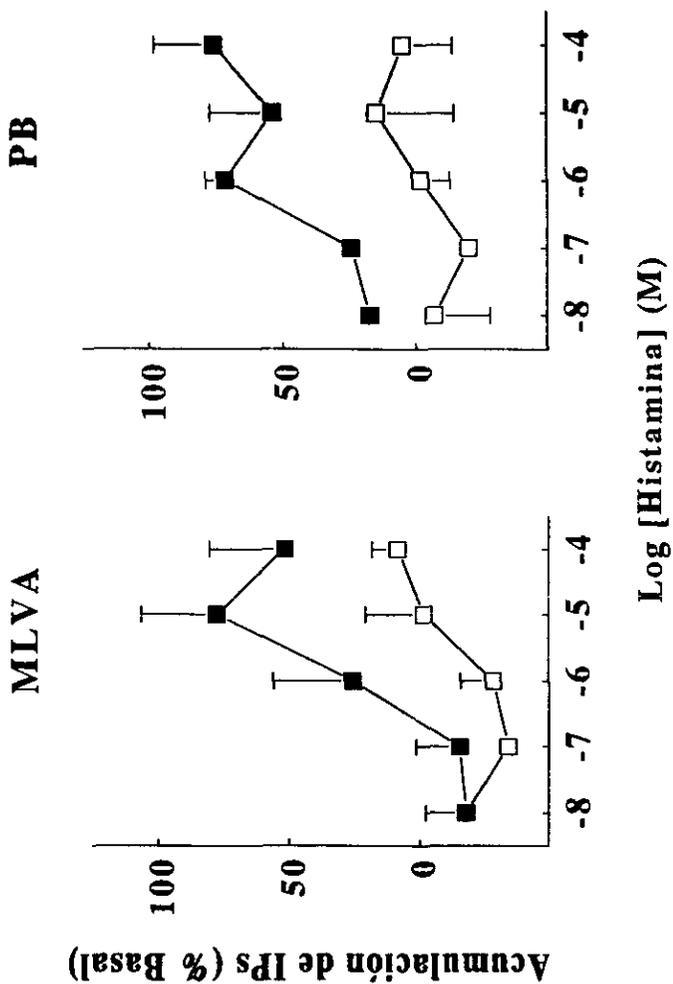


FIG 3. Acumulación de IPs generados por histamina (10^{-8} - 10^{-4} M) en preparaciones de MLVA (n=4) y PB (n=4), en Krebs Ringer + Ca^{2+} (■) y Krebs Ringer - Ca^{2+} (□).

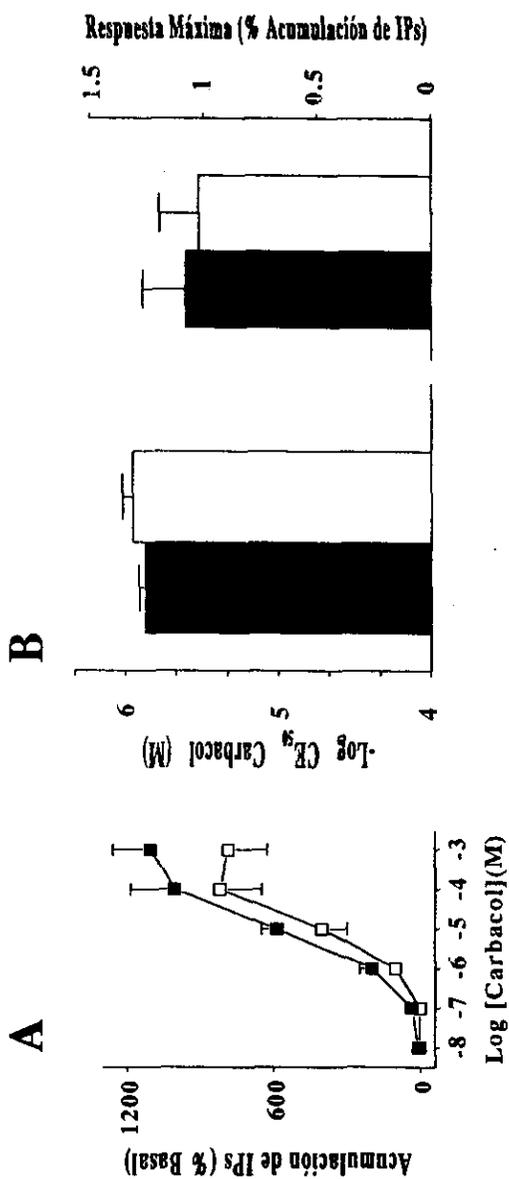


FIG 4. A) Acumulación de IPs generados por carbacol (10^{-8} - 10^{-3} M) en preparaciones de MLVA (n=5). En B) se puede observar el $-\log CE_{50}$ y respuesta máxima para el carbacol en solución de Krebs Ringer con Ca^{2+} (■) y Krebs Ringer sin Ca^{2+} (□).

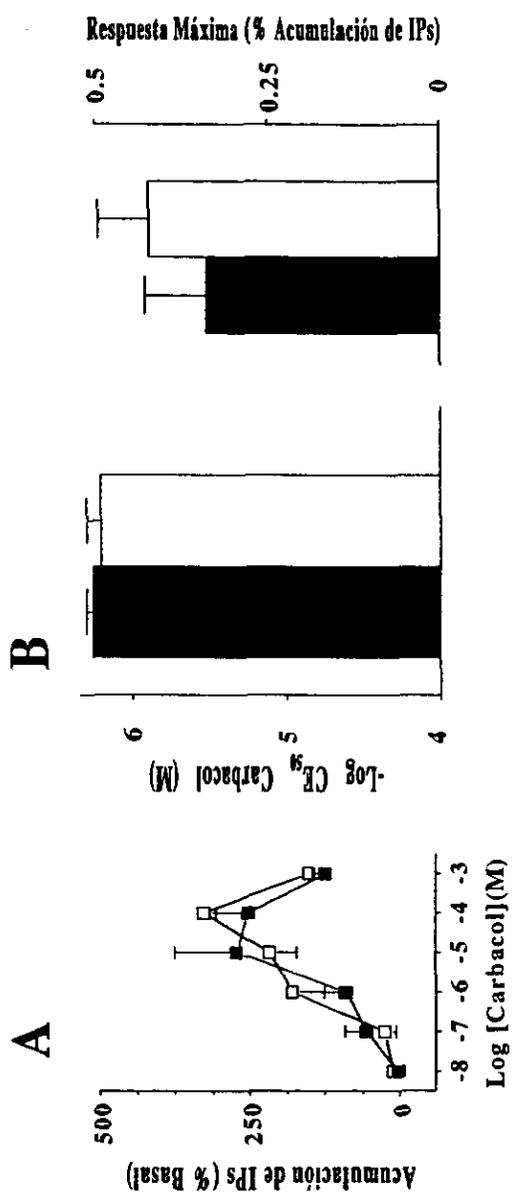


FIG 5. A) Acumulación de IPs generados por carbacol (10^{-8} - 10^{-3} M) en preparaciones bronquiales ($n=7$). En B) se puede observar el $-\log CE_{50}$ y respuesta máxima para el carbacol en solución de Krebs Ringer con Ca^{2+} (■) y Krebs Ringer sin Ca^{2+} (□).

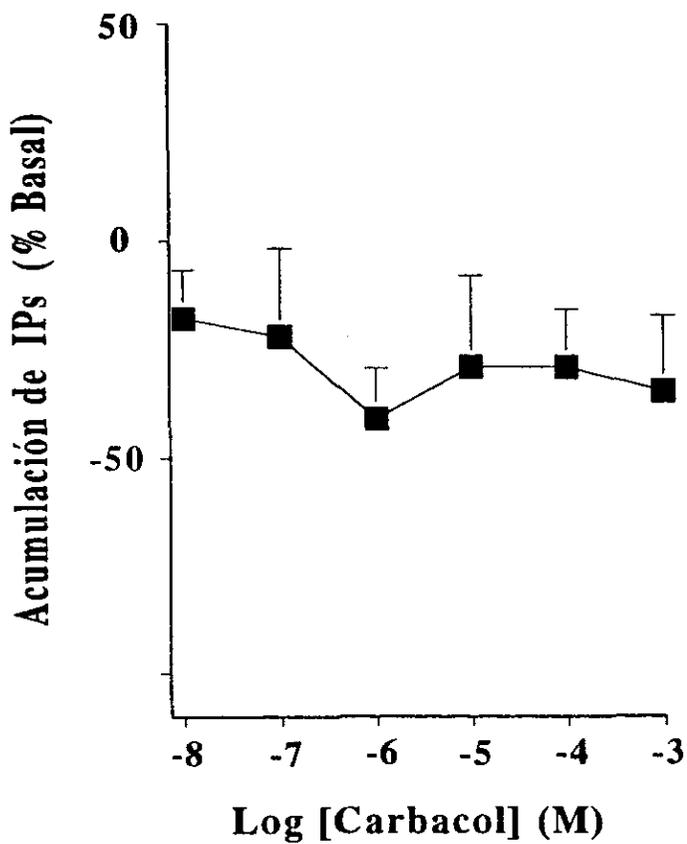


FIG 6. Acumulación de IPs generados por carbacol (10^{-8} - 10^{-3} M) en preparaciones de cartilago (n=3), en Krebs Ringer con Ca^{2+} .

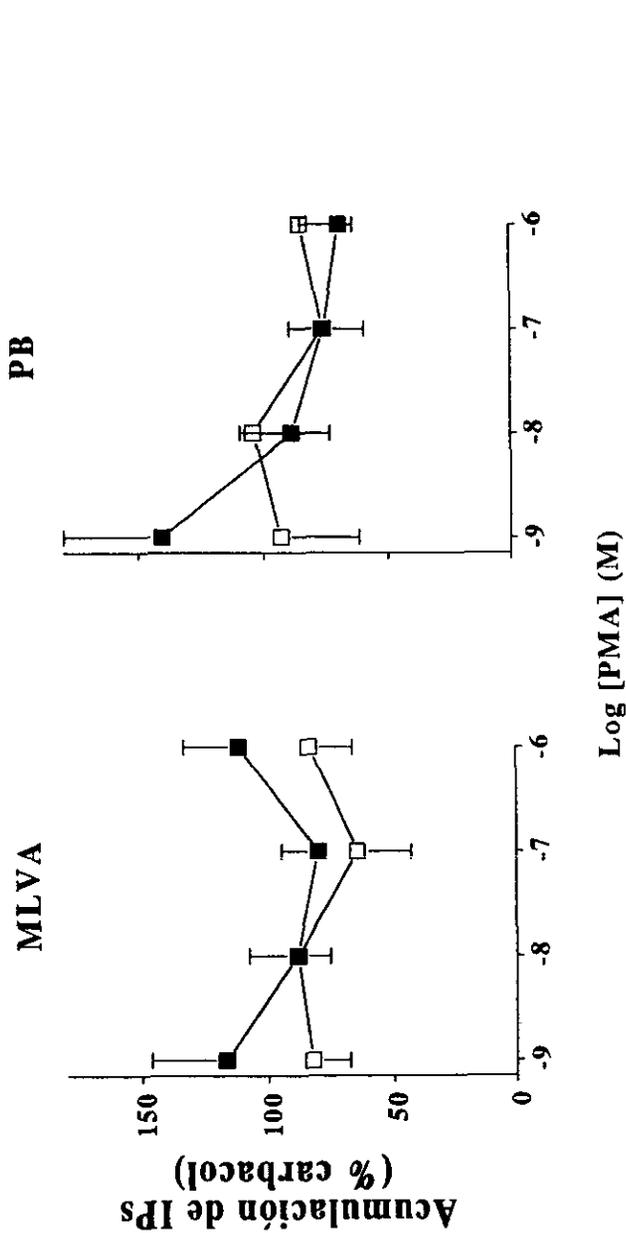


FIG 7. Efecto del 13-acetato 12-miristato de 4 β forbol (PMA, 10^{-2} - 10^{-8} M) sobre la acumulación de IPs inducida por carbacol (100 μ M) en preparaciones de MLVA (n=8, 5) y PB (n=6, 4) en Krebs Ringer con Ca²⁺ (■) y Krebs Ringer sin Ca²⁺ (□).

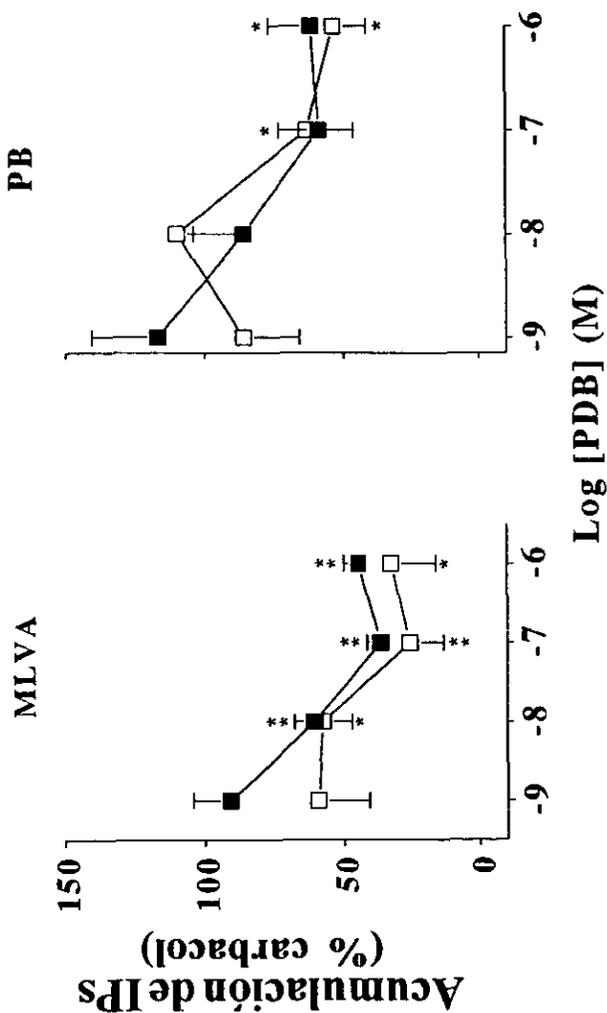


FIG 8. Efecto del 12,13 dibutirato de 4β forbol (PDB, 10^{-9} - 10^{-6} M) sobre la acumulación de IPs inducida por carbacol (100 μ M) en preparaciones MLVA (n=8, 5) y PB (n=6, 4) en Krebs Ringer con Ca^{2+} (■) y Krebs Ringer sin Ca^{2+} (□). * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ con respecto al 100% de carbacol.

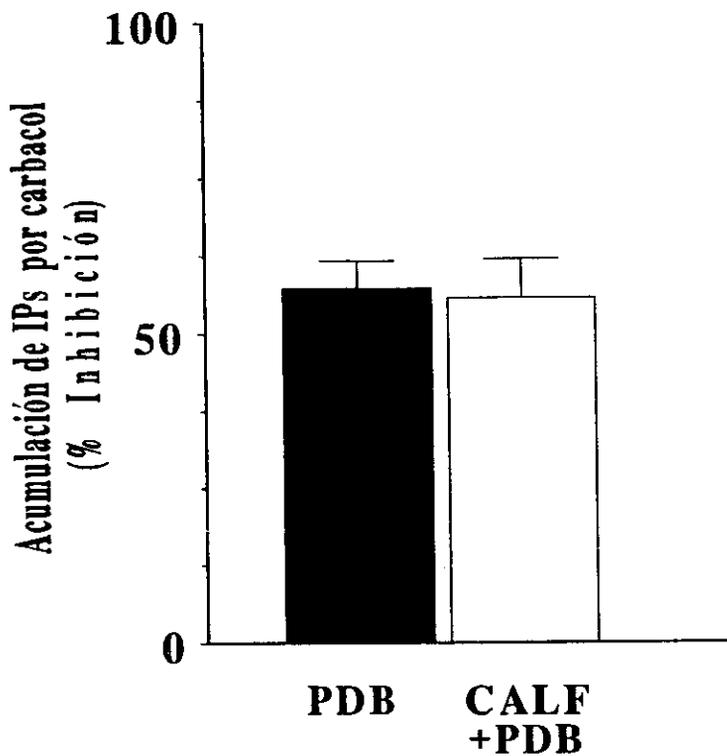


FIG 9. Efecto de la calyculina C (CALF, 1 μ M, n=6) en la respuesta inhibitoria del PDB (1 μ M, n=6) sobre la acumulaci3n de IPs inducida por 100 μ M de carbacol en la preparaci3n de MLVA en Krebs Ringer con Ca²⁺.

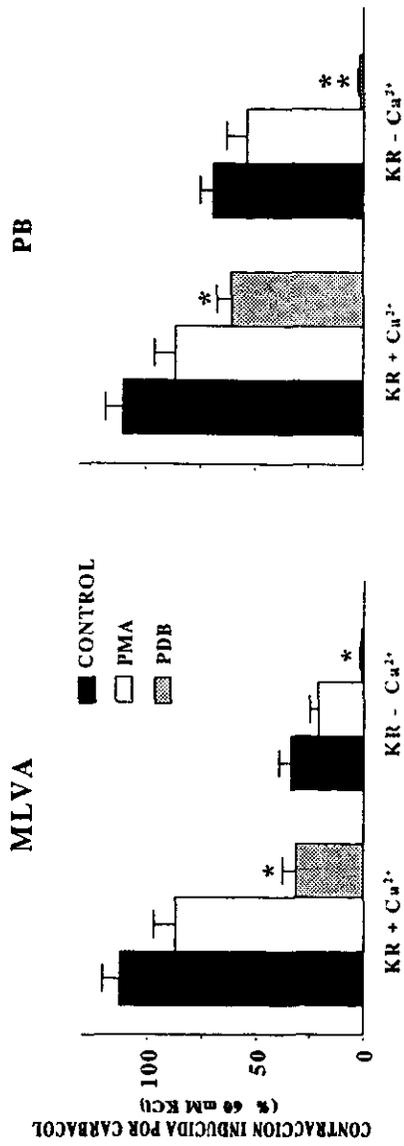


FIG. 10. Efecto del PMA (1 μ M) y PDB (1 μ M) sobre la contracción inducida por carbacol (0.42 μ M) en preparaciones de MLVA (n=9) y PB (n=9) en Krebs Ringer + Ca²⁺ (KR+Ca²⁺) y en Krebs Ringer sin Ca²⁺ (KR-Ca²⁺); *p<0.05, **p<0.01.

VII. REFERENCIAS

1. Aksoy MO, Murphy RA y Kamm KE (1982). Role of Ca^{2+} and myosin light chain phosphorylation in regulation of smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 242: C109-C116.
2. Al-Hassani MH, García JGN y Gunst SJ (1993). Differences in Ca^{2+} mobilization by muscarinic agonists in tracheal smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 264 (Lung Cell Mol. Physiol. 8): L53-L59.
3. Ashendel CL (1985). The phorbol ester receptor: a phospholipid-regulated protein kinase. *Biochim. Biophys. Act.* 822: 219-242.
4. Baba K, Baron B y Coburn RF (1989). Phorbol ester effects on coupling mechanisms during cholinergic contraction of swine tracheal smooth muscle. *J. Physiol. (Lond)* 412, 23.
5. Baron CB, Cunningham M, Strauss JF y Coburn RF (1984). Pharmacomechanical coupling in smooth muscle may involve phosphatidylinositol metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6899-6903.
6. Baron CB, Pring M y Coburn CF (1989). Inositol lipid turnover and compartmentation in canine trachealis smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 256 (Cell Physiol. 25): C373-C383.
7. Bazán PBM, Carbajal SVE, Sommer CMEB, Gonzalez MM, Valenzuela F, Daniel EE y Montaña RLM (1998). Involvement of different Ca^{2+} pools during the sustained contraction induced by carbachol or histamine in Ca^{2+} free medium: Lack of effect of PKC inhibition. (enviado)
8. Berridge MJ (1984). Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* 220: 345-360.
9. Berridge MJ (1985). The molecular basis of communication within the cell. *Sci. American* 253:124-139.
10. Berridge MJ (1988). Inositol and calcium signaling. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol]* 234:359-78.

11. Berridge MJ, Dawson RMC, Downes CP, Heslop JP y Irvine RF (1983). Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem. J.* 212: 473-482.
12. Best L (1986). A role for calcium in the breakdown of inositol phospholipids in intact and digitonin-permeabilized pancreatic islets. *Biochem. J.* 238: 773-779.
13. Bourreau JP, Abela AP, Kwan CY y Daniel EE (1991). Refilling of Ach-sensitive internal Ca^{2+} store directly involves a dihydropyridine sensitive Ca^{2+} -channel in dog trachea. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol. 30):* C497-C505.
14. Coburn RF (1979). Electromechanical coupling in canine trachealis muscle: acetylcholine contraction. *Am. J. Physiol.* 236: C177-184.
15. Challis RAJ, Adams D, Mistry R y Boyle JP (1993). Second messenger and ionic modulation of agonist-stimulated phosphoinositide turnover in airway smooth muscle. *Biochemical Society Transactions* 21: 1139-1144.
16. Connolly TM, Lawing JF y Majerus PW (1986). Protein Kinase C phosphorylates human platelet inositol trisphosphate 5'-phosphomonoesterase, increasing the phosphatase activity. *Cell* 46: 951-958.
17. Corvera S, Schwarz KR, Graham RM y García-Sáinz JA (1986). Phorbol esters inhibit α_1 -adrenergic receptors for (-)-epinephrine. *J. Biol. Chem.* 261(2): 520-526.
18. Cuthbert N, Gardiner PJ, Nash K y Poll CT (1994). Roles of Ca^{2+} influx and extracellular Ca^{2+} release in agonist-induced contractions in guinea pig trachea. *Am. J. Physiol.* 266 (Lung. Cell. Mol. Physiol. 10): L620-L627.
19. Daniel EE, Jury J, Serio R y Jager LP (1991). Role of depolarization and calcium in contractions of canine trachealis from endogenous or exogenous acetylcholine. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69: 518-25.
20. Daykin K, Widdop S y Hall IP (1993). Control of histamine induced inositol phospholipid hydrolysis in cultured human tracheal smooth muscle cell. *European Journal Pharmacology - Molecular Pharmacology.* 240:135-140.
21. Donnelly R, Yang K, Omary MB, Azhar S y Black JL (1995). *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 13: 254-256.

22. Douglas JS y Brink C (1989). Histamine and Prostanoids. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136: S21-S37.
23. Duncan RA, Krzanowski JJ, Jr, Davis JS, Polson JB, Coffey RG, Shimoda T y Szentivanyi (1987). Polyphosphoinositide metabolism in canine tracheal smooth muscle (CTSM) in response to a cholinergic stimulus. *Biochem. Pharmacol.* 36 (3): 307-310.
24. Endo M e Iino M (1993). Calcium mobilization from intracellular stores in smooth muscle cells. *Biomedical Research* 14 (Suppl. 2): 29-33.
25. Ferris CD, Haganir RL, Bredt DS, Cameron AM y Snyder SH (1991). Inositol trisphosphate receptor: phosphorylation by protein kinase C and calcium calmodulin-dependent protein kinases in reconstituted lipid vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (6): 2232-2235.
26. Foster RE, Small RC y Weston AH (1983). The spasmogenic a cation of potassium chloride in guinea-pig trachealis. *Br. J. Pharmacol.* 80: 553-559.
27. Fujimoto T (1993). Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J. Cell. Biol.* 120 (5): 1147-1157.
28. Grandordy BM, Cuss FM, Sampson AS, Palmer JB y Barnes PJ (1986). Phosphatidylinositol response to cholinergic agonist in airway smooth muscle: Relationship to contraction and muscarinic receptor occupancy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238:273.
29. Greene DA y Lattimer SA (1984). Action of sorbinil in diabetic peripheral nerve: relationship of polioliol (sorbitol) pathway inhibition to a myo-inositol-mediated defect in sodium-potassium ATPase activity. *Diabetes* 33: 712-716.
30. Greene DA, Lattimer SA y Sima AAF (1987). Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *N. Engl. J. Med.* 316: 599-606.
31. Griendling KK, Taubman MB, Akers M, Mendlowitz M y Alexander W (1991). Characterization of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 266: 15498-15504.

32. Hall IP y Hill SJ (1988). β -Adrenoceptor stimulation Inhibits histamine-stimulated inositol phospholipid hydrolysis in bovine tracheal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 95: 1204.
33. Hargreave FE, Dolovich J, O'Byrne PM, Ramsdale EH y Daniel EE (1986). The origin of airway hyperresponsiveness. *J. Allergy Clin. Immunol.* 78:825-832.
34. Hashimoto T, Hirata M y Ito Y (1985). A role of inositol 1,4,5 triphosphate in the initiation of agonist-induced contractions of dog tracheal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 86: 191-99.
35. Horowitz A, Menice CB, Laporte R y Morgan KG (1996). Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol. Rev.* 76(4): 967-1003.
36. Hug H y Sarre TF (1993). Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem. J.* 291: 329-343.
37. Hughes AR, Horstma DA, Takemura H and Putney Jr. JW (1990). Inositol phosphate metabolism and signal transduction. *Am Rev Respir Dis* 141: S115-S118.
38. Janssen LJ (1997). T-type and L-type Ca^{2+} currents in canine bronchial smooth muscle: characterization and physiological roles. *Am. J. Physiol.* 272 (Cell Physiol. 41): C1757-C1765.
39. Janssen LJ y Sims SM (1993). Histamine activates Cl^- and K^+ currents in guinea pig tracheal myocytes: convergence with muscarinic signalling. *J. Physiol. (Lond)*, 465: 661-77.
40. Johansson B y Somlyo AP (1980). *The Handbook of physiology: The cardiovascular system. Vol III* (eds Bohr, D.F. Somlyo AP y Sparks HJ): 301-304 (Am. Physiol. Soc., Bethesda).
41. Kajita J y Yamaguchi H (1993). Calcium mobilization by muscarinic cholinergic stimulation in bovine single airway smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 264 (Lung Cell. Mol. Physiol. 8): L496-L503.
42. Kamm KE, Hsu LC, Kubota Y y Stull JT (1989). Phosphorylation of smooth muscle myosin heavy and light chains: effects of phorbol dibutyrate and agonist. *J. Bio. Chem.* 264: 21223.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

43. Kannan MS, Davis C, Ladenius AR y Kannan L (1987). Agonist interactions at the calcium pools in skinned and unskinned canine tracheal smooth muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65:1780-1787.
44. Kotlikoff MI, Murray RK y Reynolds EE (1987). Histamine-induced calcium release and phorbol antagonism in cultured smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 253: C561-C566.
45. Lapetina EG, Reep B y Watson SP (1986). Ionophore A23187 stimulates phosphorylation of the 40,000 dalton protein in human platelets without phospholipase C activation. *Life Sci.* 39: 751-759.
46. Marmy N, Mottas J y Durand J (1993). Signal transduction in smooth muscle cells from human airways. *Respir. Physiol.* 91: 295-306.
47. Marthan R, Savineau JP y Mironeau J (1987). Acetylcholine-induced contraction in human isolated bronchial smooth muscle: Role of an intracellular calcium store. *Resp. Physiol.* 127-135.
48. Montaña LM, Jones GL, O'byrne PM y Daniel EE (1993). Effect of ozone exposure in vivo on response of bronchial rings in vitro: Role of Intracellular Ca^{2+} . *J. Appl. Physiol.* 75(3): 1315-1322.
49. Montaña LM, Barajas-López C y Daniel EE (1996). Canine bronchial sustained contraction in Ca^{2+} -free medium: role of intracellular Ca^{2+} . *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74: 1236-1248.
50. Neer EJ (1995). Heterotrimeric G Proteins: Organizers of Transmembrane Signals. *Cell.* 80: 249-257.
51. Nelsestuen G (1991). Activation and Regulation of enzymes PKC. *J bioenergetics and Biomembranes* 23: 1-2.
52. Nishizuka Y (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science (Washington D.C.)*, 258: 607-614.
53. Park S y Rasmussen H (1986). Charbacol-induced protein phosphorylation changes in bovine tracheal smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 261: 15734-9.
54. Raeburn D y Rodger IW (1984). Lack of effect of leukotriene D_4 on Ca-uptake in airway smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 83: 499-504.

55. Ragan I (1990) Lithium and cell physiology (Effect of lithium on inositol phosphate metabolism). U.S.A. Springer- Verlag , 102-120 p-p.
56. Rodger W (1985). Excitation-Contraction coupling and uncoupling in airway smooth muscle. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 20: 255S-266S.
57. Ryu SH, Kim UH, Wahl MI, Brown AB, Carpenter G, Huang KP y Rhee SG (1990) . Feedback regulation of phospholipase C-beta by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 265(29): 17491-5.
58. Sakakibara F, Hotta N, Koh N y Sakamoto N (1993). *Effects of High glucose concentrations and epalrestat on sorbitol and myo-inositol metabolism in cultured rabbit aortic smooth muscle cells.* *Diabetes* 42: 1594-1600.
59. Sneyd J y Kalachev LV (1994). A profile analysis of propagating calcium waves. *Cell Calcium* 15: 289-296.
60. Somlyo AP y Somlyo AV (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature Lond.* 372: 231-236.
61. Somlyo AV, Bond M, Somlyo AP y Scarpa A (1985). Inositol triphosphate induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5231-5235.
62. Somlyo AP y Himpens B (1989). *B. FASEB J.* 3: 2266-2276.
63. Takai Y, Kishimoto A, Iwasa Y, Kawahara Y, Mori T y Nishizuka Y (1979). Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.* 254: 3692-3695.
64. Takuwa Y, Takuwa N y Rasmussen H (1986). Carbachol induces a rapid and sustained hydrolysis of polyphosphoinositide in bovine tracheal smooth muscle. Measurements of the mass of polyphosphoinositides, 1,2-diacylglycerol and phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* 261: 14670-5.
65. Yoshida Y e Imai S (1997). Structure and function of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Jpn. J. Pharmacol.* 74:125-137.