

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

EFFECTO PARADÓJICO DEL SALBUTAMOL SOBRE
LAS VÍAS AÉREAS EN UN MODELO DE INTOXICACIÓN
AGUDA POR ORGANOFOSFORADOS EN COBAYOS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

BIOL. JAIME CHAVEZ ALDERETE

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS MANUEL MONTANO RAMIREZ

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2007



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 esta 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.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez
Dr. Mario Humberto Vargas Becerra

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

A mis Padres por sus palabras de aliento y a toda mi familia Chávez Alderete
A Vero que en su momento soportó mis ausencias y escapadas al laboratorio los fin de
semana, y en especial a Diego que con sus sonrisas, ocurrencias y logros hace que mi
vida sea mas placentera, llevadera y llena de felicidad, que Dios te cuide y te proteja
hoy y siempre

A mis compañeros del Laboratorio de Hiperreactividad Bronquial
Al personal de apoyo del INER, pero en especial al Sr. Miguel Martínez y a la memoria
del Sr. Eligio Torres[†] por su ayuda incondicional

A la vida tomada de los cobayos

Gracias a cada persona que olvido nombrar y que me ha brindado su amistad y apoyo
en cada momento

así como también a.....

ÍNDICE

	Página
ABREVIACIONES	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
<i>Generalidades de los insecticidas organofosforados</i>	9
<i>Mecanismo de acción de los organofosforados</i>	11
<i>Función del citocromo P450 en el metabolismo de los compuestos organofosforados</i>	13
<i>Signos de intoxicación</i>	17
<i>El salbutamol y su efecto sobre la respuesta de broncoobstrucción inducida por paratión</i>	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
HIPOTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECIFICOS	22
MATERIAL Y MÉTODOS	
<i>Diseño experimental</i>	23
Experimentos <i>in vivo</i>: Pletismografía barométrica	
<i>Análisis de la función respiratoria</i>	23
<i>Administración del paratión</i>	27
Experimentos en órganos aislados	
<i>Estudios funcionales</i>	28
<i>Determinación de la actividad de la AChE pulmonar</i>	31
<i>Cuantificación de ACh mediante cromatografía líquida de alta presión</i>	33
<i>Cuantificación de sustancia P liberada de los anillos traqueales mediante inmunoensayo</i>	34
Mediciones de $[Ca^{2+}]_i$ en células de músculo liso traqueal de cobayos	
<i>Disgregación y procedimiento para los registros de microfluorometría</i>	35
Fármacos	38

Análisis estadístico	38
RESULTADOS	
<i>Experimentos in vivo</i>	39
<i>Efecto del paratión en el músculo liso de las vías aéreas</i>	39
<i>Experimentos in vitro</i>	41
<i>Mediciones de ACh y sustancia P</i>	47
<i>Experimentos en célula única</i>	48
DISCUSIÓN	50
REFERENCIAS	57
ANEXO: ARTICULO PUBLICADO	68

ABREVIACIONES

ACh, acetilcolina

AChE, acetilcolinesterasa

Ca²⁺, calcio

[Ca²⁺]_i, calcio intracelular

CCh, carbacol

CTX, ω-conotoxina GVIA

H₂O₂, peróxido de hidrógeno

HPLC, cromatografía líquida de alta presión

i.p, intraperitoneal

mM, milimolar

NK, neurocinina

nM, nanomolar

nmol, nanomoles

Penh, enhanced pause

pg, picogramos

TTX, tetrodotoxina

μM, micromolar

RESUMEN

Los insecticidas organofosforados como el paratión son un grupo de compuestos cuyo principal efecto en el organismo es la inhibición irreversible de la actividad de la acetilcolinesterasa y el uso de estos compuestos es aún frecuente y cada año origina intoxicaciones alrededor del mundo. En diferentes modelos animales, el paratión induce broncoobstrucción, incremento en la secreción traqueobronquial, edema pulmonar, hiperreactividad de las vías aéreas e inhibición de la actividad del citocromo P450. Esta broncoobstrucción inducida por paratión es el reflejo en parte de la contracción del músculo liso de las vías aéreas, la cual ha sido revertida transitoriamente con el uso de salbutamol, sin embargo se ha observado una reconstricción posteriormente, lo que sugiere que este agonista induce mecanismos obstructivos adicionales. Para explorar este fenómeno en el presente trabajo, se realizaron experimentos *in vivo* evaluados mediante la pletismografía barométrica, *in vitro* realizados en el sistema de órganos aislados, incluyendo la medición de acetilcolina (ACh) mediante cromatografía líquida de alta presión y de sustancia P mediante inmunoensayo; además de mediciones de calcio (Ca^{2+}) intracelular en células aisladas de músculo liso. En los experimentos *in vivo* se demostró que el paratión promovió una broncoobstrucción progresiva hasta alcanzar una meseta y estabilizarse. La administración de salbutamol durante esta meseta, decrementó la broncoobstrucción en un 22% en los primeros 5 minutos, posteriormente la obstrucción de las vías aéreas alcanzó la misma intensidad semejante a la existente previa a la administración del salbutamol. El uso de aminofilina causó un decremento sostenido del 71% de la broncoobstrucción inducida por paratión. En los estudios *in vitro*, el paraoxón produjo en anillos traqueales una contracción sostenida, la cual fue completamente bloqueada por atropina pero no por tetrodotoxina (TTX), o por ω -conotoxina (CTX) así como tampoco por la eliminación del epitelio de los anillos traqueales. Durante la contracción inducida por paraoxón, el salbutamol generó una relajación temporal de un 50% seguido por una reconstricción parcial. Esta reconstricción paradójica fue anulada con el uso de antagonistas de los receptores muscarínicos M_2 y a taquicinina NK_1 (metoctramina o AF-DX 116, y L-732,138 respectivamente), y acompañada por una relajación permanente. La forskolina generó una relajación completa a la respuesta de paraoxón. La sustancia P y en menor grado ACh fueron liberadas de los anillos traqueales incubados con paraoxón o fisostigmina durante 60 min, estas sustancias se vieron incrementadas significativamente cuando el salbutamol fue administrado. En las células de músculo liso, el paraoxón no produjo ningún cambio en los niveles basales del Ca^{2+} intracelular. Nuestros resultados sugieren que al menos en este modelo experimental: 1) los organofosforados generan contracción del músculo liso de las vías aéreas por la acumulación de ACh liberada a través de mecanismos resistentes a TTX y CTX, 2) durante dicha contracción, la relajación inducida por salbutamol es funcionalmente antagonizada por la estimulación de los receptores M_2 , y 3) después de esta relajación transitoria inducida por salbutamol, se origina una contracción paradójica debido a la liberación subsiguiente de sustancia P.

INTRODUCCIÓN

La preocupación de aumentar y preservar sus cosechas ha acompañado al hombre desde el momento en que su asentamiento como agricultor hizo depender su subsistencia de la cuantía y calidad de sus cosechas. A la lucha contra las distintas plagas que amenazan los alimentos y otros productos agrícolas, se suma la emprendida lucha contra los insectos y otros animales, vectores de enfermedades transmisibles.

Los compuestos orgánicos sintéticos utilizados actualmente en el control de plagas, aun perteneciendo muchos de ellos a la segunda o tercera generación de aquéllos introducidos durante la 2ª Guerra Mundial, siguen poseyendo en todos los casos un grado de toxicidad, mayor o menor según las características de estos plaguicidas, inherente a su función biocida.

De acuerdo a la definición aceptada en 1986 por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO por sus siglas en inglés) un plaguicida es una sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga (incluyendo vectores de enfermedad humana o animal) de especies indeseadas de plantas o animales capaces de causar daños o interferir de cualquier otra forma con la producción, procesamiento, almacenamiento o transporte de alimentos de origen vegetal o animal, o que puedan ser usados en la medicina veterinaria para el control de insectos, arácnidos u otras plagas (WHO, 1990).

Durante más de medio siglo, a partir de la aparición de estos innovadores agentes sintéticos, se han desarrollado plaguicidas de todo tipo (insecticidas, rodenticidas, herbicidas, fungicidas, etc), que continúan teniendo cierto grado de toxicidad para el hombre y los animales domésticos. Pese a las categorías que los

definen según la clase de organismos a exterminar, los plaguicidas afectan a numerosas especies a las que no van destinados, dado que actúan sobre sistemas bioquímicos y fisiológicos similares. Ello implica un cierto nivel de riesgo para la salud humana aun cuando se apliquen correctamente, riesgo que se incrementa considerablemente con los usos inadecuados, los abusos y la incorrecta o nula prevención de la exposición a tales compuestos (Northoff, 2004).

La Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés) y FAO han estimado en alrededor de 1 millón al año el número mundial de casos de intoxicación aguda grave por plaguicidas, más una cifra similar o mayor de casos no registrados, con un mínimo de $\frac{1}{4}$ de millón de fallecimientos (Freudenthal, 2006; Klein-Schwartz y col. 1997; Northoff, 2004), y la mayoría de estos incidentes ocurren en países subdesarrollados, sin embargo, en países desarrollados aun es un grave problema de salud pública (Jaga y col. 2003). Entre el año de 1994 y el 2000 el uso de estos compuestos se incrementó en Centroamérica de 1.3 a 6.7 kilogramos *per capita* (Henoa y col. 2002).

En México a partir de la década de los 80's se empiezan a conocer las cifras de intoxicaciones con plaguicidas a nivel nacional mediante el Boletín de Epidemiología editado por el Sector Salud (Dirección General de Epidemiología), así como de datos epidemiológicos de algunos estados de la República Mexicana (Tinoco-Ojanguren, 1998) además del impacto que tienen en la salud por la exposición a estas sustancias (Ortega-Cesaña y col. 1993). En el año 2001 la Red Toxicológica Mexicana del Sector Salud (RETOMEX) da a conocer que la mayoría de estas intoxicaciones son generadas por plaguicidas organofosforados y casi en la misma proporción entre hombres y mujeres en edad productiva.

La incidencia de los efectos agudos y crónicos de los plaguicidas se desconocen, aunque probablemente los efectos crónicos supere en varios órdenes de magnitud a la de los efectos agudos (Durán-Nah y col. 2000).

Si bien habitualmente se considera que los principales riesgos de los plaguicidas para la salud derivan de la exposición ocupacional directa, en los últimos años se está prestando especial atención a los efectos generados por la exposición circunstancial e inadvertida a estos productos en lugares de trabajo o residenciales exentos de ellos en su actividad usual. La mayoría de estos incidentes ocurren en países subdesarrollados particularmente en África, Asia, Centro y Sudamérica.

Dada la gran cantidad de familias químicas implicadas, la clasificación de los plaguicidas resulta difícil ya que existen unas 70,000 diferentes sustancias químicas en el mercado. Un recurso útil es clasificarlos en función de las plagas sobre las que se usan, otra posibilidad es una clasificación en relación con la familia química, ya que esta clasificación nos da una mayor información sobre su toxicidad. En general, se tiende a hacer una clasificación mixta por ambos criterios como en la siguiente tabla se demuestra (Ferrer, 2003) (Tabla 1).

Entre los plaguicidas más utilizados y potentes se encuentran los insecticidas sintéticos, como los organofosforados o los carbamatos, los cuales son neurotóxicos tanto en insectos como en otras especies animales como los mamíferos, actuando al inhibir la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) (Lessire y col. 1996; Taylor, 1996) sobre la sinapsis o en la placa neuromuscular, con lo que surge una crisis colinérgica debida a una acumulación de acetilcolina (ACh), que puede provocar depresión respiratoria y en grado mayor, la muerte por edema pulmonar (Hurst y col. 2006).

Tabla 1. Clasificación de los principales plaguicidas

INSECTICIDAS
-Organoclorados
-Organofosforados
-Carbamatos
-Piretroides
FUNGICIDAS
-Organoclorados
-Organomercuriales
HERBICIDAS
-Bipiridílicos
-Organoclorados
-Otros
RATICIDAS
-Dicumarínicos

Generalidades de los insecticidas organofosforados

Se denominan insecticidas organofosforados a aquellas sustancias orgánicas que presentan en su estructura química un átomo de fósforo unido ya sea a un átomo de azufre o a un átomo de oxígeno mediante un doble enlace, altamente tóxicos y que son un grupo muy importante de compuestos que varían enormemente en estructura y propiedades químicas. Estos compuestos se pueden mezclar con agua, pero típicamente son miscibles en solventes orgánicos.

Los organofosforados se pueden clasificar dependiendo de los átomos que estén directamente unidos al fósforo central, originando con ello los fosfatos, fosfonatos, fosforotioatos, fosforoditionatos, fosforoamidatos, etc. En los que contienen azufre unido al fosfato mediante doble enlace como son los fosforotioatos, ocurre un importante paso de bioactivación. Para este tipo de compuestos, la desulfuración oxidativa ocurre por la vía de las monooxigenasas del citocromo P450, las cuales son

enzimas implicadas en el metabolismo de compuestos xenobióticos. Sin embargo, en este caso el metabolito oxidado posee mayor toxicidad que el precursor.

Los insecticidas que pertenecen a este grupo (fosforotioatos) de compuestos organofosforados como el paratión (O,O-dietil O-4-nitrofenol fosforotioato), que es el compuesto más representativo de este grupo, fue sintetizado hacia los años 40's por un grupo de químicos encabezados por el alemán Gerhard Schrader, e introducidos desde un principio como plaguicidas de alta eficacia por ser de naturaleza lipídica y rápida absorción (Taylor, 1996). A pesar de conocerse desde su descubrimiento que dicho compuesto representa un alto riesgo para la salud humana, se sigue empleando en gran escala a nivel mundial tanto en la agricultura, debido a su baja volatilidad y rápida degradación en el ambiente (Hurst y col. 2006), como en la medicina veterinaria por sus propiedades como antihelmínticas (Delaunois y col. 1991). Sorprendentemente también se han encontrado compuestos organofosforados como contaminantes provenientes de aceites y líquidos sobrecalentados en la industria aeronáutica (van Netten, 2001), provocando intoxicaciones accidentales y en menor grado voluntarias, por lo que representa un grave problema de salud pública, tanto por su incidencia, como por la severidad de los síntomas (Delaunois y col. 1992; Delaunois y col. 1993; Sutiak y col. 1994). Sin embargo, los síntomas ocasionados dependerán de la dosis, frecuencia, duración y la ruta de exposición, así como de otros factores como la exposición combinada a otros químicos o a la susceptibilidad y sensibilidad de cada individuo (Abou-Donia, 2003).

Mecanismo de acción de los organofosforados

Los insecticidas organofosforados como el paratión *per se*, carecen de actividad biológica importante; sin embargo, una vez que ingresan al organismo ya sea por la piel, el tubo digestivo o por cualquier mucosa (Taylor, 1996), puede ser depurado convirtiéndolo a dietiltiofosfato y p-nitrofenol para su excreción o bien, ser biotransformado y bioactivado a su metabolito activo, el paraoxón (O,O-dietil O-4 nitrofenil fosfato) que es una molécula extremadamente tóxica. En humanos la bioactivación de este organofosforado se le atribuye a la familia de enzimas de los citocromos P450, involucrando a las isoformas 1A2, 2B6, 2C9, 2C19, 3A4, 3A5 y 3A7, principalmente en la fracción microsomal hepática y en el pulmón (Buratti y col. 2003; Foxenberg y col. 2007).

Los principales efectos tóxicos generados por los organofosforados, como el paraoxón, se basan en su capacidad de bloquear irreversiblemente la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) causado por una inhibición esteárica (Delaunois y col. 1992).

Durante el proceso normal de hidrólisis de la acetilcolina (ACh), sustrato natural de la AChE, su grupo acetil es transferido al grupo serina-OH del centro catalítico de la AChE, dejando una molécula de enzima acetilada y una molécula de colina libre. La espontánea hidrólisis de grupo acetil ocurre rápidamente, regenerando así la actividad de la AChE (Rang y col. 1999). En presencia del paraoxón, la inhibición de la AChE se origina con la unión mimética del paraoxón al grupo serina-OH del centro activo de la AChE, fosforilando este grupo y el resultante conjugado es extremadamente estable acumulando grandes cantidades de ACh en el espacio sináptico y las uniones neuromusculares, lo que produce inicialmente una hiperestimulación nerviosa o crisis

colinérgica y posteriormente un agotamiento e interrupción de la transmisión nerviosa, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico (Slaper y col. 2006; Taylor, 1996).

Dicha unión se dice que es “irreversible” porque el conjugado fosforil-AChE es hidrolizado de manera lenta, debido al grupo etilo de la molécula de paraoxón. El tiempo aproximado de unión del complejo formado es de 60 horas, por lo que la capacidad catalítica de la AChE se pierde por completo (Chambers, 1992).

En los mamíferos la ACh se localiza en las terminaciones posganglionares del parasimpático (receptores muscarínicos), en las uniones neuromusculares (receptores nicotínicos), en los ganglios simpáticos y parasimpáticos (receptores nicotínicos) y en el sistema nervioso central.

La AChE de las sinapsis y uniones neuromusculares es entonces considerada como la molécula blanco de la toxicidad de los organofosforados, pero estos compuestos son además inhibidores de la AChE intraeritrocitaria (o colinesterasa verdadera), de la colinesterasa plasmática (butirilcolinesterasa) y de la hepática (o pseudocolinesterasa) y aunque se desconocen las repercusiones clínicas de este hecho, su evaluación permite establecer con limitaciones, la gravedad de la intoxicación y el tiempo transcurrido desde la exposición.

Por último, se cree que estos compuestos también inhiben a la esterasa neurotóxica (Chemnitius y col. 1983; Novak y col. 1986), enzima localizada principalmente en el cerebro, la cual se ha relacionado íntimamente con la neuropatía retardada (Chang y col. 1994; Johnson, 1970; Williams y col. 1981) entre 10 y 14 días posteriores a la intoxicación; sin embargo su participación en las manifestaciones tardías inducida por los organofosforados queda por dilucidar. No así el desorden

neurodegenerativo persistente de largo plazo inducido por la exposición a compuestos organofosforados, como lo es la neurotoxicidad crónica, donde numerosos casos documentan este desorden y han sido reportados exhaustivamente desde hace más de 50 años (Abou-Donia, 2003).

Función del citocromo P450 en el metabolismo de los compuestos organofosforados

Los seres vivos se encuentran continuamente expuestos a sustancias ambientales ajenas a ellos y que son biológicamente activas, pero sin valor nutricional, que en ocasiones son de naturaleza tóxica; a estas sustancias o compuestos se les llaman xenobióticos.

Cada organismo ha desarrollado diversas vías metabólicas capaces de convertir estas sustancias tóxicas a derivados polares (hidrosolubles) menos dañinos y ser eliminados con facilidad del organismo. A estos procesos bioquímicos en conjunto se les ha denominado como biotransformación y bioactivación, los cuales son esencialmente de naturaleza enzimática (Benet y col. 1996; Sipes y col. 1995). En ocasiones el proceso de biotransformación convierte una sustancia inocua en una sustancia metabólicamente tóxica y potencialmente dañina para el organismo. Los organofosforados como el paratión se absorben rápidamente al organismo por cualquier ruta o vía de exposición, son de difícil degradación metabólica y que además pasan por procesos de biotransformación y bioactivación.

El metabolismo del paratión puede seguir diferentes vías bioquímicas posibles; una oxidación (activación) donde el átomo de azufre unido al átomo de fósforo con

doble enlace es sustituido por el átomo de oxígeno con doble enlace, dando lugar al paraoxón (Neal, 1971) (Fig 1).

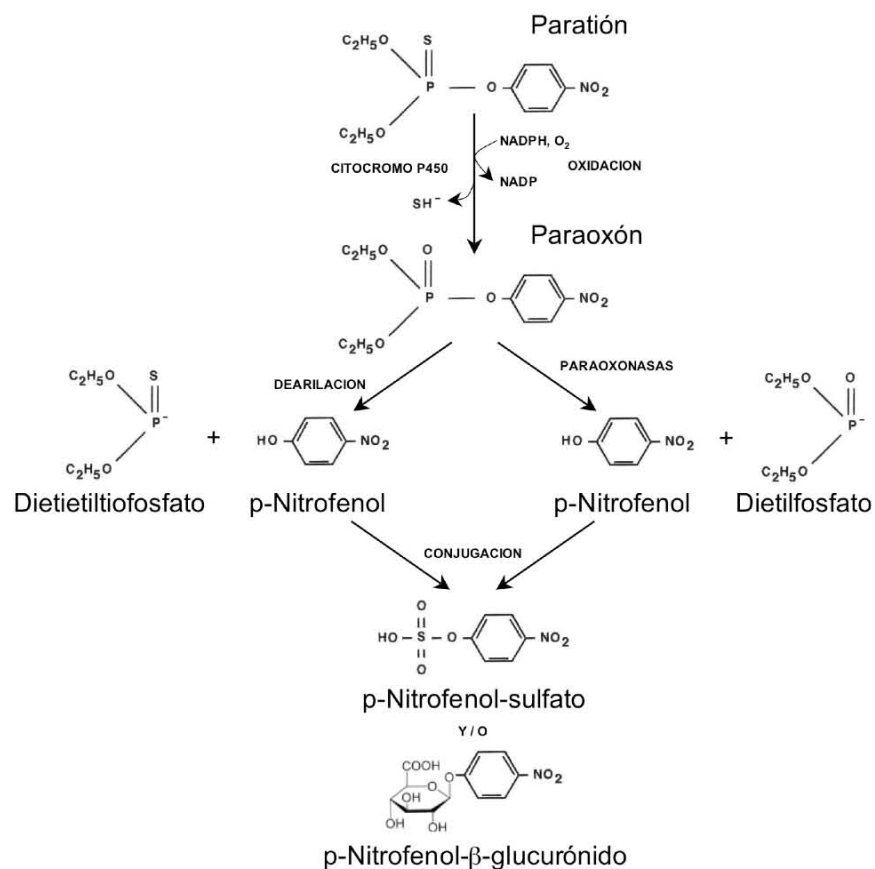


Fig.1. Vías propuestas en el metabolismo del paratión

Otra vía es la dearilación (detoxificación) que genera su inactivación al ser biotransformado mas no bioactivado a p-nitrofenol y ácido dietiltiofosfórico, ambos inocuos para el organismo (Kamataki y col. 1976). Una tercera vía es la interacción con enzimas (esterasas) como las carboxil-esterasas y A-esterasas (Gallo y col. 1991; Sultatos y col. 1985), actuando como moléculas atraparoras (carboxil-esterasas), uniéndose estequiométricamente al paraoxón formado (lo que significa la reducción del número de moléculas disponibles para inhibir a la AChE), o protegiendo contra la

toxicidad colinesterásica (A-esterasas como las paraoxonasas) mediante la inactivación catalítica del paraoxón (Fonnum y col. 1985; Karanth y col. 2000) que lo convierte en ácido dietilfosfórico y p-nitrofenol. El p-nitrofenol formado posteriormente es conjugado formando p-nitrofenol-sulfato o p-nitrofenol- β -glucurónico que son posteriormente eliminados en la orina (Qiao y col. 2000).

Se sabe que la hidrólisis del paraoxón es dependiente de los niveles de calcio (Ca^{2+}) contenido en los tejidos, sugiriendo un papel muy importante en la hidrólisis del paraoxón por las A-esterasas, ya que el Ca^{2+} es requerido en la reacción catalítica para mantener la conformación del sitio activo (Gil y col. 1994; Vitarius y col. 1995). Por otro lado, el Ca^{2+} libre facilita la eliminación del dietilfosfato de la A-esterasa probablemente por la polarización del puente P=O de la molécula dietilfosfato-A-esterasa intermedia (Vitarius y col. 1995).

Para hacer este trabajo las células cuentan con dos sistemas de enzimas que tienen la función de introducir en la molécula de paratión un átomo de oxígeno proveniente del oxígeno molecular (oxigenasas de función mixta). Estos dos sistemas son las monoxigenasas y los citocromos P450, ambos sistemas se encuentran localizados en el retículo endoplásmico. Las monoxigenasas oxidan aminas y compuestos sulfurados, mientras que el sistema de citocromos P450 están formados por dos proteínas diferentes, una tiene función de reductasa (NADPH-citocromo P450 reductasa), y la otra es una hemoproteína con actividad de oxigenasa (citocromo P450) (Benet y col. 1996, Peña y col. 2001).

El mecanismo de la reacción de la oxidación del paratión catalizada por citocromo P450, en términos generales es como sigue: **(A)** el paratión entra al sitio activo que se encuentra en la oxigenasa, formando un complejo enzima sustrato, **(B)** la

reductasa transfiere un electrón al hierro hemático reduciéndolo de Fe^{3+} a Fe^{2+} , **(C)** la reducción abre el sitio activo del O_2 , **(D)** el O_2 entra al sitio activo y oxida al paratión y lo convierte a paraoxón que está en la superficie de la enzima transfiriéndole uno de los átomos de oxígeno (Fig. 2)

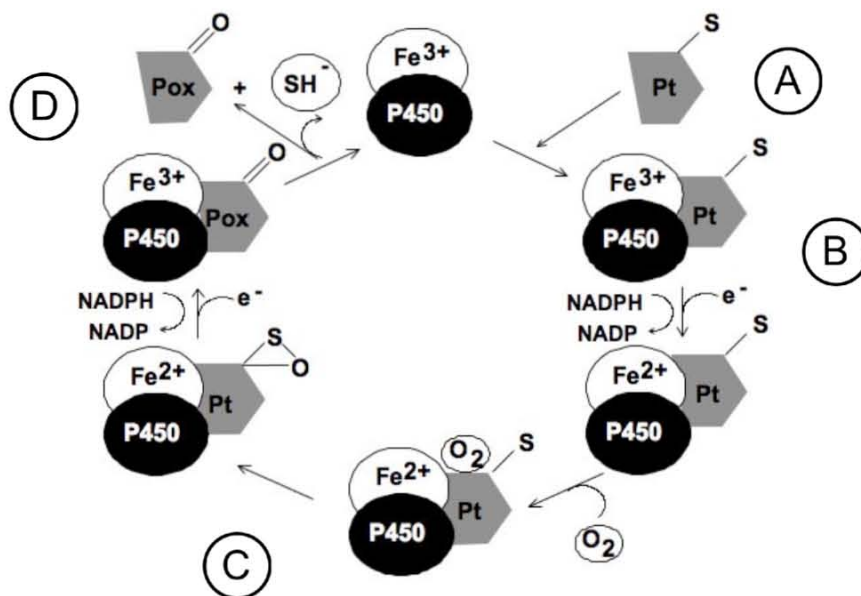


Fig.2. Representación esquemática del mecanismo de oxidación del paratión mediante el citocromo P450. Tomado de Segura, 2000.

En 1987 se unificó una nomenclatura para clasificar a la superfamilia multigénica del P450 que se diferencian en su especificidad, por la secuencia de sus aminoácidos, criterio filogenético y por su organización génica. El término CYP es seguido por el número de familias (generalmente grupo de proteínas con más del 40% de homología en la secuencia de aminoácidos, se han identificado más de 200), y una letra mayúscula para las subfamilias (mayor al 55% de homología) y finalmente el número del gen (Sipes y col. 1995; Werck-Reichhart y col. 2000).

Existen mas de 500 genes y pseudogenes del P450 en la naturaleza, en humanos se han identificado 55 genes y 25 pseudogenes. Solo un gen de la familia de los P450, CYP51, se ha conservado desde la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* incluyendo hongos, plantas y animales (Werck-Reichhart y col. 2000).

Todos los P450 pueden dividirse en 4 clases dependiendo de cuantos electrones del NADPH son transferidos al sitio catalítico. Las enzimas de la clase II de los P450 son los más comunes en los eucariontes y tanto la clase I como la II de todos los organismos participan en la detoxificación y algunas veces la activación de compuesto xenobióticos.

Signos de intoxicación

Las manifestaciones clínicas de una intoxicación por insecticidas organofosforados son variadas, entre las que se encuentran los espasmos musculares (alteraciones neuromusculares), vómito, diarrea (gastrointestinales) y depresión del centro respiratorio o convulsiones (neurológicas) (Henoa y col 1986; Taylor, 1996). Sin embargo, entre las alteraciones más graves y que pueden llevar a la muerte son las respiratorias, destacando entre ellas el edema pulmonar no cardiogénico (Kass y col. 1991).

Por otro lado, aunque algunos estudios en animales han encontrado que los organofosforados producen también obstrucción de las vías aéreas (Chávez, 1996; Segura y col. 1999), los mecanismos por los cuales ocurre no han sido bien caracterizados. Esto resulta relevante porque la obstrucción de las vías aéreas puede ser ocasionada directamente por espasmo del músculo liso, edema pulmonar, aumento

de las secreciones bronquiales, e indirectamente por una excitabilidad (hiperreactividad) del músculo liso de las vías aéreas a la ACh.

El salbutamol y su efecto sobre la respuesta de broncoobstrucción inducida por paratión

El salbutamol es un agonista selectivo para los receptores adrenérgicos β_2 y en las vías aéreas su efecto principal es el relajar el músculo liso traqueobronquial.

En un trabajo previo en cobayos (Segura y col. 1999) utilizamos salbutamol (a dosis terapéuticas para el humano), tanto por vía intraperitoneal (i.p) como nebulizada durante la obstrucción máxima inducida por paratión. Encontramos que el salbutamol, causó una broncodilatación rápida y transitoria del 50%. Sin embargo, este efecto fue revertido por un regreso a los valores de broncoobstrucción previos a la administración del salbutamol, lo que nos sugirió la existencia de mecanismos broncoobstructivos adicionales inducidos por este agonista adrenérgico β_2 selectivo.

En este sentido, Zang y col. (1995), estudiaron el efecto de agonistas adrenérgicos sobre la liberación de ACh, y por consiguiente sobre la activación de los receptores M_3 y M_2 , en el músculo liso traqueal de equinos. Estos autores demostraron que la estimulación de los receptores adrenérgicos α_2 presinápticos inhibe la liberación de ACh, mientras que la estimulación de los adrenoreceptores β_2 presinápticos estimulan la liberación de ACh (Zhang y col. 1995). Por lo tanto, es posible que esta reobstrucción paradójica causada por el salbutamol sea debida a la liberación de ACh por la estimulación presináptica de los receptores adrenérgicos β_2 .

En una respuesta de contracción colinérgica del músculo liso están involucrados los receptores M_3 y M_2 donde está bien caracterizado que el M_2 está acoplado a una proteína G inhibitoria (G_i) que disminuye la actividad de la enzima adenilato-ciclase, con la consiguiente disminución en la producción de AMPc (Schramm y col. 1995). Así, los mecanismos inducidos por la activación de los receptores M_2 son particularmente opuestos a los que se activan durante la estimulación de los receptores adrenérgicos β_2 que son el incremento en la producción del AMPc, el cual está íntimamente relacionado con la relajación del músculo liso. Este fenómeno de asociación inversa entre los receptores β_2 y los receptores M_2 se ha descrito ampliamente como un antagonismo funcional.

En un estudio en cobayos Keir y col. (2002), demostraron que la administración continua de albuterol (salbutamol) por 10 días originaba hiperreactividad de las vías aéreas y que era evitada si antes del tratamiento con albuterol se les administraba capsaicina, un fármaco para depletar a las fibras sensoriales (fibras-C) de sus neurotransmisores. Por lo tanto, otra posible explicación del efecto no deseado del salbutamol es la estimulación de fibras-C, con la liberación de taquicininas. Las fibras nerviosas sensibles a capsaicina o fibras-C, son terminaciones que se localizan en toda la vía aérea. Estas fibras liberan una gama de neurotransmisores llamados taquicininas y constituyen una familia de péptidos estructuralmente relacionados y originalmente aislados y caracterizados por su propiedad de inducir contracción del músculo liso, aumento de la permeabilidad vascular e hipersecreción mucosa. (Anónimo, Tachykinin receptors, 2007; Pennefathera y col. 2004).

En los mamíferos existen 3 tipos de taquicininas incluyendo la sustancia P, neurocinina A y neurocinina B. Además 3 receptores a estas neurocininas han sido caracterizados tanto farmacológicamente como genéticamente: los cuales son NK₁, NK₂ y NK₃. Estos son receptores acoplados a proteínas G_{q/11} por lo que aumentan las concentraciones intracelulares del trifosfato de inositol y diacilglicerol. Estos receptores presentan diferentes efectos biológicos, incluyendo contracción del músculo liso, neurotransmisión en el sistema nervioso central y periférico, que es generalmente de tipo excitatorio, respuestas inflamatorias e inmunes, hipotensión, así como la estimulación de la secreción de glándulas endocrinas y exocrinas (Anónimo, Tachykinin receptors, 2007; Severini y col. 2002).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En un trabajo previo usando el modelo *in vivo* de intoxicación por organofosforados encontramos que los cobayos con una broncoobstrucción en proceso inducida por paratión respondió a la administración de salbutamol con una broncodilatación transitoria, que fue seguida por el regreso de la broncoobstrucción (Segura y col. 1999). Estos resultados nos permitieron especular que la administración de salbutamol desencadena otros mecanismos obstructivos adicionales que rápidamente contrarrestan su efecto relajador. Al respecto, algunos estudios han demostrado que el salbutamol puede facilitar la liberación de neurotransmisores como la ACh de nervios parasimpáticos, a través de la estimulación presináptica de los adrenoreceptores β_2 (De Haas y col. 1999; Zhang y col. 1995; 1998; 1999). Este efecto podría explicar bien la obstrucción de las vías aéreas inducida por el uso de salbutamol, y en el presente trabajo esta hipótesis y la exploración de otros probables mecanismos en el efecto paradójico del salbutamol fueron estudiados.

HIPOTESIS

1. La administración de salbutamol induce una recontracción paradójica subsiguiente a su efecto relajador.
2. El tratamiento con aminofilina o forskolina inducen solo relajación del tejido sin la subsiguiente recontracción que produce el salbutamol.
3. La recontracción del músculo liso de las vías aéreas esta relacionada con la liberación neuronal de neurotransmisores.

OBJETIVO GENERAL

Identificar los mecanismos involucrados en el efecto paradójico del salbutamol en un modelo de intoxicación aguda inducida por paratión en cobayos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Demostrar que la administración de paratión en cobayos tanto *in vivo* como *in vitro* genera broncoobstrucción y contracción del músculo liso de las vías aéreas y que es revertida parcialmente por salbutamol.
2. Determinar si el uso de otro broncodilatador convencional en la obstrucción de las vías aéreas inducida por paratión tiene un patrón de comportamiento similar al del salbutamol.
3. Demostrar y cuantificar si el paraoxón induce la liberación de neurotransmisores como la ACh y la sustancia P de los anillos traqueales de cobayo.
4. Evaluar el papel del antagonismo funcional entre los receptores β_2 y M_2 involucrados en el efecto contráctil del paraoxón sobre el músculo liso de las vías aéreas.

MATERIAL Y METODOS

Diseño experimental

Para este trabajo se emplearon cobayos machos de la raza Hartley con un peso corporal promedio de 500-600 g y mantenidos en condiciones convencionales de bioterio (aire filtrado, 21 °C, 70% humedad) y con alimentación *ad libitum*.

Con el propósito de determinar los diferentes mecanismos obstructivos que pudieran estar participando en el efecto paradójico del salbutamol en respuesta al paratión, paraoxón o fisostigmina, se realizaron experimentos en su mayoría utilizando la técnica de órganos aislados (anillos traqueales) o la pletismografía barométrica para animales en libre movimiento.

El diseño de todos los experimentos realizados para este trabajo han sido resumidos en la Tabla 1 incluyendo los fármacos utilizados así como el número de animales por cada grupo.

Experimentos *in vivo*: Pletismografía barométrica:

Análisis de la función respiratoria

Cada uno de los cobayos fue introducido en un pletismógrafo barométrico de cámara única para animales en libre movimiento (Buxco Electronics, Inc. EUA) en el cual el animal recibe un flujo de aire continuo (10 ml/seg) que no interfiere con el registro de la función pulmonar, así como la opción de beber agua *ad libitum* (Fig.3)

Este sistema de pletismografía barométrica está basado en la medición directa de las fluctuaciones de presión que se generan dentro de la cámara y ha sido previamente descrito en extenso (Drorbaugh y col. 1955; Epstein y col. 1978; Hamelmann y col. 1997).

TABLA 1. Diseño experimental

Experimentos		Experimentos	
<i>in vivo</i>	n	<i>in vitro</i>	n
Pt	7	Pox*	11
Pt—Sal	7	Atr—Pox	5
Pt—Ami	7	TTX—Pox *	5
		ω -CTX—Pox *	4
		Pox—Sal	22
		Pox—For	7
		Pox—Pro—Sal	6
		Pox—Met—Sal	8
		Pox—AF—Sal	6
		L-732—Pox—Sal	11
		Fiso	9
		Fiso—Sal	9
		Fiso—For	5
		CCh	8
		CCh—Sal	8
		CCh—Sal—Met	7

AF=AF-DX 116, Ami=aminofilina, Atr=atropina, CCh=carbacol, For=forskolina, L-732=L-732,138, Fiso=fisostigmina, Pox=paraoxón, Pro=propranolol, Pt=paratión, Sal=salbutamol, TTX=tetrodotoxina, ω -CTX= ω -conotoxina GVIA, Met=metocramina. *=También se realizó una serie de experimentos sin epitelio (n=5 para cada grupo).



Fig.3. Sistema de pletismografía para animales en libre movimiento

En resumen, la presión dentro de la cámara es medida por medio de un transductor de presión diferencial (SenSym, Mod. SX05, EUA) conectado a un preamplificador. Debido a que el aire es calentado y humidificado en los pulmones, durante la fase inspiratoria el volumen de aire dentro del tórax es mayor que al mismo volumen de aire previo a la inspiración del animal que esta dentro de la cámara. Este volumen mayor de aire dentro del tórax produce un incremento en la presión dentro de la cámara. Así, aunque el transductor no mide directamente los flujos tanto inspiratorios como espiratorios, sí detecta los cambios de presión dentro de la cámara causados por el calentamiento y la humidificación del aire inhalado por el animal (Lundblad y col. 2002; Bazán-Perkins y col. 2004). Esta señal de presión fue analizada y procesada continuamente a través de un programa especial para el manejo automatizado de los datos evaluados en cada experimento (Buxco BioSystem XA, v1.1). Mediante este programa de computadora se obtienen entre otros parámetros, el índice llamado “Penh” (*enhanced pause*, por sus siglas en inglés), que refleja el grado de obstrucción de las

vías aéreas (Fig.4). Este índice fue obtenido con la siguiente ecuación (Hamelmann y col. 1997):

$$\text{Penh} = \left[\frac{\text{Te} - \text{Rt}}{\text{Rt}} \right] \left(\frac{\text{PEP}}{\text{PIP}} \right)$$

donde Te es el tiempo espiratorio (seg), Rt es el tiempo de relajación (seg), PEP es la presión del pico espiratorio (cmH₂O) y PIP es la presión del pico inspiratorio (cmH₂O).

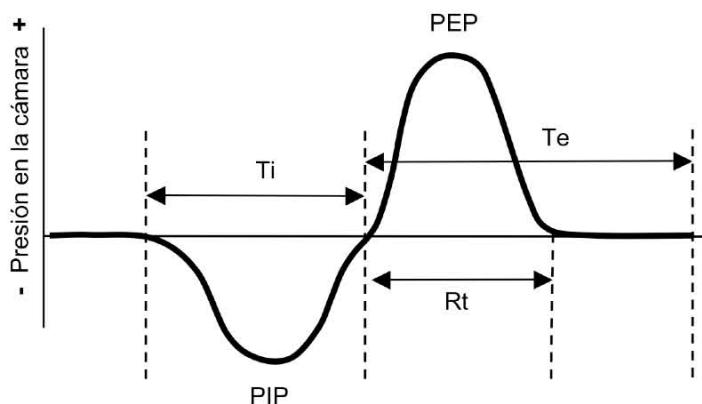


Fig.4. Esquema de un ciclo respiratorio mostrando los parámetros relacionados en la medición del Penh, donde: Ti= tiempo inspiratorio, Te= tiempo espiratorio, PEP= presión espiratoria máxima, PIP= presión inspiratoria máxima, RT= tiempo de relajación. El RT es medido como el porcentaje de volumen corriente que esta en constante recambio.

En estudios previos se ha encontrado que este Penh puede ser empleado para caracterizar las respuestas obstructivas de las vías aéreas ante un estímulo antigénico en cobayos inmunizados (Chand y col. 1993), además que se ha demostrado que este índice correlaciona con la resistencia pulmonar total (iR_L) en ratones BALB/c (Adler y col. 2004; Hamelmann y col. 1997) y con la resistencia específica de las vías aéreas en cobayos (Bergren, 2001; Chong y col. 1998).

El programa de la computadora que registra la señal que proviene del pletismógrafo fue ajustado para que se incluyeran en el análisis solamente las respiraciones con un volumen corriente de 1 ml, tiempo mínimo inspiratorio de 0.15

seg, tiempo máximo inspiratorio de 3 seg y una diferencia máxima entre el volumen inspiratorio y espiratorio del 10%. Se rechazan de 20 a 30% de las respiraciones de cada intervalo de tiempo que corresponden a los movimientos voluntarios del animal.

Debido a que este índice es calculado por el programa en cada respiración, el programa se ajustó para que promediara el valor de todas las respiraciones registradas en un periodo de 15 seg. Los valores evaluados en el presente trabajo fueron obtenidos del promedio de los últimos 5 min de cada periodo de registro (10 min).

Administración de paratión

Antes de la administración del paratión cada uno de los animales fue colocado dentro de la cámara de pletismógrafo y después de un periodo de habituación de 5 min se determinó el valor basal de todos los parámetros respiratorios, incluyendo el Penh durante 5 min. El paratión (10 mg/kg) o su solvente (propilenglicol-etanol, 10:1.15 v/v) fueron administrados i.p. aproximadamente 20 min después del registro basal en dosis única a cada uno de los animales. El volumen total de la mezcla paratión-solvente inyectada i.p. a cada uno de los animales nunca fue mayor de 0.25 ml. Los parámetros respiratorios fueron registrados y almacenados a los 5 y 10 min, y a partir de este punto en intervalos de 10 min durante lo que duró el registro.

Debido a que el paratión es una sustancia altamente tóxica la dosis de paratión fue seleccionada cuidadosamente basándonos en estudios previos (Chávez, 1996; Segura y col. 1999) y en nuevos experimentos, con el objetivo de solo tener el efecto deseado sobre la vía aérea del cobayo, sin tener los efectos neurológicos característicos de una intoxicación por organofosforados.

Con la intención de evaluar si la contracción del músculo liso de las vías aéreas es un componente de la toxicidad pulmonar generada por la administración de paratión, se realizaron experimentos evaluando el efecto de dos broncodilatadores comunes, el salbutamol (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) y la aminofilina (40 mg/kg , i.p.) durante la respuesta obstructiva máxima de las vías aéreas inducida por paratión, mientras que los animales controles únicamente se les administró solución salina i.p. Tanto la dosis de salbutamol como de aminofilina corresponden a la dosis terapéutica usada en humanos y fueron cada una administradas 90 min posteriores a la administración del paratión.

Experimentos en órganos aislados

Estudios funcionales

Para estos experimentos los cobayos fueron sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital sódico i.p., se les extrajo la tráquea y a ésta se le eliminó el exceso de tejido conjuntivo adyacente bajo microscopio estereoscópico. Posteriormente, de la porción media de la tráquea se obtuvieron cuatro anillos, los cuales fueron destinados a diferentes condiciones experimentales.

Cada uno de los anillos traqueales obtenidos fueron colocados en una cámara individual de órganos aislados conteniendo 5 ml de solución Krebs bicarbonatada con la siguiente composición (mM): NaCl 120, NaHCO_3 25, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1.2, CaCl_2 2.5 y glucosa 11. Se mantuvieron a una temperatura de 37 °C, un burbujeo constante de 95% O_2 y 5% CO_2 para mantener el pH de 7.4 todo el tiempo del experimento (Carbajal y col. 2005). Cada uno de los anillos traqueales fue atado a un transductor de tensión isométrica (Modelo FT03, Grass Instruments, Rhode Island, EUA) conectado a un amplificador (Cyberamp 380, Axon Instruments, California, EUA)

y que a su vez estaba conectado a un convertidor analógico digital (Digidata 1322A, Axon Instruments). La tensión generada fue registrada, almacenada y analizada en una computadora mediante el programa Axoscope v.9.0 (Axon Instruments). Las preparaciones se mantuvieron en reposo durante aproximadamente 1 h a una tensión de 1 g antes de iniciar los diferentes protocolos experimentales. Con el propósito de normalizar las respuestas de los tejidos, éstos se estimularon tres veces con KCl (60 mM) durante 20 min o hasta alcanzar la respuesta máxima de contracción; posteriormente se les añadió paraoxón o fisostigmina (10 μ M) a cada uno. Las respuestas de contracción al paraoxón o a la fisostigmina fueron expresadas como el porcentaje de respuesta al tercer estímulo de KCl.

Se confirmó que a estas concentraciones tanto de paraoxón como fisostigmina generaban respuestas contráctiles similares (91.9 ± 9.4 vs $89.3 \pm 3.3\%$ de la contracción por KCl, respectivamente, $p=0.83$). En algunos experimentos, los anillos traqueales fueron incubados durante 15 min, previos a la adición de paraoxón, con 10 μ M de TTX, 0.32 μ M de ω -CTX o 1 μ M de atropina.

Otra serie de experimentos utilizando igualmente anillos traqueales fueron realizados utilizando salbutamol (0.1 μ M, agonista adrenérgico β_2 selectivo) o forskolina (1 mM, fármaco que activa a la adenilato-ciclasa) con el fin de evaluar sus efectos relajadores del músculo liso de las vías aéreas durante la contracción máxima inducida por paraoxón o fisostigmina.

Con el idea de evaluar la participación de los receptores adrenérgicos β_2 y muscarínicos M_2 en el efecto del salbutamol, los anillos traqueales se incubaron durante 15 min con diferentes bloqueadores de los receptores previo a la adición de

salbutamol. Se usó propranolol ($10 \mu\text{M}$) para bloquear los receptores β y metoctramina ($0.31 \mu\text{M}$) o AF-DX 116 ($0.1 \mu\text{M}$) para los receptores M_2 . Con estos experimentos se confirmó que a estas concentraciones dichos bloqueadores no modifican el comportamiento previamente visto de la contracción del músculo liso de los anillos traqueales inducido por paraoxón. De igual modo, se evaluó la posible participación de la sustancia P en el efecto del salbutamol usando el compuesto L-732,138 (10 nM) que es un antagonista de los receptores NK_1 (Lewis y col. 1995), el cual fue adicionado a las cámaras de órganos aislados 15 min antes del paraoxón. También confirmamos que a esta concentración, este antagonista no modificó la respuesta de contracción inducida por el paraoxón.

Con el propósito de determinar si el efecto del salbutamol era el mismo durante la contracción inducida por el paraoxón que durante una típica respuesta de contracción colinérgica, se realizaron una serie de experimentos en anillos traqueales utilizando $0.32 \mu\text{M}$ de carbacol (CCh) en lugar de paraoxón para inducir la contracción del músculo liso de las vías aéreas. Finalmente, y para demostrar un posible antagonismo funcional entre los receptores β_2 y M_2 (Buckner y col. 1975; Fernandes y col. 1992), en tráqueas contraídas con $0.32 \mu\text{M}$ de CCh se les añadió metoctramina después de una dosis menor de salbutamol ($0.032 \mu\text{M}$).

Para evaluar la participación del epitelio de las vías aéreas en la respuesta inducida por paraoxón, en lugar de los anillos traqueales, se disecaron tiras de músculo liso de tráquea de cobayo, eliminando la capa epitelial y la de tejido conectivo bajo un microscopio estereoscópico. Estas tiras de músculo liso fueron estimuladas con $10 \mu\text{M}$ de paraoxón incubadas o no con $10 \mu\text{M}$ de TTX.

Se realizaron otra serie de experimentos donde el objetivo fue recuperar el líquido contenido en las cámaras de órganos aislados para la cuantificación de las concentraciones de sustancia P. Para ello, cada uno de los anillos traqueales fue incubado con paraoxón (10 μM) durante 1 h, con o sin la adición de salbutamol (0.1 μM) en los últimos 30 min de este periodo. Después, este líquido fue recuperado cuidadosamente, almacenado y mantenido en tubos a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Cada uno de estos experimentos fueron realizados en presencia de fosforamidón (3.2 μM , un inhibidor de la endopeptidasa neutra, enzima encargada de degradar a la sustancia P).

El mismo procedimiento técnico fue empleado con las muestras para la cuantificación de ACh, solo que para estos experimentos se utilizó fisostigmina (10 μM) en lugar de paraoxón, ya que este último daña irreparablemente la columna analítica utilizada por el sistema de HPLC para las mediciones de ACh y colina (Ch). En estos experimentos se emplearon 3 diferentes concentraciones de salbutamol por separado (1, 10 ó 100 nM).

Determinación de la actividad de la AChE pulmonar

La actividad de la AChE se determinó en muestras de lóbulos pulmonares y plasma sanguíneo de cobayos usando un método colorimétrico basado en la reacción de Ellman (Ellman y col. 1961) y fue expresada como porcentaje de inhibición. Esta técnica consistió en homogenar tejido pulmonar en una solución amortiguador de fosfatos (1 ml de amortiguador fosfato por cada 0.1 g de tejido pulmonar) utilizando un homogenizador de aspas (Brinkmann Polytron Kinematica PT3100, Westbury, NY). El homogenado se centrifugó durante 15 min a 3000 g, posteriormente el sobrenadante

fue filtrado (filtros de PTFE, 22 μm), y 300 μl de este sobrenadante fueron añadidos a una cubeta conteniendo 2.5 ml de ácido ditiobisnitrobenzoico (DTNB 0.32 mM), 300 μl de amortiguador de fosfatos Tris-HCl (64 mM) a un pH de 7.4. La probabilidad de unión del DTNB con algún otro sustrato sulfhídrico presente en la muestra fue cuantificada en la muestra sin sustrato, usando un espectrofotómetro (Beckman DU-640, Fullerton, CA) a una longitud de onda de 405 nm y una temperatura constante de 25 $^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, 100 μl de sustrato para la AChE (42 mM de acetiltiocolina) fueron añadidos en la cubeta y el cambio en la absorbancia por minuto emitido de la actividad enzimática colinérgica específica fue medido. La absorbancia de base se restó del valor obtenido a fin de expresar la actividad de la AChE en unidades internacionales (UI, correspondientes a las moles de sustrato hidrolizado/min/mg de tejido) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad de la AChE (UI)} = \frac{A \cdot 3200}{1.36 \times 10^4 \times 300 \times C_o}$$

donde A es el cambio de absorbancia / minuto; 1.36×10^4 es el coeficiente de extinción del DTNB; C_o es la cantidad de tejido en el sobrenadante (mg de tejido / ml de amortiguador); 3200 corresponde al volumen total (μl) de la cubeta, y 300 representa el volumen (μl) de sobrenadante añadido.

En relación al plasma sanguíneo, de cada muestra se hizo una dilución 1:25 con el amortiguador de fosfato y 100 μl fueron añadidos a la cubeta conteniendo 2.5 ml de DNTB y 500 ml de amortiguador de fosfatos. Los pasos restantes fueron los mismos como los que se describieron para los homogenados de pulmón. Uno de los valores de

la fórmula fue cambiado (100 μ l de muestra en lugar de 300 μ l, y las UI corresponden a las moles de sustrato hidrolizado/min/ml de plasma).

Cuantificación de ACh mediante cromatografía líquida de alta presión

Las concentraciones de ACh en las muestras de líquido obtenido de los órganos aislados fueron medidas mediante el método de cromatografía líquida de alta presión (HPLC, *High Pressure Liquid Chromatography*, por sus siglas en inglés) usando una columna de intercambio iónico acoplada a un detector electroquímico descrito con anterioridad y utilizado ampliamente (Potter y col. 1983).

En esta técnica se emplearon una columna analítica (MF-6150; Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN) que separa ACh y Ch mediante fuerzas iónicas, y una columna de reacción o también llamada reactor que tiene en su interior las enzimas AChE (encargada de hidrolizar la ACh en Ch y acetato) y colina-oxidasa (encargada de romper la Ch en betaína y peróxido de hidrógeno, H_2O_2), unidas covalentemente a las partículas microscópicas de un polímero que se utiliza para empacar ambas columnas (IMER, *Immobilized Enzyme Reactor*, por sus siglas en inglés; Bioanalytical System). Ambas columnas están conectadas entre sí en serie a un detector electroquímico (Coulchem II, ESA Inc, Chelmsford, MA). Todo esto se acopló al HPLC (modelo 9012, Varian Co, Walnut Creek, CA). Se empleó una fase líquida o también llamada fase móvil conteniendo 50 mM Tris/ $NaClO_4$ en presencia de 1% del reactivo de Proclin[®], con un pH de 8.5 ajustado con HCl. Esta fase móvil fue bombeada a un flujo de 1 ml/min a través de todo el sistema acoplado.

El uso de estas enzimas y los reactivos para hacer la fase móvil han sido utilizados desde hace más de 3 décadas para ACh y Ch. Estas dos sustancias

neuroquímicas no son ni electroactivas ni absorben luz-UV bajo ninguna condición experimental, sin embargo, las reacciones catalizadas por las enzimas que se han empleado para esta técnica inducen la formación de H_2O_2 como último derivado del metabolismo de la ACh y Ch, compuesto que ya posee propiedades de óxido-reducción. La conversión a H_2O_2 se lleva a cabo en pocos minutos en la unidad IMER y es detectado a un potencial de +0.5 mV vs Ag/AgCl usando un electrodo de platino, localizado en la celda analítica (ESA, Inc. Analytical Cell, Mod 5040, Chelmsford, MA) localizada al final de la línea del HPLC, donde se lleva a cabo la cuantificación del H_2O_2 .

Para determinar las concentraciones de ACh y Ch en cada una de las muestras experimentales se realizó previamente una curva de referencia o control, tanto de ACh como de Ch, a concentraciones de 1 a 100 nM. El límite mínimo de nuestro sistema para la detección fue alrededor de 100 pM en 15 μ l de muestra. Cada uno de los cromatogramas generados por el HPLC fueron almacenados y analizados en una computadora provista de un programa especializado para la adquisición y análisis de datos (Star Chromatography Workstation v.4.01, Varian Co.). La producción de ACh en cada una de las muestras experimentales se consideró como la suma de ACh más la de Ch, expresada en nmol/L.

Cuantificación de la sustancia P liberada de los anillos traqueales mediante inmunoensayo

La concentración de sustancia P fue determinada mediante un inmunoensayo enzimático competitivo (Cayman Chem. Ann Arbor, MI). Este ensayo se basa en la competición entre la sustancia P libre (sustancia P en las muestras) y un conjugado de

sustancia P-acetilcolinesterasa (sustancia P conjugada) por un número limitado de sitios de unión de antisuero de conejo específico para sustancia P. Debido a que la concentración de la sustancia P conjugada permanece constante y la concentración de sustancia P libre varía, la cantidad de sustancia P conjugada que es capaz de unirse al antisuero de conejo es inversamente proporcional a la concentración de sustancia P libre en cada pozo. Este complejo de antisuero contra la sustancia P, ya sea libre o conjugada, se une a la IgG monoclonal anticonejo que ha sido previamente adherida a cada pozo. Al final de la incubación, la placa es lavada para remover cualquier reactivo que no se haya unido y posteriormente se le adiciona el reactivo Ellman's que contiene el sustrato para AChE. El producto de esta reacción enzimática tiene distintos tonos de amarillo y absorben luz a los 412 nm. La intensidad del color determinada por el espectrofotómetro (Multiskan MS photometer, Labsystems Oy, Helsinki, Finlandia) es proporcional a la cantidad de sustancia P conjugada unida al pozo, que es inversamente proporcional a la cantidad de sustancia P libre en los pozos durante la incubación. El rango de detección para este ensayo fue de 3.9 a 500 pg/ml.

Medición de $[Ca^{2+}]_i$ en células de músculo liso traqueal de cobayo

Disgregación y procedimiento para los registros de microfluorometría

Tiras de músculo liso de tráqueas de cobayos fueron obtenidas como se describió anteriormente y colocadas en 5 ml de solución Hank's (GIBCO, New York, EUA) que contenía 2 mg de cisteína y 0.05 U/ml de papaína, donde se incubaron durante 10 min a 37 °C. Posteriormente el tejido fue lavado con una solución de Leibovitz (GIBCO, New York, EUA) para remover el exceso de enzima y después se colocó en una solución de Krebs que contenía 1 mg/ml de colagenasa tipo I y 4 mg/ml de dispasa tipo

II, que es una proteasa neutra, durante aproximadamente 10 min a 37 °C, y bajo agitación mecánica hasta que las células se observaron disgregadas. La actividad enzimática fue detenida completamente adicionando solución de Leibovitz fresca y las células disgregadas se centrifugaron a 600 rpm durante 5 min desechando el sobrenadante. Este último procedimiento se repitió una vez más. Una vez disgregadas las células fueron incubadas con 0.5 μ M de fura 2/AM en concentraciones bajas de Ca^{2+} (0.1 mM) a temperatura ambiental (22-25 °C).

Las células disociadas del músculo liso traqueal de cobayo que se incubaron con fura 2/AM fueron colocadas en una cámara de perfusión durante 1 h con el propósito de facilitar que las células se adhirieran a la base de la cámara que tenía un cubre objetos de vidrio en su base. Posteriormente esta cámara fue colocada sobre un microscopio invertido (Diaphot 200, Nikon, Tokio, Japón) y las células adheridas al vidrio fueron perfundidas continuamente a un flujo entre 2 y 2.5 ml/min con una solución Krebs conteniendo (mM) NaCl 118, KCl 4.6, CaCl_2 2.0, MgSO_4 1.2, NaHCO_3 1.2, KH_2PO_4 1.2, glucosa 11, a 37 °C, y pH 7.4 y burbujeado con una mezcla de 5% de CO_2 y 95% de O_2 .

El fura 2 presente en las células musculares lisas se excitó alternadamente con un haz de luz con dos longitudes de onda de excitación que corresponden a 340 y 380 nm, y la luz emitida fue colectada a 510 nm usando un microflurómetro (Photon Technology Internacional, Modelo D-104, Princeton, NJ). La fluorescencia basal fue determinada removiendo cualquier célula que se encontrara en el campo óptico del microscopio por donde pasa el haz de luz, y durante los experimentos fue sustraída automáticamente por el programa. La concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) se calculó de acuerdo a la fórmula de Grynkiewicz y col. (1985):

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \beta \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R}$$

donde: K_d corresponde a la constante de disociación del fura 2, que se consideró de 386 nM (Kajita y col. 1993); β corresponde al cociente de fluorescencia observada a 380 nm en ausencia de Ca^{2+} / presencia de Ca^{2+} saturante que tuvo un valor promedio de 4.9; R_{max} y R_{min} corresponden a los cocientes de fluorescencia 340/380 mínimo y máximo respectivamente, que se obtuvieron en ausencia de Ca^{2+} + EGTA (1.11 mM) y en presencia de Ca^{2+} saturante (10 mM) + ionomicina (10 μ M) en la solución Krebs, respectivamente. El promedio de R_{max} fue de 8.99 y el de R_{min} fue de 0.35. Los registros obtenidos fueron almacenados en una computadora y analizados usando un programa de análisis y adquisición de datos (Felix v. 1.2.1, Photon Technology Internacional).

Para evaluar si el paraoxón tenía efecto directo sobre los miocitos, se estimularon primero con una perfusión de Krebs conteniendo 10 μ M de CCh durante 2 min, esto con la finalidad de corroborar la viabilidad de las células con un estímulo colinérgico, después se recambio el Krebs y se perfundió durante 15 min. Pasado este tiempo, los miocitos fueron estimulados con 10 μ M de paraoxón contenidos en el líquido de perfusión durante 5 min, pasados 3 min y sin retirar este estímulo, se perfundió 10 μ M de CCh manteniendo estos dos estímulos hasta el final de los 5 min de registro.

Fármacos

El paratión (Pestanal[®] O,O-dietil O-4-nitrofenil fosforotioato) y el paraoxón (O,O-dietil O-4-nitrofenil fosfato) fueron adquiridos de Riedel-de Haën, Alemania, y disueltos en propilenglicol-etanol (10:1.5 v/v). El hemisulfato de fisostigmina, el cloruro de acetilcolina, el cloruro de carbamilcolina (carbacol), el hidrocloreto de propranolol, la tetrodotoxina, la ω -conotoxina, el cloruro de colina, el salbutamol y la forskolina fueron adquiridos de Sigma Chem. Co. (St Louis, MO). El tetrahidrocloreto de metocramina fue adquirido de ICN Pharmaceuticals Inc. (Costa Mesa, CA). El AF-DX 116 fue adquirido de Tocris Bioscience (Bristol, UK). El L-732,138 fue adquirido de Biomol Research Laboratories Inc. (Plymouth Meeting, PA). El sulfato de salbutamol (Ventolin[®]) fue adquirido de Glaxo-Wellcome, México y la aminofilina (Aminofilin[®]) fue adquirido a Laboratorios Pisa S.A, Guadalajara, México. La forskolina y el AF-DX 116 fueron disueltos en dimetilsulfóxido y el L-732,138 en etanol, mientras que los otros fármacos fueron disueltos en agua.

Análisis estadístico

Para la mayoría de los datos de este trabajo se utilizó análisis de varianza (ANOVA) de una vía o mediciones repetidas, seguido de la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples de medias o la prueba de Dunnett. Las concentraciones de sustancia P fueron analizadas utilizando la prueba U de Mann-Whitney.

La significancia estadística se fijó en $p < 0.05$ bimarginal, usando el programa estadístico GraphPad InStat v3.05. Los resultados tanto en el texto como en las figuras son expresados como promedio \pm error estándar, excepto las concentraciones de sustancia P, las cuales fueron expresadas como la mediana y rango.

RESULTADOS

Experimentos in vivo

En este trabajo corroboramos que la dosis de 10 mg/kg de paratión utilizada en nuestros experimentos *in vivo* generó 90 min posteriores a su administración, la inhibición casi total de la actividad de la AChE pulmonar ($97.8 \pm 0.8\%$), así como la plasmática ($67.4 \pm 4.9\%$) (n=5 para cada grupo experimental, Fig.5).

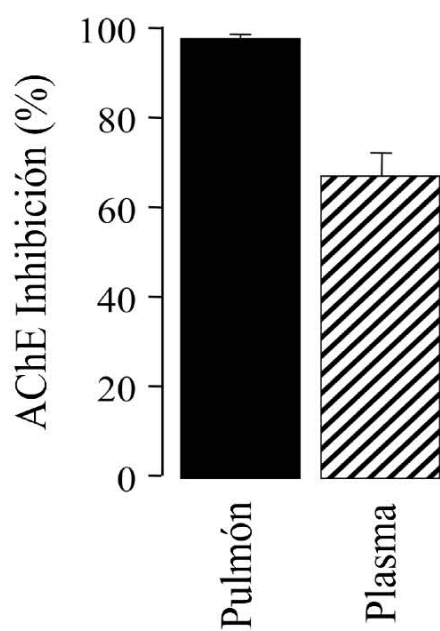


Fig.5. Inhibición de la actividad de la AChE por paratión en cobayos. La actividad de AChE en homogenados de pulmón y plasma fueron medidos 90 min después de la administración intraperitoneal de paratión (10 mg/kg) y expresado como el porcentaje de inhibición de la actividad de AChE con respecto a la observada en homogenados de pulmón [1.00 ± 0.06 unidades internacionales (UI)] y en plasma (3.13 ± 0.25 UI) de animales control, respectivamente.

Efecto del paratión en el músculo liso de las vías aéreas

La administración i.p. de la dosis única de paratión (10 mg/kg) en los cobayos machos no causó ninguna alteración visible en su comportamiento habitual durante el tiempo del estudio (2 h), sin embargo, si se modificó su función respiratoria como ya se había demostrado previamente (Chávez, 1996; Segura y col. 1999).

La administración i.p. de paratión en el grupo control de cobayos machos (Fig.6. n=7), causó un incremento progresivo en los valores basales del Penh a partir de los

30-40 min, registrándose hasta un 250% de incremento, siendo este cambio de 0.213 ± 0.010 a 0.566 ± 0.080 , el cual persistió con la misma intensidad hasta el final del estudio (2 h).

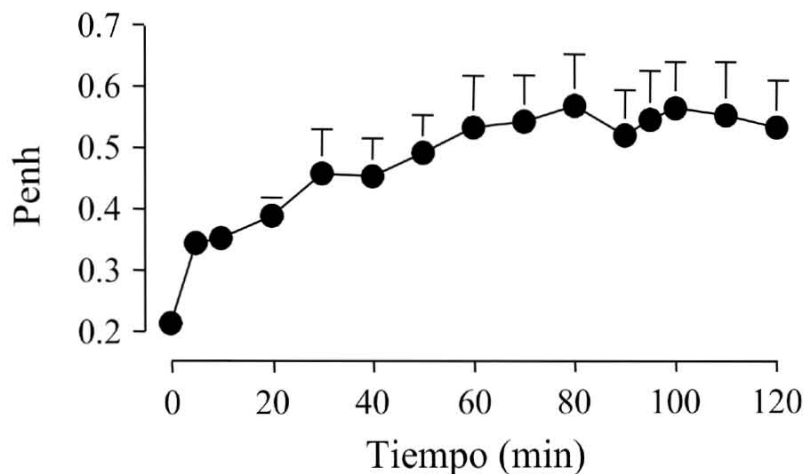


Fig.6. Efecto del paratión en experimentos in vivo. El paratión (10 mg/kg i.p.) induce un incremento progresivo en el valor del Penh en cobayos machos y permanece relativamente sin cambios hasta el final del periodo de registro. Los símbolos representan el promedio \pm error estándar.

El salbutamol (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p.), 5 min después de su administración, generó un decremento significativo del 31% ($p < 0.05$) de la broncoobstrucción producida por la administración i.p. de 10 mg/kg de paratión (Fig.7). Después de esta broncodilatación transitoria, el valor de Penh se incrementó de nuevo progresivamente hasta alcanzar los valores previos a la administración i.p. del salbutamol. Se evaluó una dosis más alta de salbutamol (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) la cual también produjo esta paradójica reconstricción, aun cuando se retrasó en el tiempo (datos no mostrados). En contraste, la aminofilina produjo un decremento progresivo ($p < 0.05$ y $p < 0.01$) de la broncoobstrucción inducida por paratión, alcanzando su máxima relajación a los 20 min (77% de decremento) y manteniéndose posteriormente sin cambio.

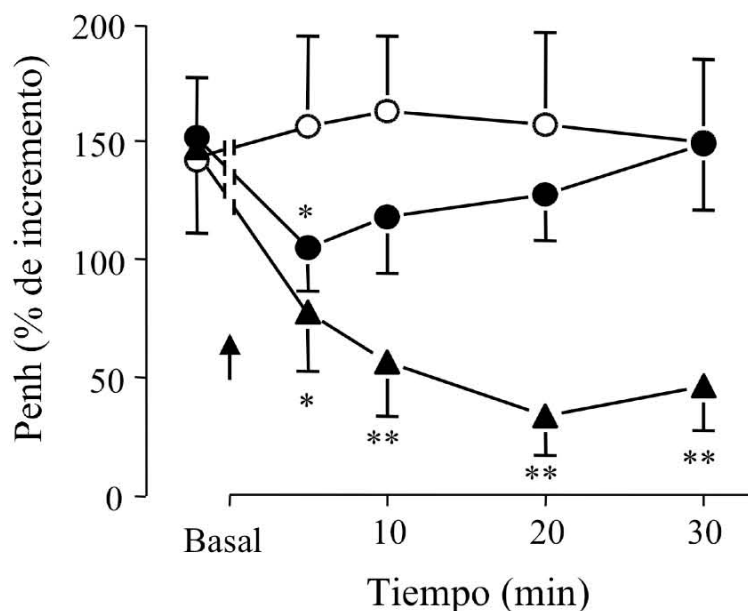


Fig.7. Efecto de los broncodilatadores en la broncostrucción inducida por paratión en cobayos sometidos a la pletismografía barométrica. La flecha indica la administración intraperitoneal de salbutamol (●, 10 μ g/kg), aminofilina (▲, 40 mg/kg), o solución salina (○, grupo control) durante la broncostrucción progresiva inducida por paratión (10 mg/kg). Los valores basales fueron obtenidos del promedio del valor del Penh durante los últimos 10 min antes de la administración de los broncodilatadores. Los símbolos representan el promedio \pm error estándar de 7 animales en cada grupo. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ comparado con su respectivo valor basal.

Experimentos in vitro

En homogenados de pulmón de cobayos corroboramos que el paraoxón y la fisostigmina causan (3 min después), la inhibición de la actividad de la AChE de manera concentración-dependiente (Fig.8), en especial a la concentración que usamos para este estudio (10 μ M) ya sea de paraoxón o fisostigmina, los cuales produjeron un $99.9 \pm 0.1\%$ la inhibición de la actividad de la AChE (n=4 para cada grupo).

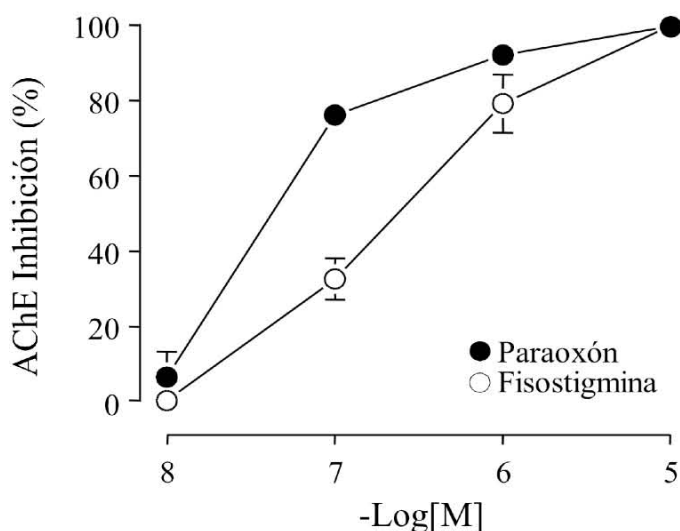


Fig.8. Inhibición de la actividad de la AChE por paraoxón y fisostigmina en cobayos. Curva no acumulativa concentración-respuesta in vitro a paraoxón y fisostigmina en la actividad de la AChE en homogenados de pulmón y expresado como el porcentaje de inhibición de su respectiva actividad de la AChE basal (1.00 ± 0.08 UI). Los datos y los símbolos corresponden al promedio \pm error estándar.

La adición de paraoxón a los tejidos evaluados con la técnica de órganos aislados produjo una contracción sostenida del músculo liso de los anillos traqueales del cobayo (Fig.9A). Sin embargo, esta respuesta no fue modificada por la incubación previa ni de ω -CTX o TTX (Fig.9B), pero fue prevenida y revertida en su totalidad mediante el uso de atropina (Fig.9C y 9D).

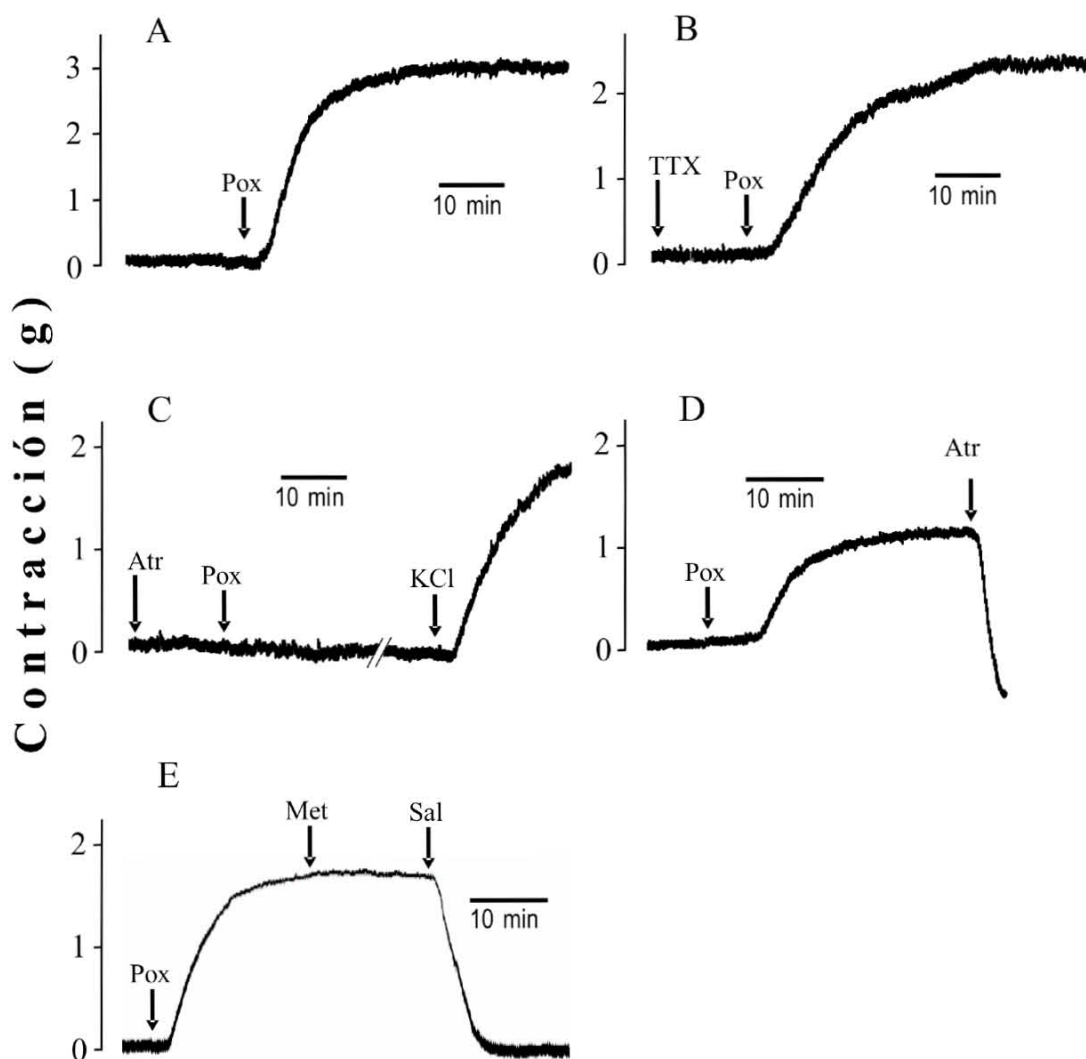


Fig.9. Registros originales representativos del efecto del paraoxón (Pox) en experimentos *in vitro*. El paraoxón produjo una contracción sostenida del músculo liso de los anillos traqueales de cobayo (A). Esta respuesta no fue modificada por la incubación previa con tetrodotoxina (TTX) (B), pero fue completamente bloqueada (C) y revertida (D) con atropina (Atr). La metoctramina (Met) no modificó la contracción inducida por paraoxón pero si potenció la relajación inducida por 0.1 μ M de salbutamol (Sal) (E). Pox (10 μ M); Atr (1 μ M); cloruro de potasio (KCl) (60 mM); Met (0.31 μ M); TTX (10 μ M).

En algunos experimentos corroboramos que a estas concentraciones de ω -CTX o TTX se previno o disminuyó, respectivamente, la respuesta contráctil del músculo liso de las vías aéreas inducida por una estimulación eléctrica de campo (datos no mostrados). También demostramos que la eliminación del epitelio de los anillos traqueales de cobayo no solamente no interfirió con el efecto contráctil del paraoxón, sino que además causó un incremento en la respuesta a este organofosforado, si se comparan las respuestas con los anillos traqueales del grupo control (190 ± 39.3 vs 102.1 ± 11.4 de la respuesta de contracción de KCl, respectivamente, $p < 0.02$). Este procedimiento experimental tampoco modificó la respuesta a la incubación previa de los anillos traqueales con TTX (188 ± 41.7 % de la respuesta de KCl).

La administración del salbutamol ($0.1 \mu\text{m}$) durante la contracción inducida por paraoxón, produjo una relajación temporal de aproximadamente el 50% (Fig.10 y 11) a los 10-20 min después de su administración. A partir de este tiempo, los tejidos empezaron a recontraerse sin llegar a alcanzar la contracción máxima inducida por la administración de paraoxón. Cuando se indujo la contracción de los tejidos con CCh, en lugar de paraoxón, se observó que el salbutamol producía el mismo fenómeno (Fig. 11).

También, corroboramos que esta relajación inducida por el salbutamol fue debido a la estimulación adrenérgica β , ya que cuando los tejidos fueron incubados con propranolol la respuesta de relajación del músculo inducida por salbutamol fue completamente prevenida (Fig.10).

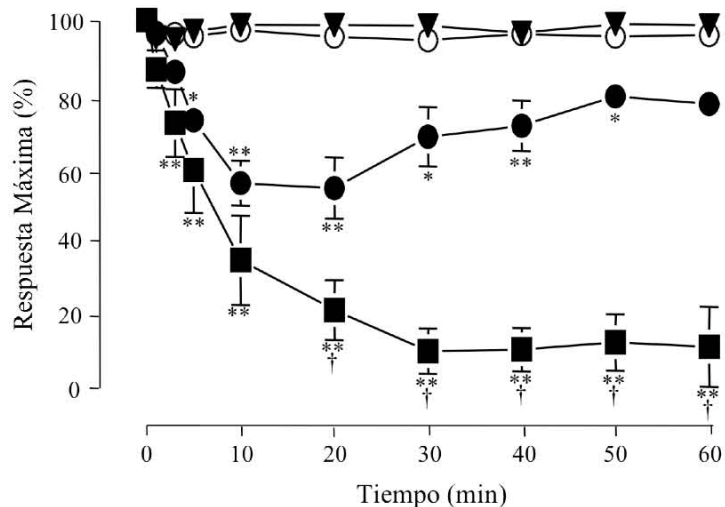


Fig.10. Efecto del antagonismo del receptor M_2 en la respuesta a salbutamol durante la contracción inducida por paraoxón en anillos traqueales. El paraoxón (O, 10 μ M, n=11) indujo una respuesta de contracción, que fue parcialmente revertida por salbutamol (●, 0.1 μ M, n=11) con tendencia a contraerse nuevamente a partir de los 10 min en adelante. La contracción paradójica que ocurría después de la relajación transitoria inducida por salbutamol fue completamente abolida por el antagonista del receptor M_2 la metocitramina (■, 0.31 μ M, n=8)

favoreciendo así la respuesta de relajación inducida por el salbutamol de ~90%. El propranolol (▼, 1 μ M, n=6) completamente abolió el efecto relajante del salbutamol. Los símbolos representan el promedio \pm error estándar. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ comparado con el grupo de paraoxón y † $P < 0.01$ comparado con el grupo paraoxón-salbutamol.

El uso de un antagonista de los receptores M_2 como la metocitramina no modificó la contracción inducida por el paraoxón (Fig.9E), pero si previno totalmente la contracción paradójica que ocurre después de la relajación transitoria inducida por el salbutamol, de tal modo que favoreció la persistencia de la respuesta relajadora cercana al 90% (Fig.10).

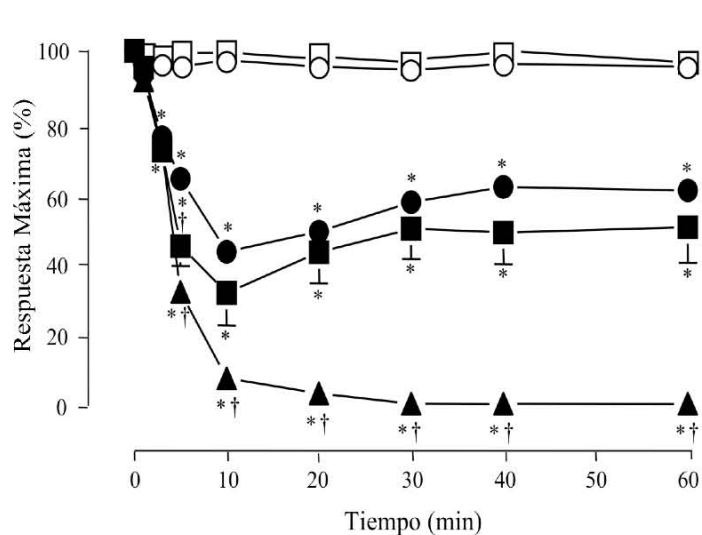
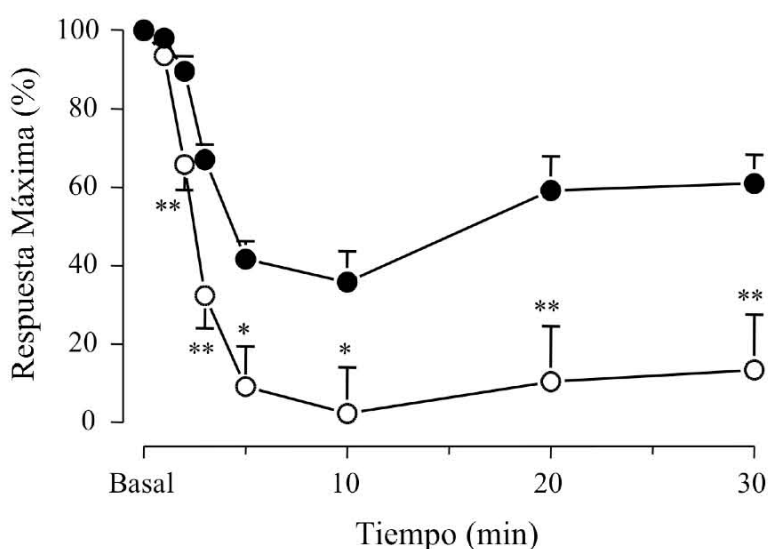


Fig.11. Efecto del salbutamol y la forskolina en la contracción inducida por paraoxón en anillos traqueales. El paraoxón (O, 10 μ M, n=11) indujo una respuesta de contracción, que fue parcialmente revertida por salbutamol (●, 0.1 μ M, n=11) con tendencia a recontraerse a partir de los 10 min. La forskolina (▲, 1 μ M, n=7) completamente abolió la contracción inducida por paraoxón. La contracción sostenida inducida por carbacol (□, 0.32 μ M, n=8) fue revertida moderadamente por salbutamol siguiendo un patrón similar al que fue observado en el grupo de paraoxón (■,

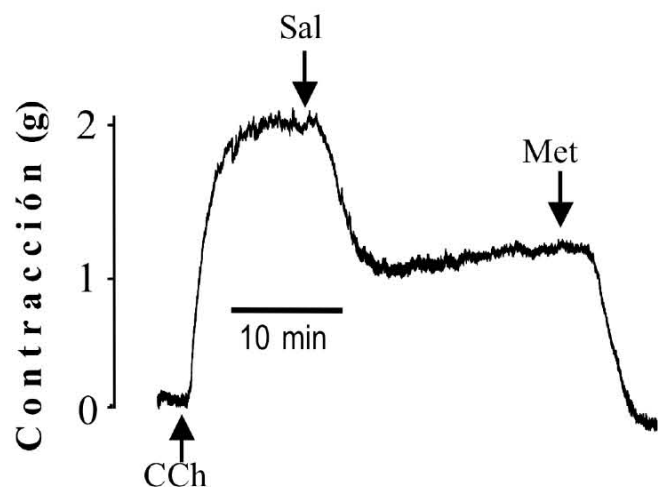
0.1 μ M n=11). Los símbolos representan el promedio \pm error estándar. * $P < 0.01$ comparado con su respectivo grupo control; † $P < 0.01$ comparado con el grupo paraoxón-salbutamol.

De igual modo, el uso de AF-DX 116, otro antagonista muscarínico M_2 , no afectó la contracción inducida por paraoxón generada en los anillos traqueales, pero sí permitió que el salbutamol indujera una completa relajación ($140 \pm 27.1\%$ de relajación, gráfica no mostrada). Adicionalmente, encontramos que tejidos incubados con L-732,138, un antagonista de los receptores NK_1 , permitió una relajación total de los anillos traqueales inducida por el salbutamol, eliminando por completo la reconstracción paradójica observada en el músculo liso de las vías aéreas (Fig.12). A diferencia del salbutamol, la forskolina completamente relajó la respuesta del paraoxón a los 10 min de su administración (Fig.11).



*Fig.12. Efecto del L-732,138, antagonista de los receptores NK_1 , en la respuesta de salbutamol durante la contracción inducida por paraoxón en anillos traqueales. La contracción paradójica que ocurre después de la relajación transitoria inducida por salbutamol (●, n=10) fue completamente abolida por el antagonista del receptor NK_1 (○, n=11) favoreciendo una respuesta de relajación completa. Los símbolos representan el promedio \pm error estándar. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ comparado con el grupo paraoxón-salbutamol.*

En este mismo contexto, durante una contracción colinérgica inducida por CCh una concentración menor de salbutamol ($0.032 \mu M$) indujo una relajación parcial, mientras que la metoctramina (añadida durante la meseta de la relajación) fue capaz de relajar completamente el músculo liso (Fig.13).



Algunos de estos resultados fueron reproducidos cuando se empleó la fisostigmina en lugar de paraoxón (Fig.14).

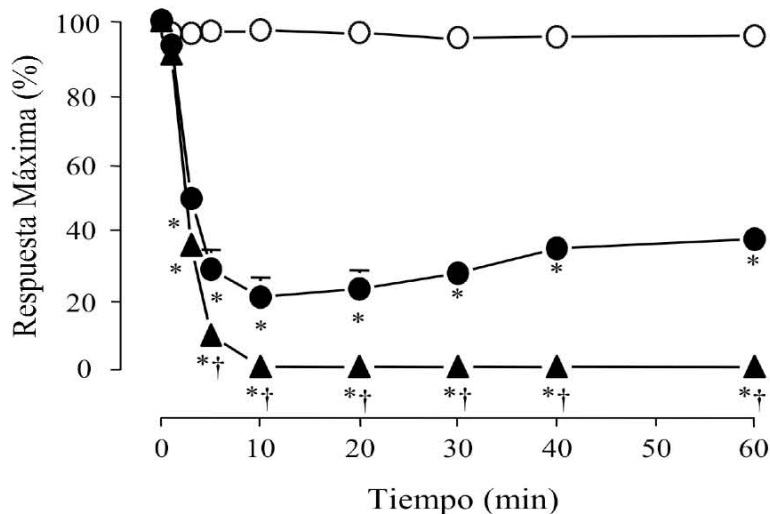
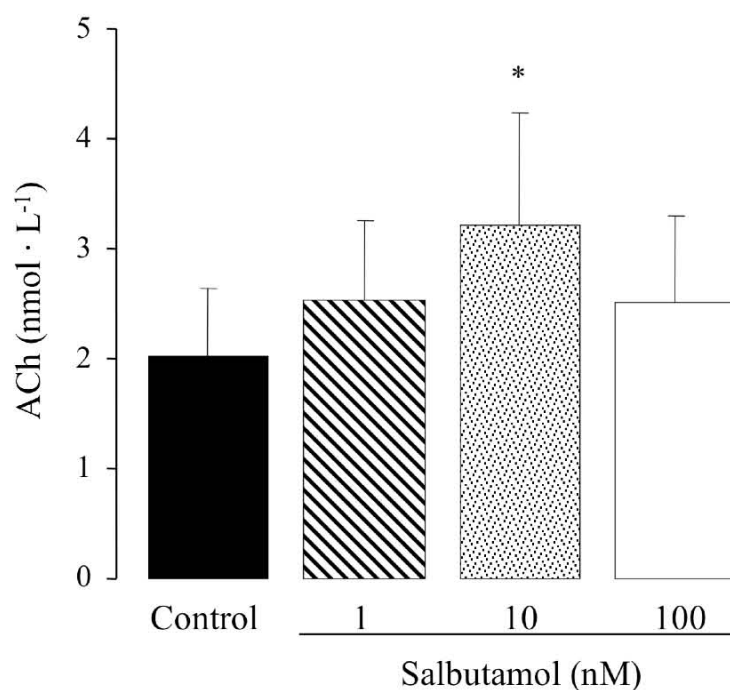


Fig. 14. Efecto de la fisostigmina en anillos traqueales de cobayos. La administración de fisostigmina (\circ , 10 μM , $n=9$) indujo una respuesta de contracción. La adición de salbutamol (\bullet , 0.1 μM , $n=9$) produjo una relajación transitoria, pero la forskolina (\blacktriangle , 1 μM , $n=5$) completamente relajo el tejido. Los símbolos representan el promedio \pm error estándar. * $P<0.01$ comparado con el grupo de fisostigmina; $\dagger P<0.01$ comparado con el grupo de salbutamol.

Mediciones de ACh y sustancia P

Los niveles encontrados de ACh liberada de los anillos traqueales durante los 60 min de estimulación con fisostigmina tuvieron una tendencia a incrementar cuando a estos tejidos se les añadió 1, 10 ó 100 nM de salbutamol en la segunda mitad de este periodo de incubación, siendo estadísticamente diferente la concentración de 10 nM con relación a los estimulados solo con fisostigmina (Fig.15).



*Fig.15. Efecto del salbutamol en la liberación de acetilcolina de los anillos traqueales incubados con fisostigmina por 60 min. Los tejidos fueron incubados en los últimos 30 min con diferentes concentraciones de salbutamol. Las barras y las líneas verticales representan el promedio \pm error estándar. * $P < 0.05$ con respecto al grupo control.*

Por otro lado, la administración de 100 nM de salbutamol incrementó significativamente las concentraciones de sustancia P recuperada de los 5 ml de líquido de los órganos aislados (media 34.9 pg/ml, rango 32.0 a 79.4), comparado con el grupo control sin Sal (media <3.9 pg/ml, rango <3.9 a 9.4, $p < 0.0001$, Fig.16).

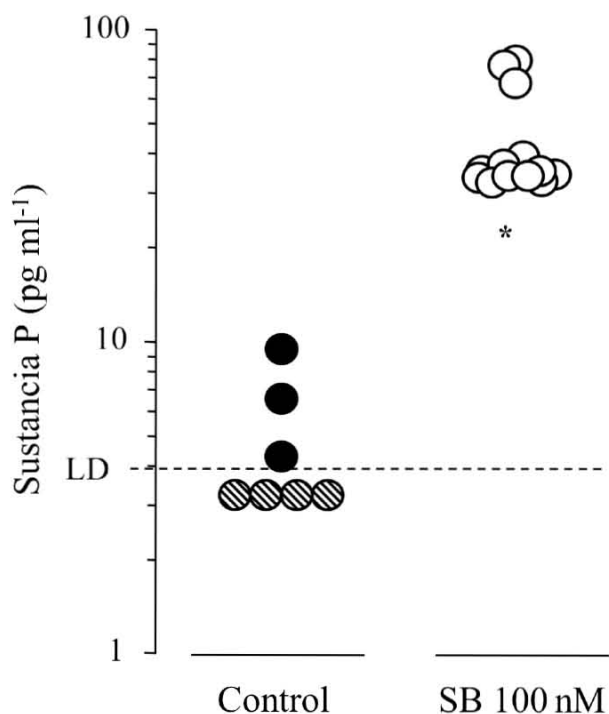


Fig.16. Efecto del salbutamol en la liberación de sustancia P de los anillos traqueales. Los símbolos representan la concentración de sustancia P acumulada durante 60 min incubados con 10 mM de paraoxón sin (grupo control, n=7) o con salbutamol (SB; 100 nM, n=13). * $P < 0.001$. Los círculos rayados representan los valores que estuvieron por debajo del límite de detección del inmunoensayo. LD= límite de detección.

Experimentos en célula única

La concentración basal de $[Ca^{2+}]_i$ encontrada en las células de músculo liso de las vías aéreas fue de 49 ± 7 nM, n=4. La estimulación con CCh causó un incremento transitorio de las concentraciones de Ca^{2+} , seguido de una meseta. La estimulación con paraoxón no modificó ni las concentraciones de $[Ca^{2+}]_i$ ni la respuesta a la estimulación simultánea con CCh (Fig.17). Así, el pico máximo de $[Ca^{2+}]_i$ producido por CCh en presencia de paraoxón [342.24 ± 19.26 nM] no fue diferente al pico máximo sin este compuesto organofosforado [411.52 ± 86.69 nM].

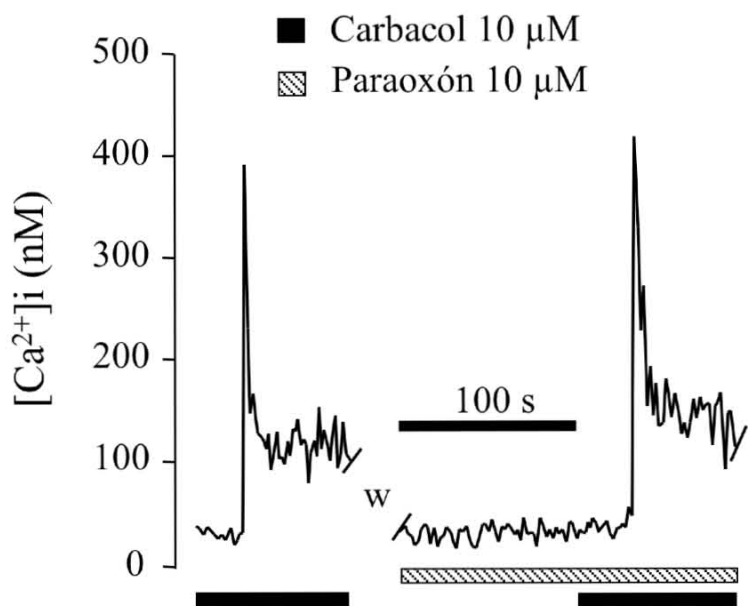


Fig. 17. Efecto del paraoxón en los cambios intracelulares de calcio $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en célula única de músculo liso de las vías aéreas. La adición de carbacol causó un pico transitorio de calcio, seguido de una meseta (barra negra). La incubación con paraoxón (barra punteada) no modificó la respuesta a la estimulación simultánea con carbacol. W= lavado o recambio de Krebs.

DISCUSION

En este trabajo encontramos que, bajo una condición experimental de inhibición de la actividad de la AChE por insecticidas organofosforados, el salbutamol produjo la liberación de sustancia P y, en menor grado, de ACh con una subsiguiente contracción lo suficientemente grande para superar su efecto relajador.

El paratión es un insecticida organofosforado de alta eficacia y del cual es bien conocido que su metabolito activo, el paraoxón, es un potente inhibidor de la actividad de la AChE (Chambers y col. 1995; Segura y col. 1999), enzima encargada de hidrolizar a la ACh. Una de las consecuencias toxicológicas resultantes de la acumulación de ACh es la obstrucción de las vías aéreas. Se ha postulado que en condiciones *in vivo* esta broncoobstrucción puede ser producida por una combinación de mecanismos como son la contracción del músculo liso de las vías aéreas, el aumento de las secreciones y el edema pulmonar (Segura y col. 1999). En este trabajo encontramos que el principal mecanismo fisiopatológico involucrado en la obstrucción de las vías aéreas inducida por una intoxicación con organofosforados fue la contracción del músculo liso, ya que en condiciones *in vivo* la aminofilina rápidamente revirtió en gran medida la broncoobstrucción (Fig.7), mientras que en condiciones *in vitro* la forskolina causó una rápida y completa relajación de la contracción inducida por el paraoxón (Fig.11). La naturaleza colinérgica de la contracción del músculo liso por insecticidas organofosforados se confirmó en los experimentos *in vitro*, mediante la anulación de dicha contracción con atropina. Esta respuesta, sin embargo, fue resistente al efecto de TTX y ω -CTX, sugiriendo con esto que la liberación espontánea de ACh involucra a otros mecanismos adicionales diferentes de los que ocurren durante una depolarización neuronal tradicional, algunos de los cuales ya han sido

postulados previamente (Aas y col. 1991). Debido a que hay buena evidencia que cantidades pequeñas de ACh pueden también ser producidas de orígenes no neuronales (Lessier y col. 1996; Lips y col. 2005; Racké y col. 2004), una posibilidad es que esta ACh no provenga de los nervios, sino de otro tipo celular de las vías aéreas. En una serie independiente de experimentos descartamos al epitelio de la vía aérea como probable fuente adicional de ACh durante la contracción inducida por organofosforados, sin embargo, son necesarios experimentos adicionales para descartar otros orígenes de ACh como el músculo liso de las vías aéreas (Wessler y col. 2001).

En contraste con el potente efecto relajador de la forskolina y de la aminofilina, el salbutamol fue incapaz de inducir una relajación sostenida (*in vitro*) o una broncodilatación sostenida (*in vivo*) ya que su efecto moderado y transitorio de relajación fue rápidamente sobrepasado por una contracción subsiguiente. Al menos en los experimentos *in vivo* la dosis usada en este estudio (10 μ g/kg) fue muy cercana a la dosis intravenosa recomendada para contrarrestar el broncospasmo observado en niño asmáticos (Browne y col. 1997). Adicionalmente, en un trabajo previo (Segura y col. 1999) encontramos que el salbutamol nebulizado a la dosis terapéutica usada en humanos (2 mg/ml, 2 min), también produjo este efecto de reconstricción paradójica. Así, el efecto paradójico del salbutamol en estos cobayos ocurre a la dosis equivalente que es usada en humanos.

Además de su principal efecto farmacológico sobre las vías aéreas que es la relajación del músculo liso, varios estudios han demostrado que el salbutamol y otros agonistas β_2 adrenérgicos son capaces de estimular terminaciones nerviosas vagas e

inducir la liberación de ACh (Cockcroft y col. 1993; Zhang y col. 1995; Zhang y col. 1999; Zhang y col 1998). Esto podría explicar el incremento de las concentraciones de ACh observadas en el fluido de los órganos aislados después de la administración de salbutamol. Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales este incremento fue mínimo, lo que pone en duda su participación en la reconstricción paradójica inducida por salbutamol.

Por el contrario, el salbutamol fue capaz de inducir un incremento significativo en las concentraciones de sustancia P. Esta taquicinina podría explicar la subsiguiente contracción observada durante la respuesta del salbutamol, que concuerda con la relajación casi total ocurrida durante el antagonismo de los receptores NK_1 . Es bien conocido que la extensa red de terminaciones nerviosas llamadas fibras-C que liberan taquicininas, se localizan dentro y debajo del epitelio de las vías aéreas, incluyendo la tráquea (Undem y col. 2004; Widdicombe, 1998). Así, una posibilidad para explicar la liberación de esta taquicinina inducida por el salbutamol es que el propio salbutamol estimula directamente las fibras-C. Sin embargo, la presencia de receptores adrenérgicos β_2 presinápticos en este tipo de fibras aún no ha sido descrito, por lo que esta posibilidad requiere aún ser demostrada.

El posible papel de esta fibras-C coincide con un trabajo de Keir y col, en el 2002, en el que demostraron que un tratamiento de 10 días con agonistas adrenérgicos β_2 (RS y S-albuterol) inducen hiperreactividad bronquial (HRB) en cobayos sensibilizados y no sensibilizados. El desarrollo de esta HRB fue prevenida con el tratamiento de capsaicina, sugiriendo con esto la importancia de los nervios sensoriales o fibras-C en este fenómeno. En nuestros estudios *in vitro* encontramos que la

característica transitoria de la relajación inducida por salbutamol fue muy similar a la observada durante la contracción inducida ya sea por paraoxón, fisostigmina o CCh, sugiriendo que el incremento en las concentraciones de ACh en el microambiente que está alrededor de las células de músculo liso es necesario para que el efecto paradójico del salbutamol se lleve a cabo. La respuesta de contracción colinérgica del músculo liso involucra la activación de los receptores M_3 y M_2 . Es bien sabido que el receptor M_2 está acoplado a una proteína G_i y que, por consiguiente, favorece la inhibición de la adenilato-ciclasa y disminuye la producción de AMPc (Schramm y col. 1995). Así, los mecanismos inducidos por la activación de los receptores M_2 son particularmente opuestos a los generados durante la estimulación de los receptores adrenérgicos β_2 (incremento en la producción de AMPc). Este mecanismo de antagonismo funcional entre los receptores M_2 y β_2 ha sido previamente reportado (Buckner y col. 1975; Fernandes y col. 1992) y pudiera estar involucrado en gran parte en nuestros resultados, puesto que el bloqueo de los receptores M_2 por la metoctramina o por AF-DX 116, incrementó la relajación inducida por salbutamol y eliminó el efecto paradójico. La existencia de este antagonismo funcional quedo claramente demostrado usando una concentración menor de salbutamol ($0.032 \mu\text{M}$) sobre la respuesta contráctil a CCh. En estos experimentos el salbutamol causó una relajación de aproximadamente 50% de la contracción inducida por CCh, y el bloqueo subsiguiente de los receptores M_2 con metoctramina produjo una rápida y completa relajación de los tejidos (Fig.13). En resumen, nuestros resultados sugieren fuertemente que al menos dos mecanismos están involucrados en este efecto paradójico del salbutamol durante una intoxicación aguda por organofosforados, por un

lado, el antagonismo funcional entre los receptores M_2 y β_2 y, por otro lado, una liberación de sustancia P inducida por este agonista adrenérgico β_2 .

Sin embargo, mecanismos adicionales pueden estar involucrados. Por ejemplo, van den Beukel y col. en 1996, estudiaron el efecto directo que tienen el paratión y paraoxón en células de ovario de hámster sobre receptores muscarínicos M_3 transfectados de humano. Donde demostraron que tanto el paratión como el paraoxón a concentraciones toxicológicas relevantes, son capaces de inducir corrientes iónicas en estas células. El paratión induce una corriente saliente, semejante a la corriente inducida por ACh; por el contrario, el paraoxón induce o una corriente entrante o una corriente entrante seguida de una saliente, que es claramente diferente de la corriente saliente inducida por ACh. Concluyendo que estos organofosforados pueden actuar como agonistas de los receptores M_3 (que en el músculo liso de las vías aéreas están involucrados en el efecto contráctil de la ACh). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales no encontramos efecto directo del paraoxón sobre los miocitos de tráquea de cobayo.

Por otro lado, el grupo de Fryer (Fryer y col. 2004 y 2005), postularon que los insecticidas organofosforados inducen HRB a través de un decremento en la función del receptor neuronal muscarínico M_2 . Este receptor presináptico limita la liberación de ACh de los nervios vagales pulmonares (Fryer y col. 1984) y así esta inhibición por organofosforados podría favorecer la liberación de este neurotransmisor si una subsiguiente estimulación neuronal se llevara a cabo.

La exposición a pesticidas organofosforados, ya sea voluntaria o accidental, puede, empeorar los síntomas en pacientes asmáticos o inducir síntomas respiratorios

tales como dificultad respiratoria o sibilancias en sujetos no asmáticos (Beard y col. 2003; Hoppin y col. 2002; Salameh y col. 2003; Zhang y col. 2002). En el caso de que un envenenamiento con insecticidas organofosforados (Klein-Schwartz y col. 1997) sea identificado, el tratamiento apropiado probablemente debe consistir en el uso de oximas (pralidoxima) y atropina. Sin embargo, en muchos casos el envenenamiento con organofosforados es generado por dosis bajas y por tiempo prolongado, por lo que no siempre es evidente (Hoppin y col. 2002; Tinoco-Ojanguren y col. 1998). Al respecto, es de esperarse que los agonistas adrenérgicos β_2 como el salbutamol sea administrado debido a la presencia de sibilancias. En este contexto, nuestros actuales resultados tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, nos permiten especular que la efectividad del salbutamol en estas condiciones puede ser menor de la esperada o peor aun, puede empeorar la obstrucción bronquial inducida por la intoxicación con estos compuestos organofosforados. Adicionalmente, estudios clínicos en asma han encontrado que el tratamiento crónico con agonistas adrenérgicos β_2 pueden empeorar el control del asma (Sears y col. 1990) e inducir HRB a un gran numero de estímulos broncoconstrictores incluyendo metacolina, histamina, ejercicio o alergenos (Cockcroft y col. 1993; Inman y col. 1996; Sears y col. 1990; van Schayck y col. 1990). Por lo tanto, una posible explicación de este efecto no esperado del salbutamol pudiera estar relacionado a su capacidad de inducir la liberación de taquicininas.

De acuerdo a nuestros resultados concluimos que: 1) los compuestos organofosforados causan contracción del músculo liso de las vías aéreas debido a la acumulación de ACh liberada a través de mecanismos resistentes a TTX y ω -CTX, 2) durante dicha contracción, la relajación inducida por el salbutamol es funcionalmente

antagonizada por la estimulación de los receptores M_2 , y 3) después de la relajación transitoria inducida por el salbutamol, una contracción paradójica sobreviene debido a la liberación de sustancia P.

REFERENCIAS

Anónimo. Tachykinin receptors. ARCHIVO DESCARGADO EN EL AÑO 2007 DE: www.sigmaaldrich.com/sigma/rbi-handbook/rbibook5_tachyrcpt.pdf

Aas P, Gaudry-Talarmain YM, Fonnum F. Effect of AH5183 (vesamicol) on cholinergic transmission in intact airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 199; 357-362, 1991.

Abou-Donia MB. Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity. *Arch Environ Health.* 58:484-497, 2003.

Adler A, Cieslewicz G, Irvin CG. Unrestrained plethysmography is an unreliable measure of airways responsiveness in BALB/c and C57BL6 mice. *J Appl Physiol* 97: 286-292, 2004.

Bazán-Perkins B, Vargas MH, Sánchez-Guerrero E, Chávez J, Montaña LM. Spontaneous changes in guinea-pig respiratory pattern during barometric plethysmography: role of catecholamines and nitric oxide. *Exp Physiol.* 89: 623-628, 2004.

Beard J, Sladden T, Morgan G, Berry G, Brooks L, Mc Michael A. Health impacts of pesticide exposure in cohort of outdoor workers. *Environ Health Perspect* 111: 724-730, 2003.

Benet LZ, Kroetz DL, Sheiner LB. Farmacocinética. *Goodman & Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica.* Volumen 1. 9ª Edición. McGraw-Hill Interamericana, México 1996, 3-29.

Bergren DR. Chronic tobacco smoke exposure increases airway sensitivity to capsaicin in awake guinea pigs. *J Appl Physiol* 90: 695-704, 2001.

Browne GJ, Penna AS, Phung X, Soo M. Randomised trial of intravenous salbutamol in early management of acute severe asthma in children. *Lancet* 349:301-305, 1997.

Buckner CK, Saini RK. On the use of functional antagonist to estimate dissociation constants for beta adrenergic receptor agonists in isolated guinea-pig trachea. *J Pharmacol Exp Ther* 194: 565- 574, 1975.

Buratti FM, Volpe MT, Meneguz A, Vittozzi L, Testai E. CYP-specific bioactivation of four organophosphorothioate pesticides by human liver microsomal. *Toxicol Apply Pharmacol* 186: 143-154, 2003.

Carbajal V, Vargas MH, Flores-Soto E, Martínez-Cordero E, Bazán-Perkins B, Montaña LM. 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-L92, 2005.

Chambers HW. Organophosphorus compounds: *An overview. Organophosphates; Chemistry, Fate and Effects.* Academic Press, Inc., USA 1992, 3-17.

Chambers JE, Carr RL. Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticidal toxicity. *Toxicology* 105: 291-304, 1995.

Chand N, Nolan K, Pillar J, Lomask M, Diamantes W, Sofia RD. Aeroallergen-induced dyspnea in freely moving guinea pigs. Quantitative measurement by bias flow ventilated whole body plethysmograph. *Allergy* 48: 230-235, 1993.

Chang SK, Williams PL, Dauterman WC, Riviere JE. Percutaneous absorption, dermatopharmacokinetics and related bio-transformation studies of carbaryl, lindane, malathion and parathion in isolated perfused porcine skin. *Toxicology* 91:269-280, 1994.

Chávez Alderete Jaime. Modificación de la función respiratoria inducida por paratión y su relación con la permeabilidad vascular pulmonar en cobayos. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Biólogo. Facultad de Ciencias, UNAM, 1996.

Chemnitius JM, Haselmeyer KH, Zech R. Neurotoxic esterase. *Archives of Toxicology* 53:235-244, 1983.

Chong BT, Agrawal DK, Romero FA, Townley RG. Measurement of bronchoconstriction using whole-body plethysmograph: Comparison of freely moving versus restrained guinea pigs. *J Pharmacol Toxicol Methods* 39: 163-168, 1998.

Cockcroft DW, McParland CP, Britto SA, Swystun VA, Rutherford BC. Regular inhaled salbutamol and airway responsiveness to allergen. *Lancet* 342:833-7, 1993.

De Haas JRA, Terpstra S, Van Der Zwaag M, Kockelbergh PGE, Roffel AD, Zaagsma J. Facilitatory β_2 -adrenoceptors on cholinergic and adrenergic nerve endings of the guinea pig trachea. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 276: L420-L425, 1999.

Delaunois A, Gustin P, Ansay M. Metabolism and pulmonary toxicity of pesticides in mammals. *Ann Med Vet* 135:157-174, 1991.

Delaunois A, Gustin P, Ansay M. Altered capillary filtration coefficient in parathion and paraoxon induced edema in isolated and perfused rabbit lung. *Toxicol Appl Pharmacol* 116:161-169, 1992.

Delaunois A, Gustin P, Ansay M. Role of neuropeptides in acetylcholine-induced edema in isolated and perfused rabbit lung. *J Pharmacol Exp Ther* 266:483-491, 1993.

Lundblad LKA, Irvin CG, Adler A, Bates JHT. A reevaluation of the validity of unrestrained plethysmography in mice. *J Appl Physiol.* 93: 1198–1207, 2002.

Drorbaugh JE, Fenn WO. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics* 16: 81-87, 1955.

Durán-Nah JJ, Colli-Quintal J. Intoxicación aguda por plaguicidas. *Salud Publica Mex* 42:53-55, 2000.

Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88-95, 1961.

Epstein MA, Epstein RA. A theoretical analysis of the barometric method for measurement of tidal volume. *Respir Physiol* 32: 105-120, 1978.

Fernandes LB, Fryer AD, Hirshman CA. M₂ muscarinic receptors inhibit isoproterenol-induced relaxation of canine airway smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 262: 119-126, 1992.

Ferrer A. Intoxicación por plaguicidas. *ANALES Sis San Navarra* 26;1:155-171, 2003.

Fonnum F, Sterri SH, Aas P, Johnsen H. Carboxylesterases, importance for detoxification of organophosphorus anticholinesterases and trichothecenes. *Fundam Appl Toxicol* 5:29-38, 1985.

Foxenberg RJ, McGarrigle BP, Knaak JB, Kostyniak PJ, Olson JR. Human hepatic cytochrome P450-specific metabolism of parathion and chlorpyrifos. *Drug Metabol Dispos* 35: 189-193, 2007.

Freudenthal W, Ralston M. Toxicity, organophosphates [<http://www.emedicine.com/ped/topic1660.htm>], 2006.

Fryer AD, Lein PJ, Howard AS, Yost BL, Beckles RA, Jett DA. Mechanisms of organophosphate insecticide-induced airway hyperreactivity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L963-L969, 2004.

Fryer AD, Maclagan J. Muscarinic inhibitory receptors in pulmonary parasympathetic nerves in the guinea pigs. *Br J Pharmacol* 83: 973-978, 1984.

Gallo MA, Lawryk MJ. Organic phosphorus pesticides. *In Handbook of Pesticidas Toxicology: Classes of Pesticides*, Vol 2. Academic Press, New York 917-1123, 1991.

Gil F, Gonzalvo MC, Hernandez A, Villanueva E, Pla A. Differences in the kinetic properties, effect of calcium and sensitive of inhibitors of paraoxon hydrolase activity in rat plasma and microsomal fraction from rat liver. *Biochem Pharmacol* 48:1559-1568, 1994.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450, 1985.

Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, Gelfand EW. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 766-775, 1997.

Henao S, Arbelaez MP. Epidemiological situation of acute pesticide poisoning in Central America, 1992-2000. *Epidemiological Bulletin/PAHO* 23:5-9, 2002.

Henao S, Corey G. Plaguicidas organofosforados y carbámicos. *Serie vigilancia 2. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud; Organización Mundial de la Salud*, 1986.

Hoppin JA, Umbach DM, London SJ, Alavanja MCR, Sandler DP. Chemical predictors of wheeze among farmer pesticide applicators in the agricultural health study. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 683-689, 2002.

Hurst CG, Newmark J, Romano JA. Bioterrorismo con productos químicos. En: *Harrison, Principios de medicina interna*. 16ª edición. McGraw-Hill;1431-1434, 2006.

Inman MD, O'Byrne PM. The effect of regular inhaled albuterol on exercise- induced bronchoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med* 153:65-69, 1996.

Jaga K, Dharmani Ch. Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides. *Pan Am J Public Health* 14:171-185, 2003.

Johnson MK. Organophosphorus and other Inhibitors of Brain Neurotoxic Esterase and the Development of Delayed Neurotoxicity in Hens. *Biochem J* 120:523-531, 1970.

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

Kamataki T, Leelin MCM, Belcher DH, Neal RA. Studies of the metabolism of parathion with an apparent homogeneous preparation of rabbit liver microsomal cytochrome P450. *Drug Metab Dispos* 4:180-189, 1976.

Karanth S, Pope C. Carboxylesterase and A-Esterase activities during maturation and aging: Relationship to the toxicity of chlorpyrifos and parathion in rats. *Toxicol Sci.* 58:282-289, 2000.

Kass R, Kochar G, Lippman M. Adult respiratory distress syndrome from organophosphate poisoning. *Am J Emerg Med* 9:23-33, 1991.

Keir S, Page C, Spina D. Bronchial hyperresponsiveness induced by chronic treatment with albuterol: Role of sensory nerves. *J Allergy Clin Immunol* 110:388-394, 2002.

Klein-Schwartz W, Smith GS. Agricultural and horticultural chemical poisoning. Mortality and morbidity in the United States. *Ann Emerg Med* 29:232-238, 1997

Lein PJ, Fryer AD. Organophosphorus insecticides induce airway hyperreactivity by decreasing neuronal M2 muscarinic receptor function independent of acetylcholinesterase inhibition. *Toxicol Sci* 83: 166-176, 2005.

Lessire F, Gustin P, Delaunois A, Bloden S, Nemmar A, Vargas M, Ansay M. Relationship between parathion and paraoxon toxicokinetics, lung metabolic activity,

and cholinesterase inhibition in guinea pig and rabbit lungs. *Toxicol Appl Pharmacol* 138: 201-210, 1996.

Lewis RT, Macleod AM, Merchant KJ, Kelleher F, Sanderson I, Herbert RH, Cascieri MA, Sadowski S, Ball RG, Hoogsteen K. Tryptophan-derived NK1 antagonists: conformationally constrained heterocyclic bioisosteres of the ester linkage. *J Med Chem* 38: 923-933, 1995.

Lips KS, Volk C, Schmitt BM, Pfeil U, Arndt P, Miska D, Ermert L, Kummer W, Koepsell H. Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33: 79-88, 2005.

Neal RA. Enzimatic mechanism of metabolismo of parathion in the phosphorothioate insecticidas. *Arch Intern Med* 128: 118-124, 1971.

Northoff E. Los niños corren mayor riesgo de intoxicación por plaguicidas. Archivo descargado de : <http://fao.org/newsroom/es/news/2004/51018/index.html>. 2004

Novak R, Padilla S. An *in Vitro* Comparison of Rat and Chicken Brain Neurotoxic Esterase *Fundam. Appl. Toxicol.* 6: 464–471, 1986.

Ortega-Cesaña J, Carreón-Valencia T, López-Carrillo L, Chávez-Ayala R, Hernández-Avila M. La investigación en México sobre el impacto en la salud por los contaminantes químicos ambientales. *Salud Publica Mex* 35:585-591, 1993.

Pennefathera JN, Leccib A, Candenasc ML, Patak d E, Pintoc FM, Maggi CA. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci* 74:1445–1463, 2004.

Peña Carlos E, Dean E. Carter and Felix Ayala-Fierro. 2001. Toxicologia Ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. Distributed on the Internet via the Southwest Hazardous Waste Program website at: [http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/]

Potter PE, Meek JL, Neff NH. Acetylcholine and choline in neuronal tissue measured by HPLC with electrochemical detection. *J Neurochem* 41: 188-194, 1983.

Qiao GL, Chang SK, Brooks JD, Riviere JE. Dermatotoxicokinetic modeling of *p*-nitrophenol and its conjugation metabolite in swine following topical and intravenous administration. *Toxicol Sci* 54:284-294, 2000.

Racké K, Matthiesen S. The airway cholinergic system: physiology and pharmacology. *Pulm Pharmacol Ther* 17: 181-198, 2004.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Cholinergic transmission. *Pharmacology*. 14^{ava} Edición. Churchill Livingstone, London 1999, 110-138 pp.

Salameh PR, Baldi I, Brochard P, Raheison C, Abi Saleh B, Salamon R. Respiratory symptoms in children and exposure to pesticides. *Eur Respir J* 22: 507-512, 2003.

Schramm CM, Arjona NC, Grunstein MM. Role of muscarinic M2 receptors in regulating β -adrenergic responsiveness in maturing rabbit airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 269: L783- L790, 1995.

Sears MR, Taylor DR, Print CG, Lake DC, Li Q, Flannery EM, Yates DM, Lucas MK, Herbison GP. Regular inhaled beta-agonist treatment in bronchial asthma. *Lancet* 336:1391-1396. 1990.

Segura Medina Patricia. Identificación de los mecanismos involucrados en la toxicidad aguda inducida por paratión en el aparato respiratorio. Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, UNAM, 2000.

Segura P, Chavez J, Montañó LM, Vargas, MH, Delaunois A, Gustin P. Identification of mechanisms involved in the acute airway toxicity induced by parathion. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 360: 699-710, 1999.

Severini C, Improta G, Falconieri-Erspamer G, Salvadori S, Erspamer V. The Tachykinin Peptide Family. *Pharmacol Rev* 54:285–322, 2002.

Sipes G, Gandolfi J. Biotransformation of toxicants. *Biotransformation of Toxicants. In General Principles of Toxicology.* Academia Press. New York 1995.

Slapper D, Stearns DA, VanDeVoort JT, Harchelroad F, Halamka J, Roberge R. Toxicity, organophosphate and carbamate. May 11, 2006. <http://www.emedicine.com/emerg/topic346.htm>]

Sultatos LG, Minor LD, Murphy SD. Metabolic activation of phosphorothioate pesticides: Role of the liver. *J Pharmacol Exp Ther* 232:624-628, 1985.

Sutiak V, Gustin P, Delaunois A, Ansay M. Protective effect of chloramphenicol against prathion-induced pulmonary oedema in rabbits: influence of sex. *J Vet Pharmacol Therap* 17:77-79, 1994.

Taylor P. Anticolinesterasas. *Goodman & Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica.* Volumen 1. 9ª Edición. McGraw-Hill Interamericana, México 1996, 171-187.

Tinoco-Ojanguren R, Halperin DC. Poverty, production, and health: Inhibition of erythrocyte cholinesterase via occupational exposure to organophosphate insecticides in Chiapas, Mexico. *Arch Environ Health* 53: 29-35, 1998.

Udem BJ, Chuaychoo B, Lee MG, Weinreich D, Myers AC, Kollarik M. Subtypes of vagal afferent C-fibres in guinea-pig lungs. *J Physiol* 556: 905-917, 2004.

van den Beukel I, van Kleef R, Oortgiesen M. Direct functional effects of parathion and paraoxon on neuronal nicotinic and muscarinic M3 acetylcholine receptors. *ATLA* 24: 191-199, 1996.

van Netten C, Leung V. Hydraulic fluids and jet engine oil: pyrolysis and aircraft air quality. *Arch Environ Health* 56:181-6, 2001.

van Schayck CP, Graafsma SJ, Visch MB, Dompeling EvWC, van Herwaarden CLA. Increased bronchial responsiveness after inhaling salbutamol during 1 year is not caused by subsensitisation to salbutamol. *J Allergy Clin Immunol* 86:793-800, 1990.

Vitarius JA, Sultatos LG. The role of calcium in the hydrolysis of the organophosphate paraoxon by human serum A-esterase. *Life Sci* 56:125-134, 1995.

Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: a success store. *Genome Biol* 1:1-9, 2000.

Wessler IK, Kirkpatrick CJ. The non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm Pharmacol Ther* 14: 423-434, 2001.

WHO. Public health impact of pesticides used in agriculture. Ginebra, WHO, 1990.

Widdicombe JG. Autonomic Regulation. i-NANC/e-NANC. *Am J Respir Crit Care Med* 158: S171-S175, 1998.

Williams DG, Johnson MK. Gel-electrophoretic identification of hen brain neurotoxic esterase, labelled with tritiated di-isopropyl phosphorofluoridate. *Biochem J* 199:323-333, 1981.

Zhang LX, Enarson DA, He GX, Li B, Chan-Yeung M. Occupational and environmental risk factors for respiratory symptoms in rural Beijing, China. *Eur Respir J* 20: 1525-1531, 2002.

Zhang XY, Robinson NE, Wang ZW, Lu MC. Catecholamine affects ACh release in trachea: α_2 -mediated inhibition and β_2 -mediated augmentation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 268: L368-L373, 1995.

Zhang XY, Robinson NE, Zhu FX. Modulation of ACh release from airway cholinergic nerves in horses with recurrent airway obstruction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 276: L769-L775, 1999.

Zhang XY, Zhu FX, Olszewski MA, Robinson E. Effects of enantiomers of β_2 -agonists on ACh release and smooth muscle contraction in the trachea. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 274: L32-L38, 1998.

ANEXO: ARTICULO PUBLICADO

Paradoxical effect of salbutamol in a model of acute organophosphates intoxication in guinea pigs: role of substance P release

Jaime Chávez,¹ Patricia Segura,¹ Mario H. Vargas,^{1,*}
 José Luis Arreola,¹ Edgar Flores-Soto,² and Luis M. Montaña^{2,*}

¹Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, and

²Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México

Submitted 9 June 2005; accepted in final form 5 December 2006

Chávez J, Segura P, Vargas MH, Arreola JL, Flores-Soto E, Montaña LM. Paradoxical effect of salbutamol in a model of acute organophosphates intoxication in guinea pigs: role of substance P release. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L915–L923, 2007. First published December 8, 2006; doi:10.1152/ajplung.00253.2005.—Organophosphates induce bronchoobstruction in guinea pigs, and salbutamol only transiently reverses this effect, suggesting that it triggers additional obstructive mechanisms. To further explore this phenomenon, in vivo (barometric plethysmography) and in vitro (organ baths, including ACh and substance P concentration measurement by HPLC and immunoassay, respectively; intracellular Ca²⁺ measurement in single myocytes) experiments were performed. In in vivo experiments, parathion caused a progressive bronchoobstruction until a plateau was reached. Administration of salbutamol during this plateau decreased bronchoobstruction up to 22% in the first 5 min, but thereafter airway obstruction rose again as to reach the same intensity as before salbutamol. Aminophylline caused a sustained decrement (71%) of the parathion-induced bronchoobstruction. In in vitro studies, paraoxon produced a sustained contraction of tracheal rings, which was fully blocked by atropine but not by TTX, ω -conotoxin (CTX), or epithelium removal. During the paraoxon-induced contraction, salbutamol caused a temporary relaxation of ~50%, followed by a partial recontraction. This paradoxical recontraction was avoided by the M₂- or neurokinin-1 (NK₁)-receptor antagonists (methocramine or AF-DX 116, and L-732138, respectively), accompanied by a long-lasting relaxation. Forskolin caused full relaxation of the paraoxon response. Substance P and, to a lesser extent, ACh released from tracheal rings during 60-min incubation with paraoxon or physostigmine, respectively, were significantly increased when salbutamol was administered in the second half of this period. In myocytes, paraoxon did not produce any change in the intracellular Ca²⁺ basal levels. Our results suggested that: 1) organophosphates caused smooth muscle contraction by accumulation of ACh released through a TTX- and CTX-resistant mechanism; 2) during such contraction, salbutamol relaxation is functionally antagonized by the stimulation of M₂ receptors; and 3) after this transient salbutamol-induced relaxation, a paradoxical contraction ensues due to the subsequent release of substance P.

albuterol; β_2 -adrenoceptor agonist; parathion; paraoxon; tachykinins; physostigmine; airway smooth muscle

PARATHION IS ONE OF THE MAIN representatives of organophosphates, a family of compounds synthesized since the 1940s and still widely used all around the world in agriculture and veterinary medicine as insecticides and antihelminthics (12). To achieve biological activity, parathion must be biotransformed

in the liver and other tissues into paraoxon. The latter metabolite has a very strong inhibitory capacity on acetylcholinesterase (AChE) activity (27, 36), leading to an increase in ACh effects. The use of organophosphates and carbamates are responsible for over 1,000,000 poisoning victims per year worldwide (17). This figure, however, might well underestimate the problem due to the amount of unreported cases, mainly in developing countries (37).

In a previous study using an in vivo model of organophosphate poisoning, we (35) found that guinea pigs with an ongoing parathion-induced bronchoobstruction responded to salbutamol administration with a transient bronchodilation, which was followed by a returning of the bronchoobstruction. Those results allowed us to speculate that salbutamol triggered some obstructive mechanism that rapidly counteracted its relaxing action. In this regard, some studies have demonstrated that salbutamol can facilitate neurotransmitter release, such as ACh release from parasympathetic nerves, through prejunctional β_2 -adrenoceptor stimulation (11, 44–46). Because such an effect might well explain the airway obstruction induced by salbutamol, in the present work this hypothesis and some other possible mechanisms explaining the paradoxical effect of salbutamol were explored.

MATERIALS AND METHODS

Animals and experimental design. Male Hartley guinea pigs (500–600 g) bred in conventional conditions in our institutional animal facilities (filtered conditioned air, 21 ± 1°C, 50–70% humidity, sterilized bed) and fed with Harlan pellets and sterilized water were used. The protocol was approved by the Scientific and Bioethics Committees of the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. The experiments were conducted in accordance with the published Guiding Principles in the Care and Use of Animals approved by the American Physiological Society.

Most experiments were performed using either barometric plethysmography for freely moving guinea pigs or the organ bath technique for tracheal tissue. The sequence of drugs administered in these experiments is shown in Table 1. In addition, intracellular Ca²⁺ concentration was measured in enzymatically dispersed tracheal myocytes.

In vivo experiments. Guinea pigs were studied in a whole body, barometric plethysmography chamber for freely moving animals (Buxco, Troy, NY), and responses were recorded by a specialized software (Biosystem XA v1.5.4, Buxco). The underlying principles of this technique have been already described by others (13, 15, 21). The main variable in this method is the “enhanced pause” (Penh), which has been shown to be correlated with total lung resistance in BALB/c

* M. H. Vargas and L. M. Montaña contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: L. M. Montaña, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Talpan 4502, CP 14080, México DF, México (e-mail: lmmr@servidor.unam.mx).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Table 1. *Experimental design*

Plethysmography Experiments		Organ Baths Experiments	
Sequence	n	Sequence	n
Pth	7	Pox*	11
Pth-Sal	7	Atr-Pox	5
Pth-Ami	7	TTX-Pox*	5
		ω -CTX-Pox*	4
		Pox-Sal	22
		Pox-For	7
		Pox-Pro-Sal	6
		Pox-Met-Sal	8
		Pox-AF-Sal	6
		L-732-Pox-Sal	11
		Phy	9
		Phy-Sal	9
		Phy-For	5
		CCh	8
		CCh-Sal	8
		CCh-Sal-Met	7

AF, AF-DX 116; Ami, aminophylline; Atr, atropine; CCh, carbachol; For, forskolin; L-732, L-732138; Phy, physostigmine; Pox, paraoxon; Pro, propranolol; Pth, parathion; Sal, salbutamol; TTX, tetrodotoxin; ω -CTX, ω -conotoxin GVIA; Met, methocramine. *Separate experiments without epithelium ($n = 5$ for each group) were also performed.

mice (2, 21) and with specific airway resistance in guinea pigs (4, 9). The software was adjusted to only include breaths with a tidal volume of 1 ml or more, with a minimal inspiratory time of 0.15 s, a maximal inspiratory time of 3 s, and a maximal difference between inspiratory and expiratory volumes of 10%. A constant air flow (10 ml/s) was continuously supplied to the plethysmographic chamber without affecting the signal.

After each guinea pig was put inside the plethysmographic chamber, recording was initiated 5 min later, and a basal measurement of Penh was done. Approximately 20 min later, parathion (10 mg/kg) or vehicle (propylenglycol-ethanol, 10:1.5 vol/vol) was administered by the intraperitoneal route, and from this point onward respiratory parameters were recorded at *minutes* 5, 10, and every 10 min thereafter. The parathion dose was selected based on previous (35) and new experiments, to obtain the desired effect on airways without significant neurological effects. Because respiratory parameters were calculated by the computer in each breath, adjustments were made to the software to average values from all breaths occurring within 15 s and then to average those values during the last 5 min of each period. To evaluate whether a contraction of the airway smooth muscle was a component of the pulmonary toxicity of parathion, the bronchodilator effect of salbutamol (10 μ g/kg ip) or aminophylline (40 mg/kg ip) was assessed during the plateau of the parathion-induced airway obstruction, while control animals received intraperitoneal saline solution. These salbutamol and aminophylline doses corresponded to the therapeutic dosage used in humans, and both of them were applied 90 min after parathion administration.

In vitro experiments: organ baths. Guinea pigs were euthanized by a pentobarbital overdose, and four rings (submitted to different experimental conditions) were obtained from the middle of the trachea and studied in a 5-ml organ bath system, as previously described (7). Tissues were stimulated three times with KCl (60 mM), and then paraoxon (10 μ M) or physostigmine (10 μ M) was added to the organ bath. Contractile responses to these drugs were expressed as percentage of the third KCl response. We corroborated that, at these concentrations, both paraoxon and physostigmine produced comparable contractile responses ($91.9 \pm 9.4\%$ vs. $89.3 \pm 3.3\%$ of KCl contraction, respectively; $P = 0.83$). In some experiments, tissues were preincubated with 10 μ M tetrodotoxin (TTX), 0.32 μ M ω -conotoxin GVIA (ω -CTX; an N-type Ca^{2+} channel blocker), or 1 μ M atropine during the 15 min before addition of paraoxon. In a separate set of

tissues, during the plateau of the paraoxon- or physostigmine-induced maximum contraction, salbutamol (0.1 μ M) or forskolin (1 μ M; an adenylate cyclase activator) were added with the aim to evaluate their relaxing effect.

To explore the role of β_2 - and M_2 -receptors in the effect of salbutamol, the former were blocked with propranolol (10 μ M) and the latter with methocramine (0.31 μ M) or AF-DX 116 (0.1 μ M), added 15 min before salbutamol. We corroborated that these concentrations of propranolol, methocramine, and AF-DX 116 do not modify the plateau of tracheal contraction induced by paraoxon. Likewise, a possible participation of substance P on the effect of salbutamol was evaluated by using L-732138 (10 nM), a neurokinin-1 (NK_1) receptor antagonist (28), added to the organ baths 15 min before paraoxon. We corroborated that these concentrations of L-732138 do not modify the contractile response to paraoxon. With the aim to assess if the salbutamol effect was the same during a paraoxon-induced contraction as during a typical cholinergic contractile response, additional tissues were precontracted with 0.32 μ M carbachol instead of paraoxon. Finally, to demonstrate a possible functional antagonism between M_2 - and β_2 -receptors (6, 16), methocramine was also administered after a lower dose of salbutamol (32 nM) in tracheas precontracted with 0.32 μ M carbachol.

To evaluate the role of airway epithelium in the paraoxon-induced responses, guinea pig tracheal smooth muscle strips (in which epithelial layer and connective tissue surrounding smooth muscle were removed by dissection under stereoscopic microscopy) were used instead of tracheal rings. These smooth muscle strips were submitted to 10 μ M paraoxon stimulation with or without 10 μ M TTX preincubation.

In experiments aimed to obtain samples of bath fluid for substance P measurement, tracheal rings were incubated with paraoxon (10 μ M) for 1 h with or without addition of salbutamol (100 nM) in the second half of this period. Afterwards, the bath liquid was recovered and stored in vials at -70°C until its study. These experiments were performed with 3.2 μ M phosphoramidon to avoid the enzymatic degradation of substance P by neutral endopeptidases. The same procedure was used to obtain samples for ACh measurement, excepting that physostigmine (10 μ M) was used instead of paraoxon (because the organophosphate spoils the analytic column for ACh and choline measurement used in the HPLC system), and three concentrations of salbutamol were separately tested (1, 10, or 100 μ M). In addition, these last samples were filtered through 0.2- μ m nylon membrane Acrodiscs (Pall Gelman Sciences, Ann Arbor, MI) before its storage at -70°C .

AChE activity measurement. The AChE activity was determined in guinea pig lung lobe and plasma samples using a colorimetric method based on the Ellman reaction (14) and expressed as percentage of inhibition. Briefly, the lung tissue was homogenized in phosphate buffer (1 ml of phosphate buffer per 100 mg of tissue) with an homogenizer (Polytron Kinematica PT3100; Brinkmann, Westbury, NY). The homogenate was centrifuged for 15 min at 3,000 g. The supernatant was filtered (Whatman 1 filter paper), and 300 μ l of supernatant was added to a cuvette containing 2.5 ml of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB; 0.32 mM) and 300 μ l of phosphate buffer (64 mM). The background absorbance per minute was measured at 405 nm at 25°C with a spectrophotometer (DU-640; Beckman, Fullerton, CA). Afterwards, 100 μ l of AChE substrate (42 mM acetylthiocholine) was added to the cuvette, and the change in absorbance per minute was measured. Once the background absorbance was subtracted, the AChE activity was calculated as international units (IU) by means of the following equation

$$\text{IU} = \frac{\text{substrate hydrolyzed mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ tissue}}{1.36 \times 10^4 \times 300 \times \text{Co}}$$

$$= \frac{A \times 3,200}{1.36 \times 10^4 \times 300 \times \text{Co}}$$

where A is the change in absorbance per minute, 1.36×10^4 is the extinction coefficient of DTNB, Co is the amount of tissue in the

supernatant (milligram of tissue per milligram of buffer), and 3,200 and 300 are the total volume (μl) of the cuvette and the volume (μl) of the supernatant, respectively.

Regarding plasma samples, after 1:25 dilution in phosphate buffer, 100 μl was added to a cuvette containing 2.5 ml of DTNB and 500 μl of phosphate buffer. The remaining steps were the same as those described for lung homogenates. The formula was changed (100 μl of sample instead of 300 μl), and IU corresponded to substrate hydrolyzed $\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ of plasma.

ACh measurement by HPLC. ACh and choline concentrations in the physostigmine-containing samples were measured by cation exchange HPLC electrochemical detection method as described by Potter et al. (30). In this technique, an analytic column for ACh and choline (MF-6150; Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN), an immobilized enzyme reactor (Bioanalytical Systems), and an electrochemical detector (Coulchem II; ESA, Chelmsford, MA) were coupled to the HPLC (model 9012; Varian, Walnut Creek, CA). Mobile phase (50 mM Tris/ NaClO_4 plus 1% ProClin reagent, pH 8.5) was pumped at a rate of 1 ml/min. Standard curves of ACh and choline (1–100 nM) were used for calibration. The detection limit of our HPLC system was ~ 0.1 nM in a 15- μl sample. Data were stored in a microcomputer and analyzed using a data acquisition and analysis software (Star Chromatography Workstation v4.01, Varian). ACh production in the samples was expressed as the sum of ACh plus choline detected by the HPLC system and expressed as nanomoles per liter.

Substance P measurement. Substance P concentration was measured through a competitive enzyme immunoassay kit (Cayman, Ann Arbor, MI). Samples were read at 405 nm using a Multiskan MS photometer (Labsystems Oy, Helsinki, Finland). Substance P concentration was expressed as picograms per milliliter after comparing with a standard curve made with the same kit. The working range of the substance P assay was from 3.9 to 500 pg/ml.

Ca^{2+} measurement in guinea pig tracheal myocytes. Airway smooth muscle from guinea pig trachea was placed in 5 ml of Hanks' solution containing 2 mg of cysteine and 0.05 U/ml papain and incubated for 10 min at 37°C. The tissue was washed with Leibovitz's solution to remove the enzyme excess and then placed in a Krebs solution containing 1 mg/ml collagenase type I and 4 mg/ml dispase II (neutral protease) for ~ 10 min at 37°C. The tissue was gently dispersed by mechanical agitation until detached cells were observed. Enzymatic activity was stopped by adding Leibovitz's solution, the cells were centrifuged at 600 rpm for 5 min, and the supernatant was discarded. This last step was repeated once again. Afterward, cells were loaded with 0.5 μM fura-2/AM in low Ca^{2+} (0.1 mM) at room temperature (22–25°C). After 1 h, cells were allowed to settle down into a heated perfusion chamber with a glass cover in the bottom. This chamber was mounted on an inverted microscope (Diaphot 200; Nikon, Tokyo, Japan), and the cells adhered to the glass were continuously perfused at a rate of 2–2.5 ml/min with Krebs solution (composition in mM: NaCl 118, KCl 4.6, CaCl_2 2.0, MgSO_4 1.2, NaHCO_3 25, KH_2PO_4 1.2, glucose 11, 37°C, equilibrated with 5% CO_2 in oxygen, pH 7.4).

Cells loaded with fura-2 were exposed to alternating pulses of 340 and 380 nm excitation light, and emission light was collected at 510 nm using a microphotometer (Photon Technology International, Princeton, NJ). Background fluorescence was automatically subtracted and determined by removing the cell from the field before starting the experiments. The fluorescence acquisition was obtained every 0.5 s. Intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) was calculated according to the formula of Grynkiewicz et al. (20). The K_d of fura-2 was assumed to be 386 nM (24). The mean 340:380 fluorescence ratios for R_{max} and R_{min} were obtained by exposing the cells to 10 mM Ca^{2+} in presence of 10 μM ionomycin and in Ca^{2+} -free Krebs with 1.11 mM EGTA, respectively. R_{max} was 8.99 and R_{min} 0.35. The fluorescence ratio at 380-nm light excitation in Ca^{2+} -free Krebs solution and Ca^{2+} -saturated cells (β) was 4.9.

Single myocytes were first stimulated with 10 μM carbachol, perfused with Krebs solution for 15 min, and then challenged with 10 μM paraoxon for 4 min, adding 10 μM carbachol in the last 2 min.

Drugs. Parathion (*O,O*-diethyl *O*-4-nitrophenyl phosphorothioate) and paraoxon (*O,O*-diethyl *O*-4-nitrophenyl phosphate) (Riedel-de Haën, Seelze, Germany) were dissolved in propylene glycol and ethanol (10:1.5 vol/vol). Physostigmine hemisulphate, ACh chloride, carbamylcholine chloride (carbachol), DL-propranolol hydrochloride, tetrodotoxin, ω -CTX, choline chloride, salbutamol, and forskolin were all purchased from Sigma (St. Louis, MO). Methoctramine tetrahydrochloride was purchased from ICN Pharmaceuticals (Costa Mesa, CA). AF-DX 116 was purchased from Tocris Bioscience (Bristol, United Kingdom). L-732138 was purchased from Biomol Research Laboratories (Plymouth Meeting, PA). Forskolin and AF-DX 116 were dissolved in dimethyl sulphoxide and L-732138 in ethanol while the other drugs were dissolved in 0.9% NaCl. Parenteral salbutamol sulphate (Ventolin) was purchased from Glaxo-Wellcome and aminophylline (Aminoflin) from Laboratorios Pisa SA (Guadalajara, Mexico).

Statistical analysis. Most data were evaluated through one-way or repeated-measures ANOVA, followed by Bonferroni multiple comparisons test or Dunnett's test. Substance P detection was analyzed through Mann-Whitney *U* test. Statistical significance was set at two-tailed $P < 0.05$, and assessed using GraphPad InStat v3.05. Data are expressed in the text and figures as means \pm SE, excepting substance P concentration, which was expressed as median and range.

RESULTS

In vivo studies. We corroborated that the parathion dose used in our in vivo experiments (10 mg/kg) caused (90 min later) a $97.8 \pm 0.8\%$ and $67.3 \pm 4.9\%$ inhibition of AChE activity in guinea pig lung homogenates and plasma, respectively ($n = 5$ for each group; Fig. 1A).

Administration of parathion to control male guinea pigs caused a progressive increase of the basal Penh values in up to 250%, from 0.213 ± 0.010 to 0.566 ± 0.080 , $n = 7$, and remained unchanged until the end of the recording period (Fig. 2).

Salbutamol (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ip) caused a 31% decrease ($P < 0.05$) of the ongoing parathion-induced bronchoconstriction 5 min after its intraperitoneal administration, compared with the averaged Penh values in the previous 10-min period (Fig. 3). After this transient relaxation, Penh was raised again as to reach the same values as before salbutamol administration. A higher salbutamol dose (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ip) also produced this paradoxical reconstriction, though somewhat delayed in time (data not shown). By contrast, aminophylline produced a progressive decrement ($P < 0.05$ to $P < 0.001$) of the parathion-induced bronchoconstriction that was maximal at 20 min (77% decrement) and remained relatively unchanged thereafter.

In vitro studies. In guinea pig lung homogenates, we confirmed that paraoxon and physostigmine caused (3 min later) a concentration-dependent inhibition of AChE activity (Fig. 1B). Specifically, at the concentration used in the present study (10 μM) either paraoxon or physostigmine produced $99.9 \pm 0.1\%$ inhibition of AChE activity ($n = 4$ for each group).

Addition of paraoxon to organ baths produced a sustained smooth muscle contraction of guinea pig tracheal rings (Fig. 4A). This response was not modified by previous incubation with ω -CTX or TTX (Fig. 4B), but was fully prevented and reverted

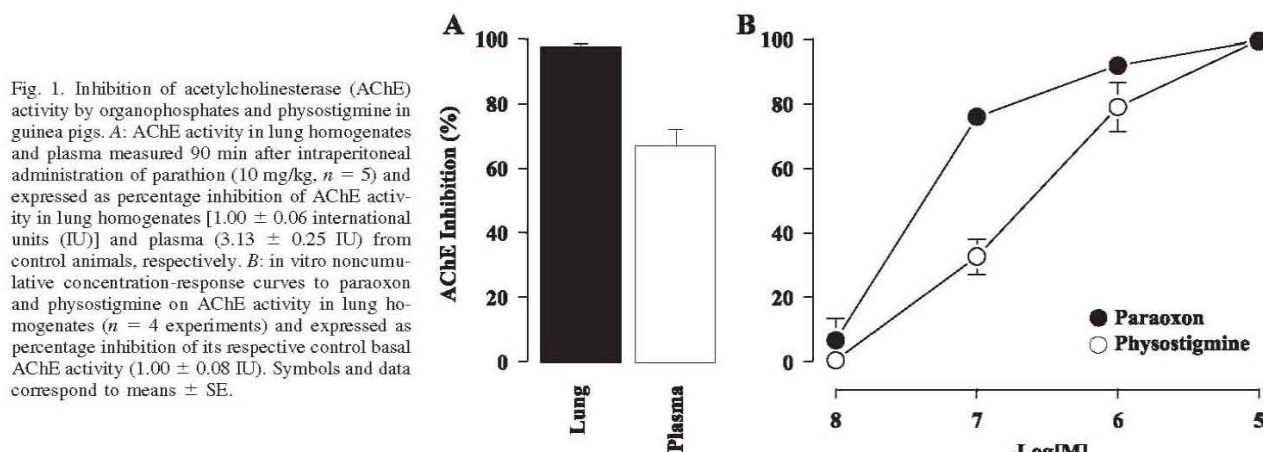


Fig. 1. Inhibition of acetylcholinesterase (AChE) activity by organophosphates and physostigmine in guinea pigs. *A*: AChE activity in lung homogenates and plasma measured 90 min after intraperitoneal administration of parathion (10 mg/kg, $n = 5$) and expressed as percentage inhibition of AChE activity in lung homogenates [1.00 ± 0.06 international units (IU)] and plasma [3.13 ± 0.25 IU] from control animals, respectively. *B*: in vitro noncumulative concentration-response curves to paraoxon and physostigmine on AChE activity in lung homogenates ($n = 4$ experiments) and expressed as percentage inhibition of its respective control basal AChE activity (1.00 ± 0.08 IU). Symbols and data correspond to means \pm SE.

by atropine (Fig. 4, *C* and *D*). In some tissues, we corroborated that these ω -CTX and TTX concentrations were enough to abolish or significantly diminish, respectively, the contractile response induced by electrical field stimulation (data not shown). Elimination of epithelium and connective tissue from the airway preparation not only did not interfere with the contractile effect of paraoxon, but it caused an increased response to this organophosphate, compared with whole tracheal rings ($190.3 \pm 39.3\%$ vs. $102.1 \pm 11.4\%$ of KCl contraction, respectively; $P < 0.02$). This last response was not modified by TTX pretreatment ($188.0 \pm 41.7\%$ of KCl contraction).

Salbutamol (100 nM) administered during the paraoxon-induced contraction produced a temporary relaxation of $\sim 50\%$ (Figs. 5 and 6) 10–20 min after its administration. From this point onwards, tissues began to contract again but without reaching the initial maximal paraoxon-induced contraction. A similar pattern was observed when tissues were precontracted with carbachol instead of paraoxon (Fig. 6). We corroborated that the relaxation induced by salbutamol was due to β -adrenoceptor stimulation, since preincubation with propranolol completely abolished this response (Fig. 5).

The M_2 antagonist methoctramine did not modify the ongoing paraoxon-induced contraction (Fig. 4*E*), but fully prevented the paradoxical contraction occurring after the transient salbutamol-induced relaxation, favoring a sustained relaxing response of $\sim 90\%$ (Fig. 5). In this same context, a lower

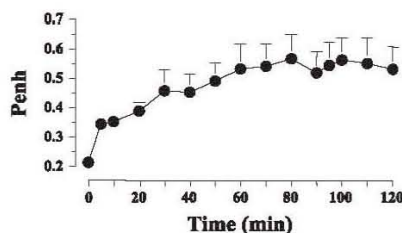


Fig. 2. Effect of parathion in in vivo experiments. Parathion (10 mg/kg ip) induced a progressive increase of the Penh value in male guinea pigs and remained relatively unchanged until the end of the recording period. Symbols represent the means \pm SE of $n = 7$ animals.

concentration of salbutamol (32 nM) induced a partial relaxation of the carbachol-induced contraction, and methoctramine (administered during the plateau of such relaxing response) was able to completely relax the tissue (Fig. 4*F*). Likewise, AF-DX 116 did not affect the paraoxon-induced contraction in tracheal rings, but permitted a complete relaxing effect of salbutamol ($140.4 \pm 27.1\%$ relaxation, not shown). Additionally, we found that tissue incubation with the NK_1 receptor antagonist L-732138 allowed salbutamol to fully relax the tracheal rings and almost abolished the paradoxical recontraction (Fig. 7). By contrast, forskolin completely relaxed the paraoxon response from 10 min ahead (Fig. 6). Some of these phenomena were essentially reproduced when physostigmine was used instead of paraoxon (Fig. 8).

ACh and substance P measurements. As can be seen in Fig. 9, control levels of ACh released from tracheal rings during a 60-min incubation with physostigmine had a tendency to increase when 1, 10, or 100 nM salbutamol was administered in the second half of this period, reaching statistically significant

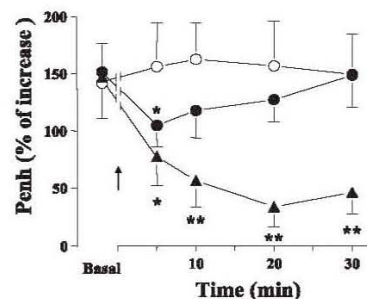


Fig. 3. Effect of bronchodilators on the parathion-induced bronchoobstruction in guinea pigs submitted to barometric plethysmography. The arrow indicates the intraperitoneal administration of salbutamol (●, 10 μ g/kg), aminophylline (▲, 40 mg/kg), or saline solution (○, control group) during the ongoing bronchoobstruction induced by parathion (10 mg/kg). Basal values were obtained by averaging the Penh values from the last 10 min before bronchodilators administration. Symbols represent the means \pm SE of $n = 7$ animals in each group. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with their respective basal value (repeated-measures ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test).

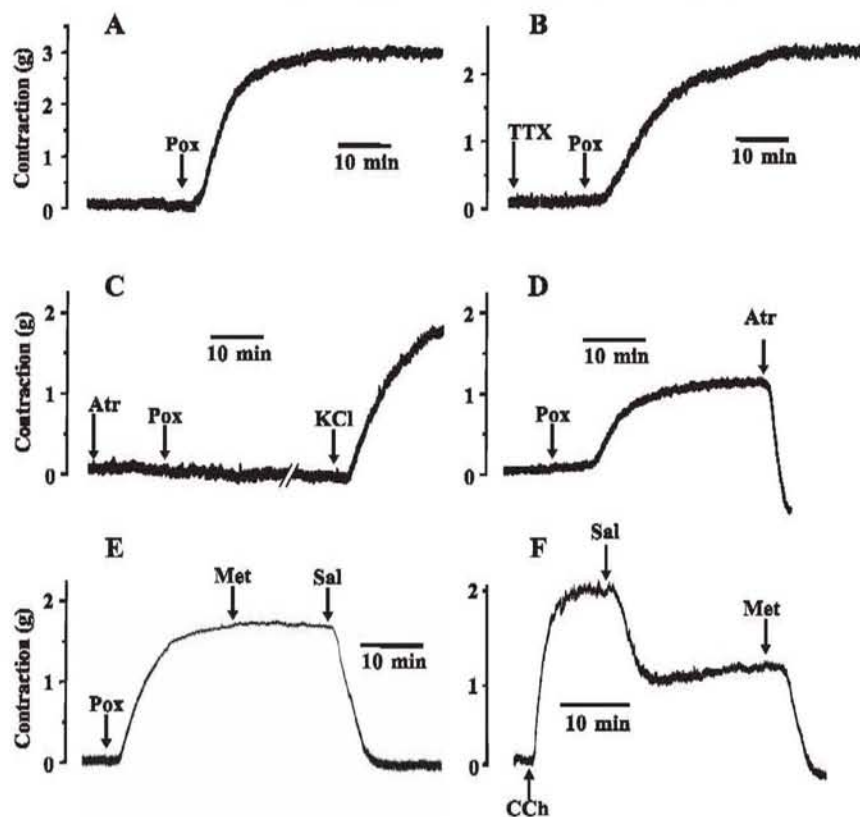


Fig. 4. Representative recordings of the effect of paraoxon in in vitro experiments. Paraoxon produced a sustained smooth muscle contraction of the guinea pig tracheal rings (A). This response was not modified by previous incubation with TTX (B) but was completely blocked (C) and reverted (D) by atropine. Methotrime did not modify the contraction induced by paraoxon but potentiated the relaxation induced by 0.1 μ M salbutamol (Sal) (E) and removed the functional antagonism between carbachol (CCh) (0.32 μ M) and salbutamol (0.032 μ M) (F). Pox, paraoxon (10 μ M); Atr, atropine (1 μ M); KCl, potassium chloride (60 mM); Met, methotrime (0.31 μ M); TTX, tetrodotoxin (10 μ M).

difference at the intermediate concentration. On the other hand, addition of 100 nM salbutamol significantly increased the concentration of substance P recovered in the organ bath fluid (median 34.9 pg/ml, range 32.0–79.4), compared with control

tissues without salbutamol (median <3.9 pg/ml, range <3.9–9.4; $P < 0.0001$; Fig. 10).

Single cell studies. Baseline concentration of $[Ca^{2+}]_i$ in airway myocytes was 49 ± 7 nM, $n = 4$. Carbachol addition

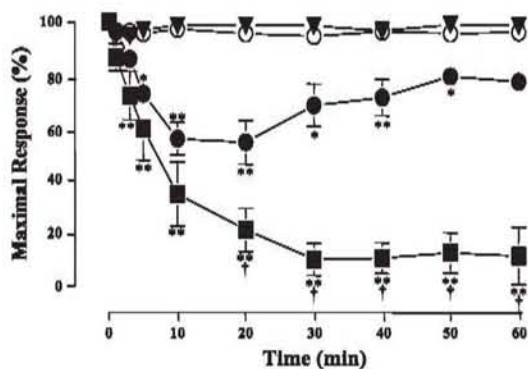


Fig. 5. Effect of M_2 receptor antagonism on the salbutamol response during the paraoxon-induced contraction in tracheal rings. Paraoxon (\circ , 10 μ M, $n = 11$) induced a contractile response, which was partially reversed by salbutamol (\bullet , 0.1 μ M, $n = 11$) with a tendency to contract again from 10 min onward. The paradoxical contraction occurring after the transient salbutamol-induced relaxation was fully abolished by the M_2 antagonist methotrime favoring a relaxing response of $\sim 90\%$ (\blacksquare , 0.31 μ M, $n = 8$). Propranolol (\blacktriangledown , 1 μ M, $n = 6$) completely abolished the salbutamol relaxant effect. Symbols represent the means \pm SE. $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$ compared with the paraoxon group and $\dagger P < 0.01$ compared with the paraoxon-salbutamol group (one-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test).

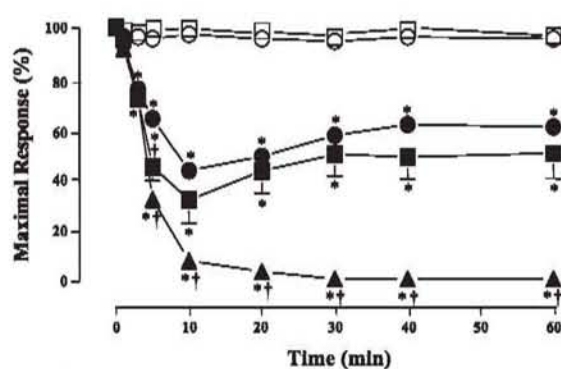


Fig. 6. Effect of salbutamol and forskolin on the paraoxon-induced contraction in tracheal rings. Paraoxon (\circ , 10 μ M, $n = 11$) induced a contractile response, which was partially reversed by salbutamol (\bullet , 0.1 μ M, $n = 11$) with a tendency to contract again from 10 min onward. Forskolin (\blacktriangle , 1 μ M, $n = 7$) completely abolished the paraoxon-induced contraction. The sustained contraction induced by carbachol (\square , 0.32 μ M, $n = 8$) was moderately reversed by salbutamol following a similar pattern as was observed in the paraoxon group (\blacksquare , 0.1 μ M, $n = 11$). Symbols represent the means \pm SE. $*P < 0.01$ compared with their respective control group; $\dagger P < 0.01$ compared with the paraoxon-salbutamol group (one-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test).

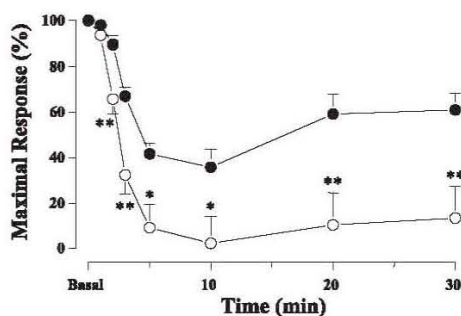


Fig. 7. Effect of a neurokinin-1 (NK₁) antagonist on the salbutamol response during the paraoxon-induced contraction in tracheal rings. The paradoxical contraction occurring after the transient salbutamol-induced relaxation (●, *n* = 10) was fully abolished by the NK₁ receptor antagonist (L-732138; ○, *n* = 11) favoring a complete relaxing response. Symbols represent the means ± SE. **P* < 0.05 and ***P* < 0.01 compared with the paraoxon-salbutamol group (nonpaired Student's *t*-test).

caused a transient Ca²⁺ peak followed by a plateau (Fig. 11). Paraoxon did not modify the [Ca²⁺]_i or the response to a superimposed stimulation with carbachol.

DISCUSSION

In the present study, we found that, under conditions of AChE inhibition, salbutamol induced the release of substance P, and to a lesser extent ACh, with a subsequent contraction large enough to overcome its relaxing effect.

Parathion is an organophosphate pesticide with a well known and potent inhibitory effect on AChE activity (8, 35) mediated through its active metabolite, paraoxon. One toxicological consequence of the resulting ACh accumulation is airway obstruction, which in *in vivo* conditions has been postulated to be mediated by a combination of airway smooth muscle contraction, augmented mucous secretion, and edema (35). In the present work, we found that the main physiopathological mechanism involved in the organophosphate-induced airway obstruction was the smooth muscle contraction, since in *in vivo* conditions aminophylline rapidly reverted much of this

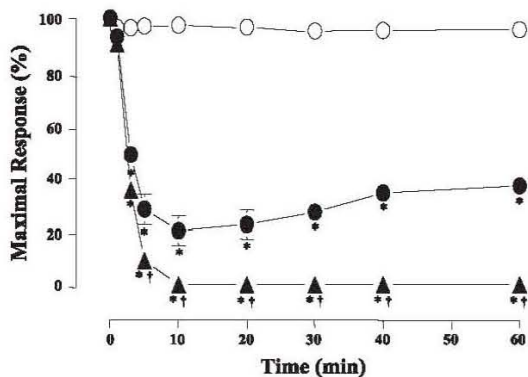


Fig. 8. Effect of physostigmine on guinea pig tracheal rings. Physostigmine administration (○, 10 μM, *n* = 9) induced a contractile response. Salbutamol addition (●, 0.1 μM, *n* = 9) induced a temporary relaxation, but forskolin (▲, 1 μM, *n* = 5) completely reversed it. Symbols represent the means ± SE. **P* < 0.01 compared with physostigmine group; †*P* < 0.01 compared with salbutamol group (one-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test).

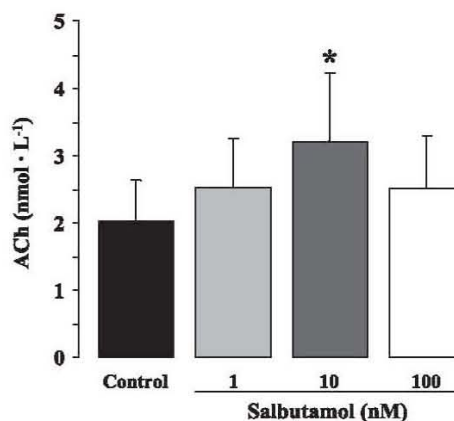


Fig. 9. Effect of salbutamol on ACh release from tracheal rings incubated with physostigmine for 60 min. Tissues were incubated for the last 30 min with different concentrations of salbutamol and compared with control tissues. Bars and vertical lines represent the means ± SE of *n* = 11 animals. **P* < 0.05 (repeated-measures ANOVA with Dunnett's test).

obstruction (71%; Fig. 3), while forskolin caused a rapid and complete relaxation of the paraoxon-induced contraction *in vitro* (Fig. 6). The cholinergic nature of this response was confirmed by the total abolishment of the contraction by atropine in the *in vitro* preparation. This response, however, was TTX- and ω-CTX-resistant, suggesting that spontaneous ACh release involves mechanisms other than those classically occurring during neuronal depolarization. Such additional mechanisms have been already postulated by others (1). Because there is good evidence that minute amounts of ACh may also be produced by nonneuronal sources (27, 29), an alternative possibility is that ACh was not coming from nerves but from other airway cell types. In separate experiments, we ruled out a major role of airway epithelium as additional source of ACh in the organophosphate-induced contraction, but further experiments are needed to discard other sources such as airway smooth muscle (41).

Contrasting with forskolin and aminophylline, salbutamol was unable to induce a sustained relaxation (*in vitro*) or bronchodilation (*in vivo*) and, furthermore, its moderate and

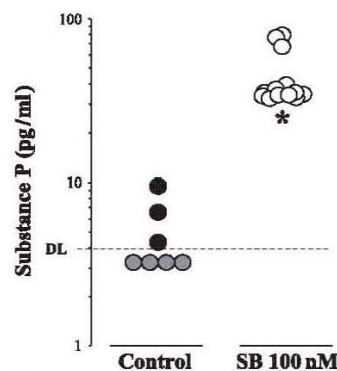


Fig. 10. Effect of salbutamol on substance P release from tracheal rings. Symbols represent the substance P concentration accumulated during 60-min incubation with 10 nM paraoxon without (control group, *n* = 7) or with salbutamol (SB; 100 nM, *n* = 13) for the last 30 min. DL, detection limit. **P* < 0.0001 (Mann-Whitney *U* test).

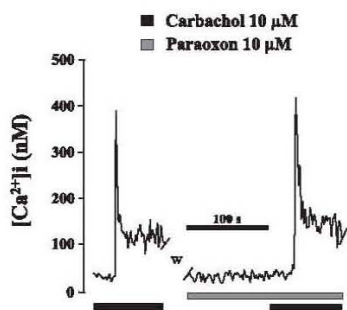


Fig. 11. Effect of paraoxon on the carbachol-induced intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) changes in single airway smooth muscle cells. Carbachol addition caused a transient Ca^{2+} peak, followed by a plateau (filled bar, $n = 4$). Paraoxon incubation did not modify the response to a superimposed stimulation with carbachol (hatched bar). W, washing.

transient relaxing effect was rapidly overlapped by an additional contraction. At least in the *in vivo* experiments, the dose used in our study (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ip) was close to the intravenous dose recommended for the acute relief of severe asthmatic bronchospasm in children (5). Additionally, in a previous work (35), we found that aerosolized salbutamol at therapeutic doses used in humans (2 mg/ml, 2 min) also produced the paradoxical effect. Thus the paradoxical effect of salbutamol in guinea pigs occurred at doses equivalent to those used in humans.

In addition to their main pharmacological effect on airways (relaxation of smooth muscle), several studies have demonstrated that salbutamol and other β_2 -adrenoceptor agonists are capable of stimulating vagal nerve ends to induce ACh release (11, 44–46). This might explain the increment of ACh concentration observed in the organ bath fluids after salbutamol administration. Nevertheless, this increment was small enough as to raise doubts about its potential role in the paradoxical recontraction induced by salbutamol.

Contrasting with the ACh results, salbutamol was able to induce a significant increase of substance P concentration. This last tachykinin may explain the secondary contraction observed during the salbutamol response, which is in agreement with the almost full relaxation occurring during the antagonism of NK_1 receptors. It is well known that an extensive network of tachykinin-containing nerve ends (C fibers) is located within and below the airway epithelium, including the trachea (38, 42). Thus one possible explanation of salbutamol-induced tachykinin release is that salbutamol directly stimulates C fibers. However, to our knowledge, the presence of prejunctional β_2 -adrenoceptors in C fibers has not been described so far, and thus this possibility requires further demonstration. The possible role of C fibers is in agreement with a recent work by Keir et al. (25). They demonstrated that a 10-day treatment with β_2 -adrenoceptor agonist (RS- and S-albuterol) induced bronchial hyperresponsiveness (BHR) in sensitized and non-sensitized guinea pigs. The development of BHR was prevented by capsaicin treatment, suggesting a role of sensory nerves (C fibers) in this phenomenon.

In our *in vitro* studies, we found that the transitory character of the relaxation induced by salbutamol was similarly observed during the contraction induced either by paraoxon, physostigmine (a nonorganophosphate compound), or carbachol, suggesting that increased concentrations of ACh in the micro-

environment surrounding the smooth muscle is necessary for the paradoxical effect of salbutamol to take place. Cholinergic contraction of smooth muscle involves activation of both M_3 and M_2 receptors. The latter is known to be coupled to G_i protein and hence to produce inhibition of adenylate cyclase (33). Thus mechanisms induced by M_2 receptor activation are particularly opposed to those produced during β_2 -adrenoceptor stimulation. This functional antagonism between M_2 and β_2 -receptors has been already reported (6, 16) and might be largely involved in our results, inasmuch as the blockade of M_2 receptors by methoctramine or AF-DX 116 enhanced the salbutamol-induced relaxation and abolished the paradoxical effect. We were able to demonstrate the existence of this functional antagonism by using a slightly lower concentration of salbutamol (32 nM). In these experiments, salbutamol caused an $\sim 50\%$ relaxation of the carbachol-induced contraction, and the subsequent blockade of M_2 receptors by methoctramine produced a rapid and complete relaxation of the tissues (Fig. 4F). In summary, our results strongly suggest that at least two mechanisms are involved in the paradoxical effect of salbutamol during an acute organophosphate intoxication: 1) the functional antagonism between M_2 and β_2 -receptors; and 2) the salbutamol-induced release of substance P.

However, additional mechanisms might also be involved. For example, van den Beukel et al. (39) studied the effect of parathion and paraoxon on Chinese hamster ovary cells transfected with muscarinic M_3 receptors. They concluded that these organophosphates act as agonists on M_3 receptors (which, in airway smooth muscle, mediate the ACh contractile effect). In this context, we did not find a direct effect of paraoxon in single airway smooth muscle cells. On the other hand, Fryer et al. (18) and Lein and Fryer (26) recently postulated that organophosphate insecticides induce BHR through a decrease in the neuronal M_2 muscarinic receptor function. This prejunctional receptor limits the release of ACh from pulmonary vagal nerves (19) and thus its inhibition by organophosphates would favor the release of this neurotransmitter if a subsequent neural stimulation takes place. To what extent these mechanisms are participating in the paradoxical effect of salbutamol remains to be elucidated.

Exposure to organophosphate pesticides may worsen symptoms in asthmatic patients or induce respiratory complaints such as wheezing in nonasthmatic subjects (3, 22, 32, 43). In the case that an organophosphate poisoning is recognized, the appropriate treatment with oximes and atropine is likely to be started. Nevertheless, in many cases, organophosphate poisoning is low-grade in nature, and the exposure history to organophosphate might not always be evident (22, 37). In this last setting, it is expected that a β_2 -adrenoceptor agonist such as salbutamol is administered for the treatment of wheezing. In this context, our current results in these *in vivo* and *in vitro* models of organophosphate pesticide intoxication allow us to speculate that effectiveness of such treatment might be less than expected or may even worsen the bronchial obstruction. This last speculation warrants further investigation. Additionally, clinical studies in asthma have found that chronic treatment with β_2 -adrenoceptor agonists worsens asthma control (34) and induces BHR to a number of bronchoconstrictor stimuli, including methacholine, histamine, exercise, and allergen (10, 23, 34, 40). Therefore, one possible explanation of this

adverse effect of salbutamol could be related to its effect on tachykinin release.

According to our results, we concluded that: 1) organophosphates caused smooth muscle contraction by accumulation of ACh released through a TTX- and ω -CTX-resistant mechanism; 2) during such contraction, salbutamol relaxation is functionally antagonized by the stimulation of M₂ receptors; and 3) after this transient salbutamol-induced relaxation, a paradoxical contraction ensues due to substance P release. Thus further studies on the potential adverse effect of salbutamol during organophosphate-induced bronchoobstruction in humans are warranted.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

GRANTS

This study was partially supported by Dirección General de Apoyo al Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) Grant IN203502.

REFERENCES

- Aas P, Gaudry-Talarmin YM, Fonnun F. Effect of AH5183 (vesamicol) on cholinergic transmission in intact airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 199; 357–362, 1991.
- Adler A, Cieslewicz G, Irvin CG. Unrestrained plethysmography is an unreliable measure of airways responsiveness in BALB/c and C57BL/6 mice. *J Appl Physiol* 97: 286–292, 2004.
- Beard J, Sladden T, Morgan G, Berry G, Brooks L, McMichael A. Health impacts of pesticide exposure in cohort of outdoor workers. *Environ Health Perspect* 111: 724–730, 2003.
- Bergren DR. Chronic tobacco smoke exposure increases airway sensitivity to capsaicin in awake guinea pigs. *J Appl Physiol* 90: 695–704, 2001.
- Browne GJ, Penna AS, Phung X, Soo M. Randomised trial of intravenous salbutamol in early management of acute severe asthma in children. *Lancet* 349: 301–305, 1997.
- Buckner CK, Saini RK. On the use of functional antagonist to estimate dissociation constants for beta adrenergic receptor agonists in isolated guinea-pig trachea. *J Pharmacol Exp Ther* 194: 565–574, 1975.
- Carbajal V, Vargas MH, Flores-Soto E, Martínez-Cordero E, Bazán-Perkins B, Montaña LM. 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–L92, 2005.
- Chambers JE, Carr RL. Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticidal toxicity. *Toxicology* 105: 291–304, 1995.
- Chong BT, Agrawal DK, Romero FA, Townley RG. Measurement of bronchoconstriction using whole-body plethysmograph: comparison of freely moving versus restrained guinea pigs. *J Pharmacol Toxicol Methods* 39: 163–168, 1998.
- Cockerott DW, McParland CP, Britto SA, Swystun VA, Rutherford BC. Regular inhaled salbutamol and airway responsiveness to allergen. *Lancet* 342: 833–837, 1993.
- De Haas JRA, Terpstra S, Van Der Zwaag M, Kockelbergh PGE, Roffel AD, Zaagsma J. Facilitatory β_2 -adrenoceptors on cholinergic and adrenergic nerve endings of the guinea pig trachea. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 276: L420–L425, 1999.
- Delaunois A, Gustin P, Ansay M. Metabolism and pulmonary toxicity of pesticides in mammals. *Ann Méd Vét* 135: 157–174, 1991.
- Drorbaugh JE, Fenn WO. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics* 16: 81–87, 1955.
- Elman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88–95, 1961.
- Epstein MA, Epstein RA. A theoretical analysis of the barometric method for measurement of tidal volume. *Respir Physiol* 32: 105–120, 1978.
- Fernandes LB, Fryer AD, Hirshman CA. M₂ muscarinic receptors inhibit isoproterenol-induced relaxation of canine airway smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 262: 119–126, 1992.
- Freudenthal W, Ralston M. Toxicity organophosphates [Online]. <http://www.emedicine.com/ped/topic1660.htm>
- Fryer AD, Lein PJ, Howard AS, Yost BL, Beckles RA, Jett DA. Mechanisms of organophosphate insecticide-induced airway hyperreactivity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L963–L969, 2004.
- Fryer AD, Maclagan J. Muscarinic inhibitory receptors in pulmonary parasympathetic nerves in the guinea pigs. *Br J Pharmacol* 83: 973–978, 1984.
- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440–3450, 1985.
- Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, Gelfand EW. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 766–775, 1997.
- Hoppin JA, Umbach DM, London SJ, Alavanja MCR, Sandler DP. Chemical predictors of wheeze among farmer pesticide applicators in the agricultural health study. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 683–689, 2002.
- Inman MD, O'Byrne PM. The effect of regular inhaled albuterol on exercise-induced bronchoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 65–69, 1996.
- Kajita J, Yamaguchi H. Calcium mobilization by muscarinic cholinergic stimulation in bovine single airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 264: L496–L503, 1993.
- Keir S, Page C, Spina D. Bronchial hyperresponsiveness induced by chronic treatment with albuterol: role of sensory nerves. *J Allergy Clin Immunol* 110: 388–394, 2002.
- Lein PJ, Fryer AD. Organophosphorus insecticides induce airway hyperreactivity by decreasing neuronal M₂ muscarinic receptor function independent of acetylcholinesterase inhibition. *Toxicol Sci* 83: 166–176, 2005.
- Lessire F, Gustin P, Delaunois A, Bloden S, Nemmar A, Vargas M, Ansay M. Relationship between parathion and paraoxon toxicokinetics, lung metabolic activity, and cholinesterase inhibition in guinea pig and rabbit lungs. *Toxicol Appl Pharmacol* 138: 201–210, 1996.
- Lewis RT, Macleod AM, Merchant KJ, Kelleher F, Sanderson I, Herbert RH, Cascieri MA, Sadowski S, Ball RG, Hoogsteen K. Tryptophan-derived NK1 antagonists: conformationally constrained heterocyclic bioisosteres of the ester linkage. *J Med Chem* 38: 923–933, 1995.
- Lips KS, Volk C, Schmitt BM, Pfeil U, Arndt P, Miska D, Ermer L, Kummer W, Koepsell H. Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33: 79–88, 2005.
- Potter PE, Meek JL, Neff NH. Acetylcholine and choline in neuronal tissue measured by HPLC with electrochemical detection. *J Neurochem* 41: 188–194, 1983.
- Racké K, Matthiesen S. The airway cholinergic system: physiology and pharmacology. *Pulm Pharmacol Ther* 17: 181–198, 2004.
- Salameh PR, Baldi I, Brochard P, Raheison C, Abi Saleh B, Salamon R. Respiratory symptoms in children and exposure to pesticides. *Eur Respir J* 22: 507–512, 2003.
- Schramm CM, Arjona NC, Grunstein MM. Role of muscarinic M₂ receptors in regulating β -adrenergic responsiveness in maturing rabbit airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 269: L783–L790, 1995.
- Sears MR, Taylor DR, Print CG, Lake DC, Li Q, Flannery EM, Yates DM, Lucas MK, Herbison GP. Regular inhaled beta-agonist treatment in bronchial asthma. *Lancet* 336: 1391–1396, 1990.
- Segura P, Chavez J, Montaña LM, Vargas MH, Delaunois A, Gustin P. Identification of mechanisms involved in the acute airway toxicity induced by parathion. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 360: 699–710, 1999.
- Taylor P. Anticholinesterase agents. In: *Goodman & Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics* (7th ed.), edited by Rall TW and Murad F. New York: MacMillan, 1985, vol. 1, p. 100–119.
- Tinoco-Ojanguren R, Halperin DC. Poverty, production, and health: inhibition of erythrocyte cholinesterase via occupational exposure to organophosphate insecticides in Chiapas, Mexico. *Arch Environ Health* 53: 29–35, 1998.
- Udem BJ, Chuaychoo B, Lee MG, Weinreich D, Myers AC, Kollarik M. Subtypes of vagal afferent C-fibres in guinea-pig lungs. *J Physiol* 556: 905–917, 2004.
- van den Beukel I, van Kleef R, Oortgiesen M. Direct functional effects of parathion and paraoxon on neuronal nicotinic and muscarinic M₃ acetylcholine receptors. *Altern Lab Anim* 24: 191–199, 1996.

40. van Schayck CP, Graafma SJ, Visch MB, Dompeling E, van Weel C, van Herwaarden CL. Increased bronchial responsiveness after inhaling salbutamol during 1 year is not caused by subsensitisation to salbutamol. *J Allergy Clin Immunol* 86: 793–800, 1990.
41. Wessler IK, Kirkpatrick CJ. The non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm Pharmacol Ther* 14: 423–434, 2001.
42. Widdicombe JG. Autonomic regulation. i-NANC/e-NANC. *Am J Respir Crit Care Med* 158: S171–S175, 1998.
43. Zhang LX, Enarson DA, He GX, Li B, Chan-Yeung M. Occupational and environmental risk factors for respiratory symptoms in rural Beijing, China. *Eur Respir J* 20: 1525–1531, 2002.
44. Zhang XY, Robinson NE, Wang ZW, Lu MC. Catecholamine affects ACh release in trachea: α_2 -mediated inhibition and β_2 -mediated augmentation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 268: L368–L373, 1995.
45. Zhang XY, Robinson NE, Zhu FX. Modulation of ACh release from airway cholinergic nerves in horses with recurrent airway obstruction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 276: L769–L775, 1999.
46. Zhang XY, Zhu FX, Olszewski MA, Robinson E. Effects of enantiomers of β_2 -agonists on ACh release and smooth muscle contraction in the trachea. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 274: L32–L38, 1998.

