



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

# **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Caracterización farmacológica de los receptores  
serotonérgicos involucrados en la contracción y  
relajación del músculo liso de las vías aéreas de  
cobayo**

## **T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)**

**P R E S E N T A**

**MAESTRA EN CIENCIAS PATRICIA CAMPOS BEDOLLA**

**DIRECTORES DE TESIS:**

**DR. LUIS MANUEL MONTAÑO RAMÍREZ  
DR. MARIO HUMBERTO VARGAS BECERRA**

**MÉXICO, D.F.**

**MAYO, 2011**

---



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

# DEDICATORIA

---

## EN MEMORIA

A ti, mí siempre amada hija **María José**,  
Me enseñaste lo que significa el amor  
incondicional y lo que es ser una gran guerrera en  
esta vida.

Gracias por existir, eres el más grande orgullo de  
mi vida!! *¡¡Recorraste tanto y nunca caminaste,  
dijiste tanto y nunca hablaste!!*

A mí amada **Chacha linda**,  
Mamá aún en tu ausencia, siempre estás conmigo.  
Gracias por ese gran amor que nos diste siempre.

A mi abuelita **Teresita**,  
Por todas sus enseñanzas y por las decisiones que  
tomaste en tu vida, nosotros ahora estamos aquí.

A mi **Chacho** adorado, papi querido, por tu intenso  
amor a nosotros, tus hijas y tus nietos. Y por ser  
siempre un gran ejemplo de tenacidad y fortaleza.  
¡Te admiro mucho!

A mis hermanas, **Rosy** y **Andy**, por esa gran  
complicidad y apoyo incondicional en la vida.  
**Arturo** y **Gabriel** que acompañan a mis más  
grandes cómplices.

A mis sobrinos **Valentina**, **Constanza**, **Emiliano** y  
**Julia** porque cada uno de ustedes me da luz a mi  
corazón.

A ustedes que siempre están en mi corazón...

¡¡LOS AMO!!

¡¡MUCHAS GRACIAS!!

---

## AGRADECIMIENTOS

---

Esta tesis es el resultado de la participación y la colaboración de muchas personas e instituciones a lo largo de su elaboración. A todos ustedes **MUCHAS GRACIAS** por compartir este extenso recorrido!!!

Mi agradecimiento al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo brindado.

Agradezco al **Instituto Mexicano del Seguro Social** por el apoyo constante en mi formación académica y laboral, en particular a la Coordinación de Investigación en Salud y la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas. De manera especial al Dr. Israel Grijalva Otero y a la Dra. Sandra Orozco, quienes me han otorgado su apoyo incondicional para concluir esta meta. Comparto este agradecimiento con el **Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias**, principalmente al Departamento de Investigación de Hiperreactividad Bronquial lugar donde realicé el trabajo experimental. También quiero dar las gracias a la Dra. Patricia Segura, quien dirige este departamento por su apoyo, cariño y solidaridad. Del mismo modo, mi gratitud al Dr. Moisés Selman Lama, Director de Investigación del INER, y a la Dra. Annie Pardo quienes me han apoyado de manera significativa. Además agradezco al jefe y personal del bioterio de este Instituto por su gran apoyo.

A mi alma mater, la **Universidad Nacional Autónoma de México** mi gratitud y reconocimiento por la riqueza otorgada a mi vida, no solo por contribuir a mi formación académica, sino también en mi vida personal. En particular a la Facultad de Ciencias, UNAM y el programa de Posgrado en Ciencias Médicas, UNAM.

Mi más profunda gratitud a mis directores el Dr. Luis Montaña R. y el Dr. Mario H. Vargas B., no solo por su dirección y el apoyo absoluto en la presente tesis, sino también por todas sus horas de paciencia, enseñanza y amistad. ¡¡Gracias por todo lo compartido!!

También quiero manifestar mi agradecimiento y reconocimiento a la Dra. Selva Lucía Rivas Arancibia por su apoyo y formar parte del Comité Tutoral.

---



Muchas Gracias al jurado que participó en la revisión de la tesis, y que conforman a los sinodales, la Dra. María Lourdes Segura Valdez, la Dra. Teresa I. Fortoul van der Goes, al Dr. Mario H. Vargas Becerra, al Dr. Jorge Flores Hernández y al Dr. Alejandro Jiménez Orozco por sus importantes aportaciones y sugerencias.

Mi gratitud por la fortuna de compartir con ustedes gratos y significativos momentos en el laboratorio del INER: Paty Segura, José Luis Arreola, Bettina Sommer, Verónica Carbajal, Edgar Flores, Alejandra Figueroa y Eduardo Calixto. Y gracias también a Toñita Rodríguez por su gran soporte técnico. Estoy igualmente agradecida con mis colegas en el IMSS como el Dr. Gabriel Manjarrez, Sandra Orozco, Mely Salgado e Iris Feria, a Misael y Manuel Treto con quienes he compartido momentos amenos y agradables, no solo horas de trabajo.

A mi gran círculo de familia, amigas y amigos que me han acompañado y abrazado en esta vida: Paty, Laura, Lety, Fer, Brenda, Maritza, Adriana, Claudia, Roberto, Lupita Valiente, Sonia, Lupita Hiriart, a mis entrañables Feofitas: Cecilia, Claudita, Diana, Edna, Gaby, Lai, Lulú, Marisol y Sergio.

Y por supuesto, sin las palabras suficientes de agradecimiento a mi papá Lino y mis hermanas, Rossy y Andy, por todo su amor y cariño. A mis sobrinos que son una fuente constante de amor y esperanza, que alumbran a mi corazón y quienes junto con mis cuñados Arturo y Gabriel forman este círculo central de familia maravillosa que tengo.

**!!!MUCHAS GRACIAS!!!**

---

*La ciencia es una estrategia,  
es una forma de atar la verdad  
que es algo más que materia,  
pues el misterio se oculta detrás.*

***Luis Eduardo Aute***

---

---

---

**INDICE**

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	3
<b>LISTA DE FIGURAS Y CUADROS</b> .....	5
<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>ANTECEDENTES</b> .....	11
<b>CARACTERÍSTICAS DE LAS VÍAS AÉREAS</b> .....	11
<b>Morfología de las vías aéreas</b> .....	11
<i>Nervios eferentes</i> .....	13
<i>Nervios aferentes</i> .....	14
<i>La inervación no adrenérgica-no colinérgica</i> .....	14
<b>Mecanismos de contracción y relajación del músculo liso de las vías aéreas</b> .....	17
<i>Mecanismos de contracción del músculo liso de las vías aéreas</i> .....	17
<i>Mecanismos de relajación del MLVA</i> .....	22
<b>LA 5-HIDROXITRIPTAMINA</b> .....	29
<b>El descubrimiento de la 5-HT</b> .....	29
<b>Características generales de la 5-HT</b> .....	29
<b>Síntesis y metabolismo de la 5-HT</b> .....	31
<b>Receptores de 5-HT</b> .....	33
<b>La 5-HT en las vías aéreas</b> .....	35
<b>Efecto de la 5-HT sobre el músculo liso</b> .....	36
<b>PLANTEAMIENTO DE ESTUDIO</b> .....	41
<b>JUSTIFICACIÓN DE ESTUDIO</b> .....	42
<b>HIPÓTESIS</b> .....	43
<b>OBJETIVOS</b> .....	44
<b>Objetivo general</b> .....	44
<b>Objetivos específicos</b> .....	44
1. <i>Estudios en baños de órganos aislados</i> .....	44
2. <i>Estudios con mediciones en célula única</i> .....	45
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	46

---

---

---

<b>Animales de estudio</b> .....	46
<b>Estudios en sistema de órganos aislados <i>in vitro</i> (anillos traqueales)</b> .....	46
<b>Evaluación de mecanismos involucrados en la contracción y/o relajación inducidas por 5-HT</b> .....	47
<b>Experimentos <i>in vitro</i> con <math>\alpha</math>-metil-5-HT</b> .....	49
<b>Proceso de sensibilización</b> .....	50
<b>Estudio de registro de corrientes de <math>K^+</math> en miocitos</b> .....	51
<i>Obtención de miocitos</i> .....	51
<i>Técnica de patch clamp</i> .....	52
<b>Estudio de medición de <math>Ca^{2+}</math> intracelular (microfluorometría) en miocitos</b> .....	53
<b>Análisis estadístico</b> .....	56
<b>RESULTADOS</b> .....	57
<b>Estudios en sistema de órganos aislados <i>in vitro</i> (anillos traqueales)</b> .....	57
<b>Estudio de corrientes de <math>K^+</math> en miocitos (<i>patch clamp</i>)</b> .....	66
<b>Estudio de registro de <math>Ca^{2+}</math> intracelular en miocitos</b> .....	69
<b>DISCUSIÓN</b> .....	74
<b>Participación de la ATPasa <math>Na^+/K^+</math></b> .....	75
<b>Participación de los canales <math>BK_{Ca}</math></b> .....	76
<b>Participación de la SERCA</b> .....	77
<b>Exploración de otros mecanismos</b> .....	78
<b>Efecto de la sensibilización a ovoalbúmina sobre la relajación inducida por 5-HT</b> .....	80
<b>CONCLUSIONES</b> .....	84
<b>PERSPECTIVAS EN INVESTIGACIÓN</b> .....	85
<b>REFERENCIAS</b> .....	87

---

---



---

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
$\alpha$ -MET	$\alpha$ -Metil-5-hidroxitriptamina
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración de calcio intracelular
4-AP	4-Aminopiridina
5-HT	5-Hidroxitriptamina, 5-hidroxi-3-(2-aminoetil)-indol, serotonina
5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HTR	Receptores serotoninérgicos
AC	Adenililciclase
ACh	Acetilcolina
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
BK <sub>Ca</sub> , MaxiK	Canal de K <sup>+</sup> de alta conductancia dependiente de Ca <sup>2+</sup> .
Ca <sup>2+</sup> /CaM	Ca <sup>2+</sup> -calmodulina
CICR	Liberación de calcio inducida por calcio
CT	Toxina del cólera
CTX	Caribdotoxina
DAG	1,2-diacilglicerol
EPAC	Proteínas intercambiadoras
cGMP	Monofosfato de guanosina cíclico
GR127935	N-[4-metoxi-3-(4-metil-1piperazinil)-fenil]-2'-metil-4'-(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)-1,1'-bifenil-4-carboxamida
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
GDP	Bifosfato de guanosina
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
GTP	Trifosfato de guanosina
H <sub>4</sub> B	Tetrahidrobiopterina
IBTX	Iberiotoxina
ICI	ICI 118,551 (±)-eritro-(S*, S*)-1-[2,3-(Dihidro-7-metil-1H-inden-4-il)oxi]-3-[(1-metiletil)amino]-2-butanol
I <sub>KCa</sub>	Corrientes de K <sup>+</sup> dependientes de Ca <sup>2+</sup> de conductancia
IP <sub>3</sub>	1,4,5 trifosfato de inositol
IP <sub>3</sub> R	Receptor de IP <sub>3</sub>
K <sub>ATP</sub>	Canal de K <sup>+</sup> dependiente de ATP
K <sub>Ca</sub>	Canal de K <sup>+</sup> dependiente de Ca <sup>2+</sup>
K <sub>ATP</sub>	Canal de K <sup>+</sup> sensible a ATP
K <sub>IR</sub>	Canal de K <sup>+</sup> rectificador de la corriente
KT	Ketanserina
K <sub>V</sub>	Canal de K <sup>+</sup> rectificador tardío dependiente de voltaje
LNMMA	NG-Monometil-L-arginina
L-NAME	N <sup>ω</sup> -nitro-L-arginina metil ester
MAO <sub>A</sub>	Monoaminoxidasa A

---

---



---

MET	Metiotepina
MLC	Cadena ligera de miosina
MLC <sub>20</sub>	Cadena ligera de miosina de 20 kDA
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de miosina
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de miosina
MLCr	Cadena ligera de miosina regulatoria
MLVA	Músculo liso de las vías aéreas
NANC	No adrenérgico-no colinérgico
NCX	Intercambiador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
NO	Oxido nítrico
NOS	Sintasa del óxido nítrico
OUA	Ouabaína
PI	Fosfoinosítidos
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA	Cinasa de proteína A
PKC	Cinasa de proteína C
PKG	Cinasa de proteína G
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PLCβ	Fosfolipasa Cβ
PMCA	Ca <sup>2+</sup> -ATPasa de la membrana plasmática Bomba Ca <sup>2+</sup> -ATPasa
PNEC	Células neuroendócrinas pulmonares
PROP	Propranolol
pS	Picosiemens
ROCC	Canales de Ca <sup>2+</sup> regulados por el receptor
ROCK	Cinasa de Rho
RS	Retículo sarcoplásmico
RYR	Receptores-canales de rianodina
SACC	Canales activados por estiramiento o mecanosensibles
SB	Salbutamol
SB 204741	N-(1-Metil-1H-indolil-5-il)-N''-(3-metil-5-isotiazolil) urea
SERCA	ATPasa de Ca <sup>2+</sup> del retículo sarcoplásmico
SK <sub>Ca</sub>	Canales de K <sup>+</sup> dependientes de Ca <sup>2+</sup> de conductancia pequeña
SOCC	Canales regulados por el almacenamiento
TEA	Tetraetilamonio
TPH	Triptófano hidroxilasa
TTX	Tetrodotoxina
TR	Tropisetron ICS 205930
VOCC	Ácido (3-endo)-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il 1H indol-3-carboxílico Canales de Ca <sup>2+</sup> dependientes de voltaje
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
WAY-100135	(S)-N-tert-butil-3-(4-(2-metoxifenil)-piperazin-1-il)-2-fenilpropanamide

---

---

---

**LISTA DE FIGURAS Y CUADROS**

<b>FIGURA</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>PÁGINA</b>
1	Principales mecanismos en la dinámica de $\text{Ca}^{2+}$ a través de la membrana plasmática.	16
2	Acoplamiento farmacomecánico y electromecánico para la contracción del músculo liso.	18
3	Estructura química de 5-HT.	28
4	Síntesis y metabolismo de la 5-HT.	30
5	Mecanismos intracelulares de contracción y relajación del músculo liso inducidos por serotonina (5-HT).	35
6	Respuesta de contracción y relajación descrita por Baumgartner y col., (1990).	37
7	Método de sensibilización con ovoalbúmina (OA) en cobayos.	47
8	Respuesta de los anillos traqueales de cobayo a diferentes concentraciones de 5-HT.	51
9	Efecto de tropisetron (TR) y metiotepina (MET) en la respuesta bifásica inducida por 5-HT.	54
10	Decremento de la respuesta de relajación inducida por 5-HT por el antagonista 5-HT <sub>2A</sub> ketanserina (KT) en anillos traqueales de cobayo.	55
11	Efecto de algunos fármacos en la respuesta bifásica inducida por 5-HT en anillos traqueales de cobayo.	56
12	Efecto de caribdotoxina (CTX) y ouabaína (OUA) o de diferentes concentraciones de iberiotoxina (IBTX) en la fase de relajación inducida por 5-HT en anillos traqueales de cobayo.	57
13	Curva acumulativa concentración-respuesta en anillos traqueales de cobayo precontracturados con histamina.	58
14	Efecto de la sensibilización en la respuesta a 5-HT en anillos traqueales de cobayo.	59
15	Respuesta de anillos traqueales de cobayo a $\alpha$ -metil 5-HT ( $\alpha$ -MET) y el efecto de la ketanserina (KT) y propranolol (PROP).	60

---

16	Efecto relajador de la $\alpha$ -metil-5-HT ( $\alpha$ -MET) en anillos traqueales de cobayo precontracturados con histamina.	61
17	Efecto de la 5-HT en las corrientes de $I_{K(Ca)}$ en las células del músculo liso de las vías aéreas de cobayo.	63
18	Efecto de $\alpha$ -metil-5-HT ( $\alpha$ -MET) en las corrientes de $I_{K(Ca)}$ en las células del músculo liso de las vías aéreas de cobayo.	64
19	Efecto de la 5-HT sobre las $[Ca^{2+}]_i$ en miocito aislado de tráquea de cobayo.	66
20	Efecto de $\alpha$ -metil-5HT ( $\alpha$ -MET) sobre las $[Ca^{2+}]_i$ en miocito aislado de tráquea de cobayo.	66
21	Efecto del propranolol (PROP) en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por $\alpha$ -metil-5HT ( $\alpha$ -MET) en miocito aislado de tráquea de cobayo.	67
22	Efecto de la 5-HT en el rellenado de $Ca^{2+}$ del RS en el miocito aislado de tráquea de cobayo.	68

CUADRO	TÍTULO	PÁGINA
1	Subtipos de receptores de 5-HT y los mecanismos de transducción de señales.	33
2	Antagonistas de receptores 5-HT utilizados en este estudio.	45
3	Evaluación de mecanismos de contracción y/o relajación en el músculo liso de las vías aéreas.	45



---

---

## RESUMEN

### **Caracterización farmacológica de los receptores serotoninérgicos involucrados en la contracción y relajación del músculo liso de las vías aéreas de cobayo.**

La serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) es un neurotransmisor de los sistemas nerviosos central y periférico, y a nivel pulmonar se encuentra almacenada en células cebadas y células neuroendócrinas de las vías aéreas. Sus efectos biológicos son complejos debido a la gran variedad de sus receptores, integrados en siete familias (5-HT<sub>1-7</sub>). En diversas especies de mamíferos la 5-HT produce una contracción sostenida del músculo liso de las vías aéreas (MLVA), pero en las de cobayo y humano induce una respuesta bifásica de contracción seguida de relajación, por lo que se ha postulado que esta relajación también es un proceso activo desencadenado por la 5-HT. Todavía se desconocen muchos aspectos de los mecanismos por los cuales la 5-HT produce contracción del MLVA y, más aún, por cuales origina relajación. Por lo tanto, en este estudio evaluamos farmacológicamente los diferentes receptores y posibles mecanismos que pudieran estar participando en la contracción y la relajación inducidas por 5-HT en el MLVA de cobayo. Para ello empleamos diversas técnicas de laboratorio, tales como baño de órganos aislados y microfluorometría y registro de corrientes iónicas con *patch-clamp* en célula única.

Al analizar la respuesta temporal a dosis únicas de 5-HT confirmamos que diferentes concentraciones producen una respuesta bifásica en anillos traqueales de cobayo, siendo la de 32  $\mu\text{M}$  la más representativa, por lo que esta concentración se usó en los siguientes experimentos. La respuesta a 5-HT fue notablemente reducida por metiotepina (MET) o tropisetron (TR), y casi abolida por la combinación de ambas drogas, corroborando así que las respuestas son mediadas por receptores a 5-HT. La incubación con ketanserina (KT), ouabaína (OUA), caribdotoxina (CTX) o iberiotoxina (IBTX) evitó de forma estadísticamente significativa la fase de relajación, mientras que propranolol (PROP), L-NAME, GR 127935, WAY-100135 ó SB 204741 no modificaron la respuesta a la 5-HT. En tráqueas precontracturadas con histamina, la 5-HT (32, 100 y 320  $\mu\text{M}$ ) produjo una relajación dependiente de la concentración, misma que fue anulada por CTX, IBTX o KT. Estos resultados señalan, que en la fase de relajación de la respuesta a la 5-HT existe un papel relevante de los receptores 5-HT<sub>2</sub>, la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> y los canales de K<sup>+</sup> de alta conductancia dependiente de Ca<sup>2+</sup> (BK<sub>Ca</sub>), y descartan la influencia del óxido nítrico o de los receptores adrenérgicos  $\beta_2$  en dicha respuesta. De forma interesante, cuando los anillos traqueales provenían de cobayos sensibilizados a ovoalbúmina (modelo de asma alérgica) la respuesta a 5-HT mostró una menor fase de relajación.

---

En experimentos de *patch-clamp* en miocitos aislados, bajo perfusión con 4 aminopiridina (4-AP; un bloqueador de los canales de  $K^+$  rectificadores tardíos dependientes de voltaje (Kv)), la 5-HT incrementó notablemente las corrientes de  $K^+$  y este efecto fue completamente abolido con CTX, IBTX o KT. Lo anterior señala que durante la relajación inducida por 5-HT puede estar involucrado el incremento de la actividad de los canales de  $K^+$  de alta conductancia, probablemente a través de la vía de los receptores 5-HT<sub>2A</sub>.

Para evaluar de manera indirecta la actividad de la ATPasa de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (SERCA) se midió la capacidad de los miocitos para rellenar de  $Ca^{2+}$  el retículo sarcoplásmico (RS). Para ello, se cuantificó la cantidad de  $Ca^{2+}$  liberada del RS por cafeína en medio sin  $Ca^{2+}$ , antes y después de un periodo de rellenado del RS (perfusión por 10 min en medio con  $Ca^{2+}$ ). En estos experimentos encontramos que la 5-HT redujo significativamente el rellenado de  $Ca^{2+}$ , lo que sugiere que este compuesto disminuyó la actividad de la SERCA.

Para conocer de forma más específica el papel del receptor 5-HT<sub>2</sub> en las respuestas anteriores, algunos de estos experimentos se repitieron usando un agonista específico de estos receptores, la alfa-metil-5-HT ( $\alpha$ -MET). Al igual que la 5-HT, diversas concentraciones de  $\alpha$ -MET también produjeron respuestas bifásicas en anillos traqueales de cobayo, así como respuestas de relajación dependiente de la concentración en tráqueas precontracturadas con histamina. La fase de relajación producida por 32  $\mu$ M de  $\alpha$ -MET fue bloqueada por KT (señalando la importancia de los receptores 5-HT<sub>2A</sub>), pero a diferencia de la 5-HT también fue bloqueada por PROP, lo que sugiere que la  $\alpha$ -MET activó los receptores adrenérgicos  $\beta$ . Dicha activación se corroboró en tráqueas precontracturadas, ya que un antagonista adrenérgico  $\beta_2$  selectivo (ICI 118,551) abolió la relajación. Más aún, en estudios de *patch-clamp* de miocitos  $\alpha$ -MET aumentó las corrientes membranales de  $K^+$ , efecto que fue revertido por PROP e ICI y que fue mimetizado por SB.

Conclusiones: La 5-HT y la  $\alpha$ -MET producen respuestas bifásicas (contracción-relajación) en anillos traqueales, y relajación en anillos precontracturados con histamina. La relajación inducida por la 5-HT se debe a un proceso activo mediado por receptores 5-HT<sub>2</sub> en el cual intervienen la estimulación de la ATPasa  $Na^+/K^+$  y los BK<sub>Ca</sub>, y el decremento de la actividad de la SERCA. En la relajación inducida por 5-HT se descartó la participación de óxido nítrico (NO) o receptores adrenérgicos  $\beta_2$ . Sin embargo, parte de la relajación inducida por  $\alpha$ -MET se debió a la estimulación de los receptores adrenérgicos  $\beta_2$ . La sensibilización de los cobayos a ovoalbúmina (modelo de asma alérgica) hizo que la respuesta a 5-HT tuviera una menor fase de relajación.

---

---

---

## ABSTRACT

### **Pharmacological characterization of serotonergic receptors involved in the contraction and relaxation of guinea pig airway smooth muscle**

Serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) is a neurotransmitter of central and peripheral nervous systems, and in lungs it is stored in mast cells and neuroendocrine cells of airways. Its biological effects are complex because of the large variety of receptors, comprising seven families (5-HT<sub>1-7</sub>). In several mammal species 5-HT produces a sustained contraction of airway smooth muscle (ASM), but in the guinea pig and human airways 5-HT induces a biphasic response of contraction followed by relaxation. It has been postulated that this relaxation is also an active process triggered by 5-HT. Until now many details about the mechanisms by which 5-HT produces ASM contraction are unknown, and even more about mechanisms causing relaxation. Therefore, in this study we evaluated through a pharmacological approach potential mechanisms and receptors that might be involved in the contraction and relaxation induced by 5-HT in guinea pig ASM. With this aim, we used various laboratory techniques such as isolated organ bath, microfluorometry and ionic currents recording by patch-clamp in single cell.

By analyzing the temporal response to single doses of 5-HT we confirmed that most concentrations produced a biphasic response in guinea pig tracheal rings, being 32  $\mu\text{M}$  the most representative one, so this concentration was used for subsequent experiments. The response to 5-HT was significantly reduced by methiothepine (MET) or tropisetron (TR), and almost abolished by the combination of both drugs, thus corroborating that the responses are mediated by 5-HT receptors. Incubation with ketanserin (KT), ouabain (OUA), charibdotoxin CTX or iberiotoxin (IBTX) caused a statistically significant prevention of the relaxation phase, while propranolol (PROP), L-NAME, GR 127935, WAY-100135 or SB 204741 did not modify the response to 5-HT. In tracheas pre-contracted by histamine, 5-HT (32, 100 and 320  $\mu\text{M}$ ) produced a concentration-dependent relaxation, which was abolished by CTX, IBTX or KT. These results indicate that in the relaxation phase of the response to 5-HT there is a major role of 5-HT<sub>2</sub> receptors, ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, and large conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channels (BK<sub>Ca</sub>), and discard the influence of nitric oxide or  $\beta_2$  adrenergic receptors in this response. Interestingly, when tracheal rings were obtained from guinea pigs sensitized to ovalbumin (allergic asthma model) the response to 5-HT showed a lower relaxation phase.

In patch-clamp experiments in isolated myocytes, perfused with 4 aminopyridine (4-AP; blocker dependent voltage delayed-rectifier K<sup>+</sup> ion channel, (K<sub>v</sub>)), 5-HT significantly

---

---

increased  $K^+$  currents and this effect was completely abolished by CTX, IBTX or KT. This indicated during the 5-HT-induced relaxation an increased activity of high conductance  $K^+$  channels might be involved probably through activation of 5-HT<sub>2A</sub> receptors.

To indirectly assess the activity of the sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase pump (SERCA), we measured the capability of myocytes to replenish the sarcoplasmic reticulum (SR) with  $Ca^{2+}$ . With this aim, we quantified the amount of  $Ca^{2+}$  released from the SR by caffeine in a  $Ca^{2+}$  free medium before and after a period of SR  $Ca^{2+}$  loading (10 min perfusion with a medium with  $Ca^{2+}$ ). In these experiments we found that 5-HT significantly reduced the replenishment with  $Ca^{2+}$ , suggesting that this compound decreased the SERCA pump activity.

To specifically focus on the role of 5-HT<sub>2</sub> receptor in the above-mentioned responses, some of these experiments were repeated using a specific agonist of these receptors, alpha-methyl-5-HT ( $\alpha$ -MET). Similarly to 5-HT, various concentrations of  $\alpha$ -MET also produced biphasic responses of guinea pig tracheal rings, as well as relaxation responses in a concentration-dependent fashion in tracheas pre-contracted by histamine. The relaxation phase produced by 32  $\mu$ M of  $\alpha$ -MET was blocked by KT (pointing out the importance of 5-HT<sub>2A</sub> receptors) but, contrasting with 5-HT, this response was also blocked by PROP, suggesting that  $\alpha$ -MET activated  $\beta$ -adrenergic receptors. This activation was confirmed in pre-contracted tracheas, inasmuch as a selective  $\beta_2$ -adrenergic antagonist (ICI 118.551) abolished the relaxation. Moreover, in patch-clamp studies in myocytes  $\alpha$ -MET increased the plasmalemmal  $K^+$  currents, an effect that was reversed by PROP and ICI and was mimicked by SB.

Conclusions: 5-HT and  $\alpha$ -MET produce biphasic responses (contraction and relaxation) in tracheal rings, and relaxation in rings pre-contracted by histamine. This relaxation is an active process mediated by 5-HT<sub>2</sub> receptors and involving the stimulation of the  $Na^+/K^+$  ATPase and  $BK_{Ca}$ , as well as a decreased activity of the SERCA pump. In the relaxation induced by 5-HT involvement of nitric oxide (NO) or  $\beta_2$ -adrenergic receptors was ruled out. However, part of the relaxation induced by  $\alpha$ -MET was due to  $\beta_2$ -adrenergic receptor stimulation. The guinea pig sensitization to ovalbumin (allergic asthma model) made that 5-HT response had a lower relaxation phase.

---

---

---

## ANTECEDENTES

### CARACTERÍSTICAS DE LAS VÍAS AÉREAS

#### **Morfología de las vías aéreas**

En los vertebrados, el aparato respiratorio tiene como función primordial realizar intercambio de gases, capturando oxígeno del ambiente y liberando bióxido de carbono. Este aparato está formado por un sistema de conducción, que incluye fosas nasales, boca, faringe, laringe, tráquea, bronquios y bronquiolos, y una zona de intercambio gaseoso compuesta por conductos alveolares, sacos alveolares y alveolos [1].

La tráquea es un conducto cilíndrico que en el cobayo adulto presenta una extensión de ~45 mm de longitud y contiene ~12-15 anillos cartilagosos [2]. La tráquea, en su cara posterior, se encuentra en contacto con el esófago inicia en la laringe y termina en el tórax donde se bifurca en dos bronquios principales, derecho e izquierdo. Cada uno de los bronquios principales pasa a través del hilio al interior del propio pulmón para ramificarse. Las primeras ramificaciones se denominan bronquios lobares o secundarios, siendo para el pulmón derecho tres ramificaciones y para el izquierdo dos ramificaciones. Cada bronquio secundario se divide en bronquios segmentarios o terciarios, los cuales en el interior del segmento se ramifican en bronquios de calibre progresivamente menor, hasta llegar a los bronquiolos terminales. Los bronquiolos terminales dan origen a los bronquiolos respiratorios, mientras cada bronquiolo respiratorio termina formando varios conductos alveolares. Los conductos alveolares forman a su vez sacos alveolares y en las paredes de estos últimos se abren los alveolos. El alveolo es considerado como la unidad respiratoria donde tiene lugar el intercambio de oxígeno y bióxido de carbono. En el ser humano los pulmones están integrados por un promedio de 300-800 millones de alveolos [3].

La tráquea presenta anillos cartilagosos en forma de C unidos en sus extremos por músculo liso y tejido conjuntivo. En los bronquios los cartílagos se modifican para transformarse en placas. El interior de la tráquea y los bronquios está cubierto por un epitelio columnar pseudoestratificado ciliado que tiene como principales funciones el acondicionamiento del aire inspirado y la remoción de partículas o microorganismos. Las

---

células que componen este epitelio son células ciliadas, células caliciformes, células basales y células neuroendócrinas pulmonares (PNEC) [2, 4].

La submucosa está formada por tejido conjuntivo, vasos linfáticos y sanguíneos, glándulas submucosas y músculo liso. El músculo liso traqueal se encuentra dorsalmente unido a los anillos cartilagosos. La capa muscular traqueal o *musculus transversus tracheae* consiste de una capa unificada de paquetes gruesos de músculo liso caracterizado por ramificaciones mínimas y con orientación transversa. Los paquetes musculares están unidos por tendones al pericondrio externo (cercano a la terminación dorsal del cartílago) y los ligamentos anulares [4, 5]. Por contraste, en los bronquios los paquetes musculares se encuentran rodeando toda la circunferencia de las paredes, entre las placas cartilagosas y la mucosa.

Las células del músculo liso tienen forma de huso y miden aproximadamente entre 2 y 10  $\mu\text{m}$  de diámetro y 200  $\mu\text{m}$  de longitud y presentan un núcleo central. Cada célula se encuentra separada por tejido conectivo reticular y colágena [6]. A diferencia del músculo esquelético o cardíaco, en los que se puede distinguir un patrón regular de sarcómeros, en el músculo liso esta conformación no está presente.

El músculo liso en tres categorías se ha clasificado de acuerdo con su fisiología y morfología, de la manera siguiente: unitario, multiunitario y transitorio. El músculo liso unitario se caracteriza por tener escasa inervación pero una gran cantidad de uniones intercelulares de baja impedancia, lo cual hace que el tejido responda como una unidad [4, 6]. Ejemplos de este músculo liso unitario son las arteriolas, los uréteres y el útero [4, 5]. En el músculo liso de tipo multiunitario son escasas las uniones intercelulares de baja impedancia, pero tiene una inervación muy densa, lo que le permite realizar una contracción uniforme. Están presentes en los bronquios principales de las vías aéreas [4]. La tercera categoría corresponde a una categoría intermedia, donde las uniones de baja impedancia son relativamente escasas y la inervación no es muy densa. El músculo liso traqueal es un representante de esta categoría.

Las vías aéreas se encuentran inervadas por nervios sensoriales aferentes y motores eferentes. La fuente primordial de las fibras eferentes a la tráquea y bronquios es el nervio vago, por lo que las fibras eferentes vagales representan el suministro nervioso más grande al músculo liso de las vías aéreas (MLVA) [5, 7, 8]. Por el contrario, la inervación

---

simpática del árbol traqueobronquial está dirigida principalmente hacia vasos sanguíneos y glándulas submucosas, siendo relativamente escasa la inervación simpática del MLVA, al menos en el humano. Los nervios vagos y los ganglios torácicos simpáticos 4 y 5 contribuyen con fibras que forman los plexos pulmonares anterior y posterior en el hilio pulmonar. De estos plexos surgen dos redes nerviosas, los plexos peribronquial y periarterial. El plexo peribronquial se divide en extracondral (entre el cartílago y la adventicia) y subcondral (entre el cartílago y el epitelio). Algunas células ganglionares están repartidas en el plexo peribronquial, disponiéndose principalmente en el plexo extracondral [7].

### *Nervios eferentes*

Los nervios eferentes parasimpáticos inician en los núcleos vagales, de donde parten fibras preganglionares que corren en los nervios vagos, penetran a las paredes de las vías aéreas y llegan a los plexos extracondrals, donde hacen relevo en los ganglios parasimpáticos. Desde estos ganglios, fibras posganglionares inervan al MLVA, a las glándulas submucosas y a los vasos sanguíneos. El mediador del sistema nervioso parasimpático es la acetilcolina (ACh). Muchos mediadores influyen en la liberación de ACh de los nervios posganglionares en las vías aéreas. Los mediadores inflamatorios y los neuropéptidos sensitivos sensibilizan los ganglios parasimpáticos, e incrementan de esa forma los mecanismos reflejos colinérgicos [7, 9]. Las fibras nerviosas preganglionares simpáticas provienen de la médula espinal y hacen sinapsis en los ganglios cervicales y paravertebrales. De estos sitios nacen las fibras posganglionares, que al ingresar a las paredes de las vías aéreas se entremezclan con las fibras nerviosas colinérgicas para ir a inervar los tejidos blanco. Las vías aéreas humanas tienen muy escasa inervación simpática, que se localiza en especial en las vías aéreas de mayor calibre, donde proveen inervación a las glándulas submucosas y a los vasos sanguíneos, y en menor grado al músculo liso. El neurotransmisor del sistema simpático es la noradrenalina.

---

---

---

### ***Nervios aferentes***

La presencia de nervios aferentes ha sido descrita mediante estudios fisiológicos, registrando los impulsos nerviosos de las rutas aferentes desde el receptor. Se han descrito tres tipos diferentes de receptores [10]:

- a. Los receptores de adaptación lenta, que son terminales nerviosas miélicas con una velocidad de conducción de 30-50 m/seg que se localizan muy profundamente en la pared de las vías aéreas, con frecuencia en el músculo liso. Son responsables del reflejo de inflación de Hering-Breuer y del reflejo de broncodilatación o distensión de las vías aéreas.
- b. Los receptores de adaptación rápida, también conocidos como receptores de irritación, que son fibras nerviosas aferentes miélicas con una velocidad de conducción de 20-40 m/seg. Algunas de sus ramas terminales se localizan en el epitelio, cercanas al lumen de las vías aéreas. Responden a una gran variedad de estímulos mecánicos y químicos. Su estimulación causa broncoconstricción refleja, tos e hiperventilación.
- c. Las terminaciones nerviosas denominadas fibras C, que son fibras nerviosas amielínicas, con velocidad de conducción de 1-2 m/seg. Se han clasificado en fibras C pulmonares y fibras C bronquiales. Las fibras C pulmonares corresponden a los denominados receptores J y probablemente se localizan cerca de los capilares pulmonares. Las fibras C bronquiales producen broncoconstricción refleja, incremento reflejo en la secreción de moco en las vías aéreas, respiración rápida y superficial o apnea.

### ***La inervación no adrenérgica-no colinérgica***

La inervación inhibitoria no adrenérgica-no colinérgica (NANC) de las vías aéreas fue demostrada por primera vez en la tráquea del cobayo, donde una estimulación eléctrica de campo producía una respuesta bifásica. La contracción inicial era bloqueada por atropina, y la relajación subsecuente sólo parcialmente inhibida por el propranolol (PROP). La porción de la relajación resistente al PROP era bloqueada por la incubación de tetrodotoxina (TTX), lo que indicaba una respuesta de origen nervioso. La broncodilatación no adrenérgica ha

---



---

sido demostrada en varias especies, incluyendo el ser humano. El sistema nervioso no adrenérgico inhibitorio puede activarse de manera refleja. En los felinos, la estimulación mecánica de la mucosa laríngea produce una broncoconstricción transitoria sensible a atropina, y una broncodilatación prolongada, resistente a la inhibición adrenérgica  $\beta$  con PROP. El neurotransmisor broncodilatador no adrenérgico de las vías aéreas ha sido identificado como el óxido nítrico (NO). La liberación neuronal del NO modula la respuesta colinérgica en las vías aéreas humanas *in vitro*, aparentemente a través de un antagonismo funcional con la ACh liberada [9, 11]. En las vías aéreas de cobayos, el péptido intestinal vasoactivo (VIP) también media la respuesta del NANC inhibitorio. Ha sido reportado que el número de terminaciones nerviosas inmunorreactivas al VIP disminuye en pacientes que han fallecido de asma. Sin embargo, en estudios subsecuentes no encontraron esta disminución en pacientes con asma [9, 12, 13].

Los nervios excitatorios NANC se han demostrado en las vías aéreas de cobayos *in vivo* e *in vitro*. En presencia de atropina y PROP el bronquio principal de los cobayos se contrae lentamente en respuesta a la estimulación eléctrica de campo. Esta contracción resistente a la atropina abarca aproximadamente 60% de la contracción máxima que puede ser inducida por la estimulación eléctrica. Los principales mediadores de este sistema excitatorio NANC son la sustancia P, la neurocinina A y el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP), liberados de fibras sensoriales [14].

Este sistema de nervios no colinérgicos excitatorios (fibras C) es estimulado por irritación química (diisocianato de tolueno, éter, formalina, capsaicina, humo de cigarro, bajo pH) o por diversos mediadores químicos (histamina, bradicinina, ACh, prostaglandinas, leucotrienos). Se considera que la liberación de neurotransmisores se realiza mediante un reflejo axónico, involucrando conducción nerviosa antidrómica. El concepto de un reflejo axónico implica que los nervios sensitivos pueden tener una función efectora periférica. La estimulación de los nervios sensitivos inicia, no solamente impulsos ortodrómicos que viajan hacia la médula espinal, sino también impulsos antidrómicos que se dispersan a través de las ramas terminales (colaterales axónicas) de los nervios sensitivos. El concepto de reflejo axónico se desarrolló aún más en la piel, donde se ha demostrado que la respuesta de rubor o vasodilatación, que se dispersa por varios centímetros desde el punto de la lesión, está mediada por reflejos axónicos de las

---

terminaciones nerviosas sensitivas. A este fenómeno de vasodilatación, edema local debido al incremento en la permeabilidad vascular, aunado a infiltración y activación de células inflamatorias y presencia de dolor se le conoce como inflamación neurogénica [15].

---

---

---

## Mecanismos de contracción y relajación del músculo liso de las vías aéreas

### *Mecanismos de contracción del músculo liso de las vías aéreas*

#### *Participación del $Ca^{2+}$*

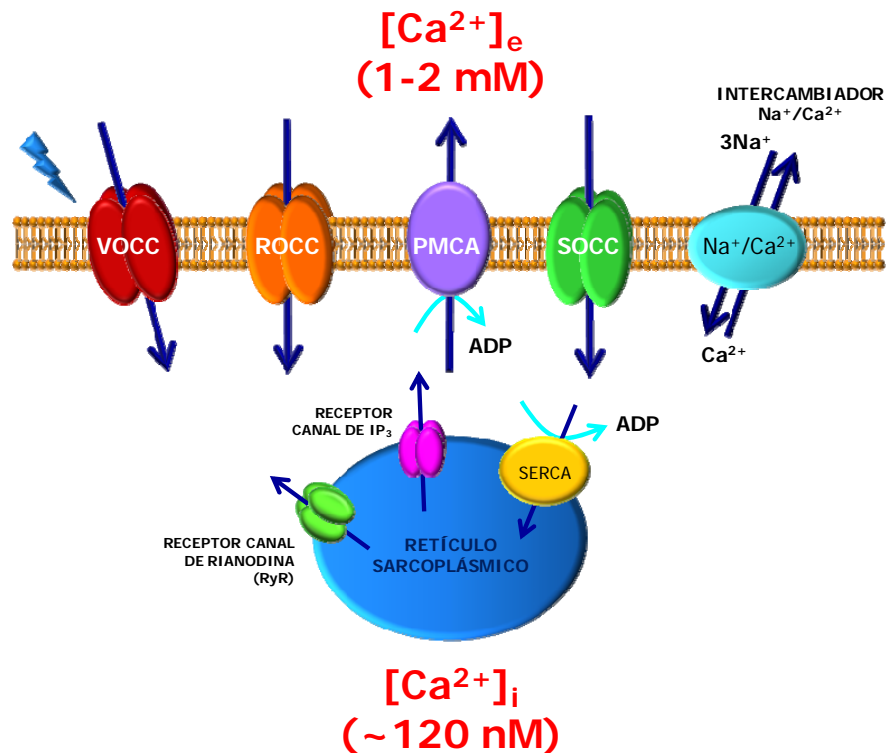
El ion calcio ( $Ca^{2+}$ ) actúa como un mensajero intracelular en una gran diversidad de procesos celulares, incluyendo la señalización del músculo liso [16-18]. La activación de los mecanismos de contracción y la relajación del músculo liso involucra varias formas de señalización transmembranal, siendo el efecto final la regulación de la concentración de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Bajo condiciones fisiológicas normales, en el MLVA la  $[Ca^{2+}]_i$  en estado de reposo es  $\sim 120$  nM, mientras que en el exterior de la célula es  $\sim 1-2$  mM [19, 20]. Esta gran diferencia en concentración de  $Ca^{2+}$  (aproximadamente  $10^4$  veces mayor en el medio extracelular) facilita un gradiente de concentración hacia el interior de la célula [21, 22].

La regulación de la contracción y la relajación depende del aumento o la disminución en la  $[Ca^{2+}]_i$ . Los principales mecanismos identificados en la entrada y salida de  $Ca^{2+}$  en la membrana plasmática se muestran en la **Figura 1**.

El mecanismo de la contracción del MLVA requiere elevación de la  $[Ca^{2+}]_i$  [23] y también de un aumento en la sensibilidad al  $Ca^{2+}$  del aparato contráctil [24]. En las células del MLVA el aumento del  $Ca^{2+}$  citosólico puede provenir del espacio extracelular o de almacenes intracelulares.

La regulación del  $Ca^{2+}$  extracelular involucra una variedad de canales de  $Ca^{2+}$ , los cuales pueden ser clasificados en canales de calcio dependientes de voltaje (VOCC, de larga duración o activados por voltaje) [24-28] y los canales independientes del voltaje [29]. Estos últimos incluyen los canales de  $Ca^{2+}$  regulados por receptor (ROCC) [30, 31], los canales de  $Ca^{2+}$  regulados por el almacenamiento o capacitivos (SOCC) [32], los canales activados por estiramiento o mecanosensibles (SACC) [29, 33] y los canales ionotrópicos como los P2X [34, 35].

---



**Figura 1.** Principales mecanismos en la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática (Modificado de Parekh y Putney, [31]). El  $\text{Ca}^{2+}$  puede entrar al citosol a través de la membrana por una gran variedad de canales, incluyendo los canales de calcio dependientes de voltaje (VOCC), los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  regulados por receptor (ROCC), los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  regulados por el almacenamiento o capacitivos (SOCC). Además, puede haber aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por su salida del retículo sarcoplásmico (RS) a través de los receptores-canal de rianodina (RyR) y los receptores-canal de inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ). Por el contrario, el  $\text{Ca}^{2+}$  es expulsado del citosol a través por el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$ -de la membrana plasmática (PMCA.) y la ATPasa- $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (SERCA).

El organelo más importante en la regulación del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es el retículo sarcoplásmico (RS). La regulación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  por el RS involucra una gran variedad de mecanismos de señalización, incluyendo la generación de segundos mensajeros y la liberación y recaptura de  $\text{Ca}^{2+}$  por el RS [24, 36]. Por ejemplo, la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  interno almacenado en el RS se produce por la activación del receptor del inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) [37-39] o bien mediante la liberación de calcio inducida por calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release, CICR) vía los receptores-canales de rianodina (RyR) [20, 40-42].

De acuerdo con Somlyo y Somlyo [43], la contracción del músculo liso puede ser iniciada por despolarización (acoplamiento electromecánico) o por estimulación de un agonista (acoplamiento farmacomecánico) (**Figura 2**). El primero opera a través del cambio

en el potencial de membrana a valores más positivos (despolarización), lo que produce la apertura de los VOCC produciéndose un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  y llevándose a cabo la contracción [26, 43]. El segundo opera a través de mecanismos de señalización que involucra la estimulación de receptores membranales por acción directa de neurotransmisores y/o agonistas. En este último tipo de acoplamiento se desencadena una vía de transducción de señales que involucra a las proteínas G y la producción de segundo mensajeros como el  $IP_3$  [26, 37, 38].



**Figura 2.** Acoplamiento farmacomecánico y electromecánico para la contracción del músculo liso. El acople farmacomecánico comprende la estimulación de receptores membranales por acción directa de agonistas que desencadenan la vía de transducción de señales que involucra a las proteínas G y la producción de fosfolipasa C (PLC) siendo el efecto final la liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico por el inositol trifosfato ( $IP_3$ ). El acople electromecánico involucra la despolarización de la membrana y la consecuente apertura de canales de  $Ca^{2+}$  tipo L dependientes de voltaje (VOCC), lo que produce un incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  ocasionando la unión del  $Ca^{2+}$  con calmodulina, formando el complejo  $Ca^{2+}$ -calmodulina, el cual al unirse con la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) y en consecuencia la contracción y si es desfosforilada por la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP) se lleva al proceso de relajación. (Modificado de Somlyo y Somlyo [43])

En el MLVA la exposición a los agonistas broncoconstrictores produce una elevación bifásica de  $[Ca^{2+}]_i$ , que se caracteriza por un incremento inicial rápido y transitorio de  $Ca^{2+}$ , seguido de una disminución paulatina hasta alcanzar una meseta, superior a los niveles basales [19, 23]. Inicialmente esta respuesta de  $[Ca^{2+}]_i$  se consideraba el resultado de la liberación de  $Ca^{2+}$  del RS y del influjo de  $Ca^{2+}$  del espacio extracelular. En algunas especies, como el cerdo, existe una participación del RS en la formación de la meseta [30]. En la meseta también parece participar el  $Ca^{2+}$  extracelular, ya que la producción de ésta se evita si se añade D-600, un antagonista de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L (Luis M. Montaña, comunicación personal).

El incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  no es estático, aumenta y disminuye de manera rítmica, en forma de oscilaciones de  $Ca^{2+}$ . Después de la activación de los receptores por los agonistas, la  $[Ca^{2+}]_i$  basal se incrementa y la amplitud absoluta de las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  disminuye [23]. Estos agonistas broncoconstrictores, como ACh y 5-HT, producen oscilaciones de  $Ca^{2+}$  en tráquea y bronquio de ratón, cerdo y humanos [44]. Las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  comúnmente se presentan como olas de  $Ca^{2+}$ . La frecuencia de estas oscilaciones, generalmente depende de la concentración del agonista, y no así la amplitud de las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  [45], dando como resultado un incremento local de  $[Ca^{2+}]_i$ , que promueve la unión de  $Ca^{2+}$  a un segundo sitio de  $IP_3R$  el cual inactiva y cierra el receptor y termina la liberación de  $Ca^{2+}$  [45]. Como describiremos adelante, el decremento de  $[Ca^{2+}]_i$  se da también como resultado de la actividad de la ATPasa de  $Ca^{2+}$ -de la membrana plasmática (plasma membrane calcium ATPase, PMCA), la ATPasa del  $Ca^{2+}$  del RS (Sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase, SERCA), así como el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  [20].

### ***Transducción de señales en la contracción y relajación del MLVA***

Numerosos estudios han demostrado que las proteínas G están involucradas en las respuestas farmacológicas de contracción y relajación del MLVA [46-50], así como en otras funciones celulares tales como proliferación celular, mitogénesis y organización del citoesqueleto del MLVA [51].

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) constituyen una superfamilia de proteínas que actúan como transductores de señales a través de la membrana celular. Las

proteínas G consisten de subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . En el estado basal la subunidad  $\alpha$  se encuentra unida a GDP (bifosfato de guanosina), formando un heterotrímero con  $\beta$  y  $\gamma$ . Cuando un agonista se une al GPCR los cambios conformacionales que sufre este último promueven el intercambio de GDP por GTP (trifosfato de guanosina). Esto hace que la proteína  $G\alpha$  se disocie de las proteínas  $\beta$  y  $\gamma$  [50, 52]. Tanto la  $G\alpha$  como el heterodímero  $\beta\gamma$  cumplen funciones de señalización.

La familia de las proteínas G está dividida en cuatro subfamilias,  $G_{q/11}$ ,  $G_s$ ,  $G_{i/o}$ , y  $G_{12/13}$ , basadas en las secuencias de aminoácidos y en la función [46, 48, 50, 53, 54].

La subfamilia  $G_{q/11}$  tiene particular interés debido a su importante contribución en la contracción del MLVA. Los GPCRs que promueven la contracción del MLVA se acoplan inicialmente a  $G_{q/11}$  y promueven la activación de la fosfolipasa  $C\beta$  ( $PLC\beta$ ). Esta última hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ) para generar dos segundos mensajeros 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) [28, 53, 55-59]. El DAG permanece unido a la membrana plasmática y su principal efecto es activar la cinasa de proteína C (PKC), la cual cataliza la fosforilación de una gran variedad de proteínas intracelulares. El efecto neto del incremento de  $IP_3$  es el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , mismo que se lleva a cabo cuando el  $IP_3$  difunde a través del citosol y se une a su receptor ( $IP_3R$ ) en el RS, produciendo la liberación de  $Ca^{2+}$  del RS [57].

La subfamilia  $G_s$  promueve la relajación del MLVA, y este efecto lo lleva a cabo estimulando la acción de la adenililciclase (AC) unida a la membrana. Esta última enzima cataliza la formación de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) intracelular a partir del trifosfato de adenosina (ATP). El aumento de cAMP produce la activación de la cinasa de proteína A (PKA), la cual promueve la relajación del MLVA a través de la fosforilación de diversos elementos, tal como se describe en la siguiente sección.

Contrastando con todo lo anterior, la activación de  $G_{i/o}$  está asociada a la inhibición de la AC, lo que reduce la generación de cAMP [46, 50]. El conocimiento sobre las vías de activación de la señalización de la subfamilia  $G_{12/13}$  es escaso.

### ***Acoplamiento miosina-actina***

La contracción del músculo liso en respuesta a un estímulo farmacológico es secundaria al aumento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). El incremento citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  favorece su unión con la calmodulina para formar el complejo  $4\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ). Este complejo activa a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), la cual fosforila a la serina en la posición 19 de la cadena ligera de la miosina de 20 kDa ( $\text{MLC}_{20}$ ) [43, 60]. Esta fosforilación de la  $\text{MLC}_{20}$  facilita la interacción actina/miosina y la activación de la ATPasa de la miosina para llevar a cabo la contracción [43, 61]. La contracción del músculo liso es un producto de la interacción entre la actina y la miosina [24, 43, 58, 59, 61-63].

La  $\text{MLC}_{20}$  puede ser defosforilada por la acción de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP), lo cual limita o revierte la contracción [43, 59, 64]. Así, el grado de fosforilación de la  $\text{MLC}_{20}$  y, por lo tanto, el grado de contracción muscular, depende del balance entre las actividades de la MLCK y la MLCP [62]. Si la actividad de la MLCP disminuye, la fosforilación neta de la miosina en respuesta a un cambio dado en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se incrementa y/o prolonga, resultando en una mayor contracción; en otras palabras, la sensibilidad del aparato contráctil al  $\text{Ca}^{2+}$  se incrementa [59]. La contracción del MLVA puede ser también mediada por mecanismos relativamente independientes de la vía de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este tipo de activación del MLVA se lleva a cabo principalmente a través de la inhibición de la MLCP. Tal como se acaba de comentar, la MLCP defosforila a la  $\text{MLC}_{20}$  y desactiva la miosina, por lo que su inhibición hace que la  $\text{MLC}_{20}$  permanezca fosforilada y que inicie o persista la contracción [58, 65, 66]. El mecanismo por el cual la actividad de la MLCP es inhibida es a través de su fosforilación por la enzima Rho-cinasa (ROCK, cinasa serina/treonina) cuya activación depende de RhoA, una pequeña GTPasa de la familia de las proteínas G.

### ***Mecanismos de relajación del MLVA***

La relajación del MLVA puede ser el resultado de la inhibición de los estímulos broncoconstrictores o bien la acción directa de mecanismos de relajación. Así, el tono del

---



MLVA puede disminuir por diversas vías como la inhibición del metabolismo de un agonista broncoconstrictor o el bloqueo de los receptores que promueven contracción o de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática [22, 67]. Sin embargo, la relajación de las células del MLVA puede ser un fenómeno activo, resultado de mecanismos intracelulares que culminan con la reducción de la actividad de la MLCK y/o con el incremento en la actividad de la MLCP [68], o bien con la modificación de los eventos de señalización asociados con la acción de las proteínas G $\alpha$ s [52, 53].

La remoción del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico involucra su secuestro dentro del RS y/o su extrusión de la célula a través de la membrana plasmática [22, 60]. Los principales responsables de este movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  es la SERCA, en el RS, y la PMCA y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX), en la membrana plasmática [28, 39, 59]. Sin embargo, existe controversia sobre cuál de estos mecanismos es el de mayor importancia para disminuir la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , ya que se han reportado diferentes niveles de participación en diferentes músculos lisos [20, 69, 70].

La PMCA es una ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  electroneutra que compensa la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  debido al gradiente electroquímico. Por cada ión  $\text{Ca}^{2+}$  que es bombeado hacia el exterior de la célula se introducen al citoplasma dos  $\text{H}^+$ , utilizando ATP. La SERCA, considerada como una bomba electrogénica, transporta dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  por cada molécula de ATP [71].

Como se mencionó antes, el NCX que se encuentra localizado en la membrana plasmática produce la expulsión de  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol disminuyendo la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . El NCX tiene poca afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  y una alta capacidad para transportar este ión. El intercambio de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  se lleva a cabo por un gradiente transmembranal de  $\text{Na}^+$ , sostenido por la ATPasa  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ . Este NCX es un sistema electrogénico, ya que por cada ion  $\text{Ca}^{2+}$  que sale entran tres  $\text{Na}^+$  [72]. Además, puede funcionar bidireccionalmente dependiendo de los gradientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . Así, la acumulación local de  $\text{Na}^+$  en la proximidad de la membrana plasmática puede activar la “fase reversa” del NCX, con lo que no solo se reduce la extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$ , sino que ahora hay influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular hacia el interior de la célula [73, 74].

Diversos agonistas que interactúan con receptores específicos localizados en la membrana celular generan segundos mensajeros intracelulares que, en turno, inician una cascada molecular de eventos que producen relajación. Los segundos mensajeros

intracelulares involucrados en la relajación del MLVA son los nucleótidos cíclicos, adenosin monofosfato cíclico (cAMP) y el guanosin 3' 5' monofosfato cíclico (cGMP), generados por las actividades de la adenilato y guanilato ciclasas, respectivamente. Estos ejercen un efecto intracelular por la activación de cinasas: una proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA) o una proteína cinasa dependiente de cGMP (PKG) [67].

Los principales mecanismos por los cuales la activación de la PKA produce relajación del MLVA son:

- a. Fosforilación del IP<sub>3</sub>R, ocasionando reducción de su afinidad por IP<sub>3</sub>, lo que limita la salida de Ca<sup>2+</sup> del RS hacia el citosol [68].
- b. Fosforilación del fosfolambán (proteína inhibidora de la actividad de la SERCA), promoviendo así la recaptura de Ca<sup>2+</sup> hacia el RS [75].
- c. Fosforilación de la MLCK, disminuyendo así su afinidad por calcio-calmodulina, lo que reduce entonces su actividad y su capacidad de fosforilar a la cadena ligera de la miosina (MLC) [50].
- d. La activación de los canales de K<sup>+</sup> de alta conductancia dependientes de Ca<sup>2+</sup> (BK<sub>Ca</sub>) con hiperpolarización de la membrana [76, 77].
- e. Fosforilación de la PLCβ, lo que evita que esta última hidrolice los fosfolípidos membranales y produzca DAG e IP<sub>3</sub> [78].

Los medicamentos que más se emplean en la práctica clínica para promover la relajación del MLVA en el tratamiento del asma son, por mucho, los agonistas adrenérgicos β<sub>2</sub> [79]. Estos fármacos favorecen la activación de la PKA a través de la estimulación de los receptores adrenérgicos β<sub>2</sub>, con activación subsecuente de las proteínas G<sub>s</sub> y aumento de la actividad de la AC [22, 80, 81]. Además, se ha descrito que los agonistas adrenérgicos β<sub>2</sub> también pueden favorecer la relajación del MLVA por vías alternativas independientes del cAMP [82, 83].

Se ha determinado que el NO, nitrovasodilatadores, factor natriurético y péptidos relacionados producen relajación del MLVA por la activación de guanilil ciclasa y el incremento en la formación de cGMP y activación de PKG [84-86]. Los mecanismos de la relajación mediada por PKG son básicamente los descritos anteriormente para PKA [67, 87].

---

El NO es una molécula de señalización inter e intracelular muy importante en diferentes tejidos de mamíferos. El NO producido de manera endógena está implicado en diferentes procesos fisiológicos de las vías aéreas [88]. El NO participa en la regulación del tono muscular de los vasos sanguíneos pulmonares, modula la agregación plaquetaria y la transmisión neural [88]. El NO es sintetizado de L-arginina por las sintetasas del NO (NOS). En humanos y en otras especies de mamíferos han sido descritas tres isoformas de NOS, involucradas en la regulación de las vías aéreas y el tono del músculo liso de los vasos pulmonares y la respuesta inflamatoria, siendo estas: NOS neuronal (nNOS), NOS inducible (iNOS) y NOS endotelial (eNOS) [86, 87, 89].

Por estudios inmunohistoquímicos se ha determinado que la iNOS está expresada en células ciliadas, células basales y células secretoras de las vías aéreas, siendo el epitelio el principal sitio de expresión [86, 90]. nNOS ha sido localizada en el sistema NANC del MLVA y submucosa [86].

#### ***ATPasa Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> en el músculo liso de las vías aéreas***

El MLVA posee una enzima localizada en la membrana plasmática, la ATPasa Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> (también conocida como bomba Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>), que contribuye al potencial de membrana en reposo y modulación del tono, realizando el transporte activo de K<sup>+</sup> hacia el interior de las células y llevando Na<sup>+</sup> fuera de la célula contra un gradiente electroquímico [91, 92]. El transporte de iones se hace con una proporción de 3 Na<sup>+</sup> por 2 K<sup>+</sup>, resultando en la polarización de la membrana [93].

La actividad de la ATPasa Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> es regulada por una gran variedad de hormonas, neurotransmisores y autacoides [91, 92, 94, 95]. De este modo, un incremento en la actividad de la ATPasa Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> induce la hiperpolarización de la membrana y favorece la relajación del MLVA [92, 93]. Por el contrario, su inhibición, por ejemplo con ouabaína (OUA), produce despolarización y favorece la contracción del MLVA [92].

---

### ***Canales de K<sup>+</sup> en el MLVA***

Los canales de K<sup>+</sup> pertenecen a una familia de proteínas de membrana que transportan K<sup>+</sup> desde el citoplasma hacia el exterior de la célula y, con ello, participan en diversos procesos fisiológicos tales como la neurotransmisión, la excitabilidad celular, la secreción hormonal, la actividad cardíaca, la reactividad vascular y el tono del músculo liso [96]. Los diferentes canales de K<sup>+</sup> han sido identificados y caracterizados a través de las herramientas moleculares, técnicas electrofisiológicas e inhibidores farmacológicos selectivos de los canales [97]. De esta forma, se han identificado más de 50 diferentes tipos de canales de K<sup>+</sup> que se encuentran distribuidos en una amplia variedad de células incluyendo células del MLVA y células inflamatorias tales como eosinófilos, basófilos, macrófagos, entre otras [98]. El MLVA expresa varios tipos de canales de K<sup>+</sup> y su actividad contribuye significativamente en la generación del potencial de membrana en reposo y de las corrientes hiperpolarizantes y repolarizantes. Así también, están involucrados en la regulación de la contracción-relajación del MLVA [97]. Estos canales pueden ser activados por diferentes factores tales como el voltaje, el aumento de la concentración de Ca<sup>2+</sup>, proteínas G y ATP. De acuerdo con estos criterios, los canales de K<sup>+</sup> han sido divididos en cuatro clases principales: canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje (K<sub>V</sub>), canales de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup> (K<sub>Ca</sub>), canales de K<sup>+</sup> dependientes de ATP (K<sub>ATP</sub>) y canales de K<sup>+</sup> rectificador de la corriente (K<sub>IR</sub>) [63, 99].

Existen tres categorías de los canales de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup> (K<sub>Ca</sub>) identificados y clasificados de acuerdo con las conductancias del canal. Éstos son llamados de alta conductancia (100-300 picosiemens (ps), BK<sub>Ca</sub> o MaxiK); de conductancia intermedia (25-100 ps, I<sub>KCa</sub>) y de conductancia pequeña (2-26 ps, SK<sub>Ca</sub>) [96]. Los canales más sobresalientes para la función del MLVA son los canales de K<sup>+</sup> de alta conductancia activados por Ca<sup>2+</sup> (BK<sub>Ca</sub>), también llamados los canales Maxi-K<sub>Ca</sub> debido a su gran conductancia [96, 100]. Aunque su principal estímulo de activación es el aumento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, también pueden ser activados por voltaje [101]. Los canales BK<sub>Ca</sub> se caracterizan por estar presentes en una amplia variedad de tejidos de mamíferos, incluyendo músculo liso, aunque no se encuentran en los miocitos de corazón [77]. La membrana celular de MLVA está enriquecida con BK<sub>Ca</sub> tanto en vías aéreas mayores como en bronquiolos [97, 102]. La probabilidad de apertura del canal BK<sub>Ca</sub> se incrementa con la elevación de la

---

$[Ca^{2+}]_i$  y la despolarización de la membrana [77, 103], por lo que son reguladores importantes del potencial de membrana y del tono del MLVA [30, 104]. Estos canales también están relacionados con el control de la secreción neuroendócrina y en ciertos mecanismos de transducción de señales [103-105].

Los canales  $BK_{Ca}$  son inhibidos por la CTX y la IBTX. El tetraetilamonio (TEA) es un inhibidor efectivo a concentraciones entre 0.1-10 mM, y a concentraciones mayores de 1 mM afecta a otros canales de  $K^+$  [22, 100]. En 1999, Snetkov y Ward describieron estos tres tipos distintos de canales de  $K^+$  de larga conductancia sensibles a CTX, IBTX y TEA en bronquiolos de humanos con conductancias de  $\sim 200$ ,  $\sim 150$  y  $\sim 100$  ps [102].

El incremento de la actividad de los  $BK_{Ca}$ , resultado de la elevación de la  $[Ca^{2+}]_i$  y/o de la despolarización de la membrana, promueve la hiperpolarización de la membrana provocando el cierre de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L y la reducción del influjo de  $Ca^{2+}$  lo cual lleva a la relajación del músculo liso [106, 107]. De manera contraria, se produce la contracción por la inhibición de los canales de  $K^+$  seguido de la despolarización de la membrana y aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  [107, 108]. Otros canales de  $K^+$  también descritos en el MLVA son los canales de  $K^+$  rectificador tardío dependiente de voltaje ( $K_V$ ), y el canal de  $K^+$  sensible a ATP ( $K_{ATP}$ ), aunque al parecer no presentan una gran importancia fisiológica [63, 98, 100, 109].

El canal  $K_V$  es un canal de  $K^+$  sensible al voltaje, incrementando su probabilidad de apertura por una despolarización de membrana relativamente alta ( $>20$  mV). Este tipo de canal es inhibido por la 4-aminopiridina (4-AP). Por esta razón, la 4-AP puede ser utilizada para diferenciar las corrientes de  $K_V$  de las corrientes  $BK_{Ca}$ , las cuales pueden ser también activadas por despolarización de la membrana [108, 110].

Los canales de  $K^+$  sensibles a ATP pueden causar relajación del músculo liso debido a que ocasionan hiperpolarización de la membrana y, consecuentemente, una reducción en la probabilidad de apertura de los VOCC [43].

Diferentes agonistas que producen relajación en el músculo liso como los agonistas  $\beta_2$ -adrenérgicos, la prostaciclina ( $PGI_2$ ), el NO, entre otros, pueden activar los canales  $BK_{Ca}$ , mientras que, por el contrario, agonistas que inducen contracción (tromboxano  $A_2$  y angiotensina II, por ejemplo) pueden inhibir los canales  $BK_{Ca}$  a través de su fosforilación dependiente de la tirosina cinasa Src [110, 111].

En fecha reciente se ha demostrado que el BK<sub>Ca</sub> está acoplado con el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico a través de mecanismos dependiente e independiente de cAMP, los cuales son capaces de provocar una relajación en el músculo liso de la tráquea de cobayo [77].

---

---

---

## LA 5-HIDROXITRIPTAMINA

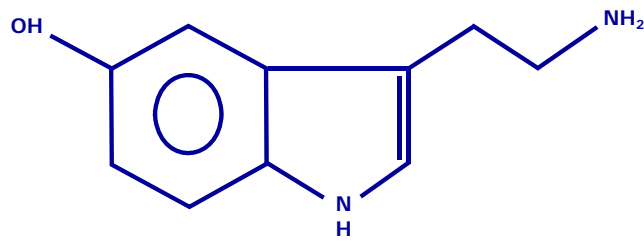
### El descubrimiento de la 5-HT

La evolución histórica del conocimiento científico sobre la 5-HT ha sido revisada de manera excelente por Green [112] y por Whitaker-Azmitia [113]. Los primeros indicios de la existencia de la 5-HT se tuvieron a mediados del siglo XIX, como un descubrimiento fortuito al reconocer que la sangre contenía una sustancia que provocaba vasoconstricción y que la administración de suero provocaba aumento de las frecuencias respiratoria y cardíaca e incremento de la presión arterial en diferentes animales [112]. En 1937 un grupo de investigadores italianos, dirigido por Vittorio Erspamer, estudiaron un constituyente químico del tubo digestivo de varias especies de organismos, al cual denominaron enteramina, que provocaba contracción en el músculo liso uterino [114]. Este grupo de investigadores encontró altas concentraciones de este compuesto en la mucosa gastrointestinal, plaquetas y SNC. A finales de los años 1940s e inicio de los 1950s, de manera independiente otro grupo de investigadores en EUA, liderado por Maurice Rapport, detallaron diferentes métodos químicos para realizar la caracterización, extracción, biosíntesis y metabolismo de un compuesto con características parecidas a la enteramina, pero que ellos denominaron serotonina [115-118]. En 1949 este mismo grupo logró determinar su estructura química, identificándola como 5-hidroxitriptamina (5-HT) [119]. Tres años después se reconoció que la enteramina y la serotonina eran el mismo compuesto químico, la 5-HT [120, 121].

### Características generales de la 5-HT

La 5-HT (3-(2-aminoetil)-5-hidroxi-indol;  $C_{10}H_{12}N_2O$ ) (**Figura 3**), es una amina biogénica que posee un peso molecular de 176 daltones. En términos evolutivos la 5-HT es uno de los transmisores más antiguos, ya que se encuentra ampliamente distribuida en diferentes reinos de los organismos vivos: plantas [122], animales celenterados [123], moluscos [124] y artrópodos [125].

---



**Figura 3.** Estructura química de la 5-HT.

La 5-HT es un neurotransmisor importante que actúa en una amplia variedad de sitios del sistema nervioso central (SNC) y periférico [126]. En el SNC del ser humano participa en la regulación de numerosos procesos fisiológicos y patológicos, tales como sueño, estados de ánimo, depresión, ansiedad, fobia social, esquizofrenia, desórdenes obsesivos-compulsivos, migraña, memoria, hipertensión vascular, frecuencia cardiaca, desórdenes de alimentación, vómito y el síndrome de intestino irritable [127]. La 5-HT tiene un efecto inmunomodulador ya que regula una amplia variedad de respuestas celulares como migración, fagocitosis, generación de superóxido dismutasa y la producción de citocinas [128].

En el cerebro las neuronas de los nueve núcleos del rafé son la principal fuente de liberación de 5-HT. Estos núcleos están distribuidos a lo largo del tallo cerebral, y a partir de ellos nacen fibras que llegan a prácticamente todo el SNC (ganglios basales, hipotálamo, tálamo, hipocampo, sistema límbico, corteza cerebral, cerebelo y médula espinal).

A nivel periférico una fuente importante de 5-HT son las células enterocromafines del tubo digestivo, que responden a la estimulación mecánica o química liberando 5-HT en la pared visceral. Otra fuente periférica de 5-HT son las células neuroendócrinas pulmonares (también llamadas cuerpos neuroepiteliales cuando se agrupan en conglomerados). Al igual que las células enterocromafines, las células neuroendócrinas pulmonares también captan diversos estímulos, en especial las condiciones de hipoxia [129, 130]. La 5-HT también está presente en altas concentraciones en los basófilos y células cebadas [131].



---

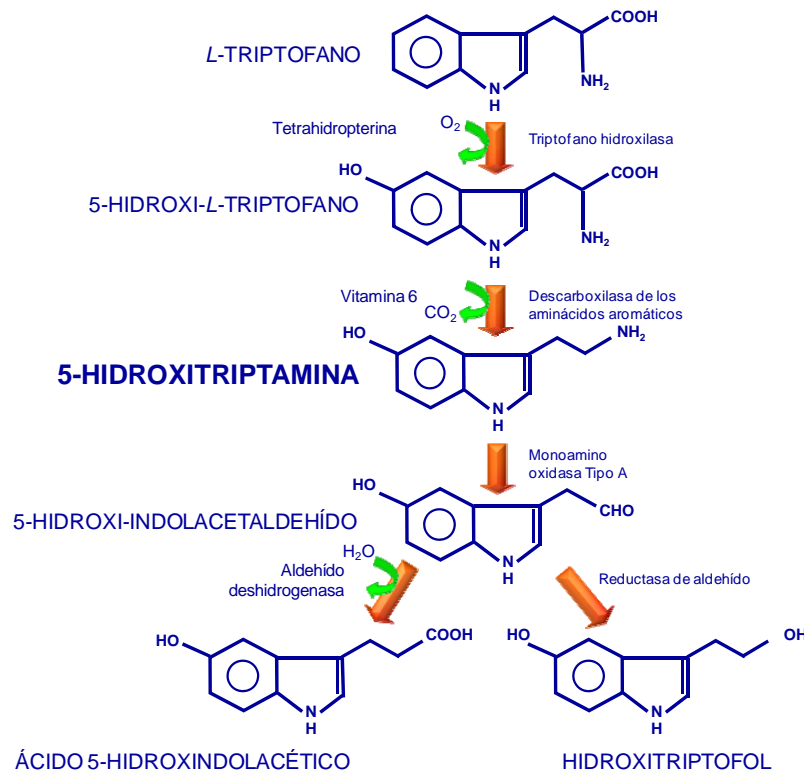
En la sangre la 5-HT es recapturada, almacenada y transportada por las plaquetas, de donde puede ser liberada durante la agregación plaquetaria [132, 133]. La recaptura de 5-HT también se lleva a cabo en las células endoteliales de las venas del cordón umbilical humano, capilares cerebrales, aorta de rata, arteria pulmonar bovina y porcina, pero la cantidad puede variar de acuerdo al lecho vascular. La 5-HT que no se recaptura es metabolizada por la monoaminoxidasa A (MAO<sub>A</sub>) que está presente en el hígado y el endotelio vascular pulmonar.

Los niveles plasmáticos de 5-HT libres son alrededor de 10 ng/ml [134]. En el líquido cefalorraquídeo los valores comprenden de 0.064 a 12.7 ng/ml [135].

### **Síntesis y metabolismo de la 5-HT**

La síntesis de 5-HT se lleva a cabo a partir del aminoácido esencial L-triptófano, que proviene de la dieta y es captado por la célula (**Figura 4**). La enzima limitante en la síntesis de la 5-HT es la triptófano hidroxilasa (TPH), la cual transfiere un hidroxilo al indol del L-triptófano [136]. Para entrar en actividad esta enzima requiere oxígeno molecular y la tetrahydrobiopterina (H<sub>4</sub>B) como cofactor. Existen dos tipos de TPH, la TPH<sub>1</sub> que está expresada principalmente a nivel periférico y glándula pineal [137], y la TPH<sub>2</sub> que es abundante en cerebro. A través de la actividad de la TPH el L-triptófano se metaboliza en 5-hidroxitriptofano (5-HTP), el cual no se encuentra en cerebro ya que se descarboxila con rapidez.

---



**Figura. 4.** Síntesis y metabolismo de la 5-HT. La 5-HT proviene de la hidroxilación del triptófano mediante la acción de la triptófano-hidroxilasa que produce 5-hidroxi-l-triptófano; éste es descarboxilado, dando lugar a la 5-HT. Los niveles de 5-HT están regulados por la captación de triptófano y por la acción de la monoaminoxidasa (MAO).

El 5-HTP es descarboxilado en la cadena lateral mediante la descarboxilasa de los L-aminoácidos aromáticos, y convertido en 5-HT.

En el pulmón, la 5-HT circulante es transportada a las células endoteliales y epiteliales pulmonares y es ahí donde es metabolizada. En este contexto, diversas formas de daño pulmonar involucran lesión de las células endoteliales y esto puede producir una reducción en la capacidad de metabolizar la 5-HT [134]. La degradación metabólica de la 5-HT se lleva a cabo preferencialmente a través de la MAO<sub>A</sub>, que produce una desaminación oxidativa y la transforma en 5-hidroxiindol acetaldehído [138]. Este compuesto es posteriormente modificado por la aldehído deshidrogenasa para producir ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) o por la aldehído reductasa, resultando en la producción de 5- hidroxitriptofol. Una vía alternativa de degradación de 5-HT es a través de la 5-HT N acetilasa, que la convierte en N-acetil-5-HT. Este último metabolito puede ser transformado en melatonina por la enzima hidroxindol-O-metiltransferasa.

En las fibras nerviosas la 5-HT es almacenada en estructuras vesiculares, pequeños sacos membranales localizados en los sitios cercanos de liberación axonal. Las vesículas protegen a la 5-HT de la acción degradadora de la MAO<sub>A</sub>.

En un trabajo reciente se encontró que la 5-HT exógena es transportada a las células cultivadas de MLVA por el transportador específico de la serotonina (serotonin transporter, SERT) y metabolizada por la MAO<sub>A</sub> sugiriendo que el MLVA puede contribuir en la inactivación de la 5-HT [132].

### **Receptores de 5-HT**

La actividad biológica y farmacológica de la 5-HT en el organismo es muy compleja debido a la gran variedad de subtipos de receptores sobre los que actúa. En 1957 Gaddum y Picarelli propusieron una clasificación de los receptores de 5-HT basada en la sensibilidad del íleon de cobayo a la contracción inducida por 5-HT y otros fármacos utilizados. Estos autores propusieron dos tipos de receptores según fueran bloqueados principalmente por morfina (*receptores M*) o por dibenzilina (*receptores D*) [139, 140]. En 1979 Peroutka y Snyder, utilizando técnicas de radio-ligando, carbono 14 y tritio (<sup>3</sup>H), describieron dos clases de receptores a 5-HT en cerebro, que recibieron los nombres de 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub> [141]. En los años siguientes comenzaron a describirse más tipos y subtipos de receptores, por lo que en 1986 un comité internacional acordó unificar la nomenclatura de los receptores de 5-HT [142]. Este grupo propuso tres principales familias de receptores con base en su respuesta a agonistas y antagonistas. En la actualidad, con el surgimiento de nuevas técnicas de farmacología, biología molecular y genética, los receptores para 5-HT han sido clasificados de acuerdo con los criterios operacionales, estructurales y transduccionales [136, 143-147]:

- a. Los criterios operacionales de clasificación corresponden básicamente a los datos farmacológicos (potencia y selectividad de agonistas y antagonistas, constantes de disociación, unión de radioligandos).
-

- b. Los criterios transduccionales involucran los diferentes sistemas de transducción de señales acoplados al receptor (proteínas G, cinasas de tirosina o canales iónicos acoplados a proteínas G).
- c. Los criterios estructurales comprenden el conocimiento de la secuencia de nucleótidos y, por ende, la secuencia de aminoácidos de un receptor.

En la actualidad han sido descritas 7 familias de receptores de 5-HT (5-HT<sub>1</sub> a 5-HT<sub>7</sub>) [143]. De acuerdo con las recomendaciones de la IUPHAR (por sus siglas en inglés, *International Union of Basic and Clinical Pharmacology*) se asignan letras minúsculas a los receptores de 5-HT recombinantes con características operacionales y funcionales poco conocidas, mientras que para los receptores caracterizados adecuadamente por sus datos operacionales, transduccionales y estructurales se utilizan letras mayúsculas [148, 149]. Cada una de estas familias de receptores tiene diversos subtipos. La clasificación más reciente elaborada por la IUPHAR se muestra en el **Cuadro 1** [150]. El subtipo 5-HT<sub>1C</sub> fue designado inicialmente como receptor 5-HT<sub>1</sub> pero luego se reclasificó como 5-HT<sub>2C</sub> porque tenía más similitud estructural y de señalización con la familia 5-HT<sub>2</sub> [143, 146].

Con excepción del receptor 5-HT<sub>3</sub>, el cual es un receptor ionotrópico, los demás 5-HTR son receptores metabotrópicos, los cuales pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a las proteínas G.

Los receptores 5-HT<sub>1</sub> presentan, de manera preferencial, un mecanismo de transducción acoplados negativamente a la AC vía la proteína G<sub>i</sub>/G<sub>0</sub> y, por lo tanto, su actividad reduce la generación de cAMP, tal como se mencionó previamente [46, 50, 146].

Los receptores 5-HT<sub>2</sub> están caracterizados por el mecanismo de transducción de los fosfoinosítidos (PI), ya que se encuentran acoplados positivamente a la PLC por G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub>, lo que permite la conversión de PIP<sub>2</sub> a IP<sub>3</sub> y DAG, produciendo un incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> [146, 151].

Los receptores 5-HT<sub>3</sub> son ionotrópicos y están constituidos por un canal catiónico dependiente de ligando inespecífico para Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>. Al activarse este receptor se produce una rápida corriente entrante (despolarización) debido a la apertura de canales catiónicos no selectivos (influjo de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>, con eflujo de K<sup>+</sup>) [140].

---

Aunque los receptores 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub> están todos acoplados de manera preferente a G<sub>s</sub> y promueven la formación de cAMP, estos receptores están clasificados en familias diferentes porque exhiben <40% de homología en su secuencia [150].

El mecanismo de transducción del receptor 5-ht<sub>5a</sub> no está plenamente caracterizado, y hay datos que sugieren que es a través de G<sub>i</sub>/G<sub>0</sub> y/o de G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub>. El receptor 5-ht<sub>5b</sub> tiene una gran homología con el 5-ht<sub>5a</sub> y se ha descrito en el ratón y el ser humano, pero en este último no es funcional [150].

**Cuadro 1. Subtipos de receptores de 5-HT y los mecanismos de transducción de señales**

Receptor	Subtipo de receptor	Vías de transducción de señales
5-HT <sub>1</sub>	5-HT <sub>1A</sub> 5-HT <sub>1B</sub> 5-HT <sub>1D</sub> 5-ht <sub>1e</sub> 5-HT <sub>1F</sub>	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub> (↓cAMP)
5-HT <sub>2</sub>	5-HT <sub>2A</sub> 5-HT <sub>2B</sub> 5-HT <sub>2C</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> (↑IP <sub>3</sub> /DAG)
5-HT <sub>3</sub>	5-HT <sub>3AB</sub> 5-HT <sub>3A</sub>	Canal iónico (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> )
5-HT <sub>4</sub>		G <sub>s</sub> (↑cAMP)
5-ht <sub>5</sub>	5-ht <sub>5a</sub> 5-ht <sub>5b</sub>	¿G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub> (↓cAMP) y/o G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> (↑IP <sub>3</sub> /DAG)?
5-HT <sub>6</sub>		G <sub>s</sub> (↑cAMP)
5-HT <sub>7</sub>		G <sub>s</sub> (↑cAMP)

*Fuente: International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR), 2010.[150]*

### La 5-HT en las vías aéreas

Actualmente existe poca información relacionada con la participación fisiológica específica de la 5-HT en el aparato respiratorio. Si bien las fibras serotoninérgicas no han sido descritas en el aparato respiratorio, la 5-HT se encuentra almacenada en fuentes no neuronales como

las células neuroendócrinas pulmonares de diferentes especies de mamíferos, incluyendo los seres humanos [134, 152-156]. Los niveles de 5-HT en el tejido pulmonar sano son directamente proporcionales a su concentración plasmática, siendo su principal fuente de origen la plaquetaria [135, 157].

Existen evidencias que muestran que la 5-HT puede estar involucrado en enfermedades respiratorias, como el asma. Se ha reportado que existe un incremento en los niveles plasmáticos de la 5-HT libre de los pacientes asmáticos sintomáticos comparada con los niveles de pacientes asintomáticos y este incremento está relacionado con la severidad del asma [158]. Además, ha sido descrito que la tianeptina (una droga que baja los niveles de la 5-HT por el aumento en la recaptura de 5-HT) incrementa la función pulmonar en niños asmáticos [159].

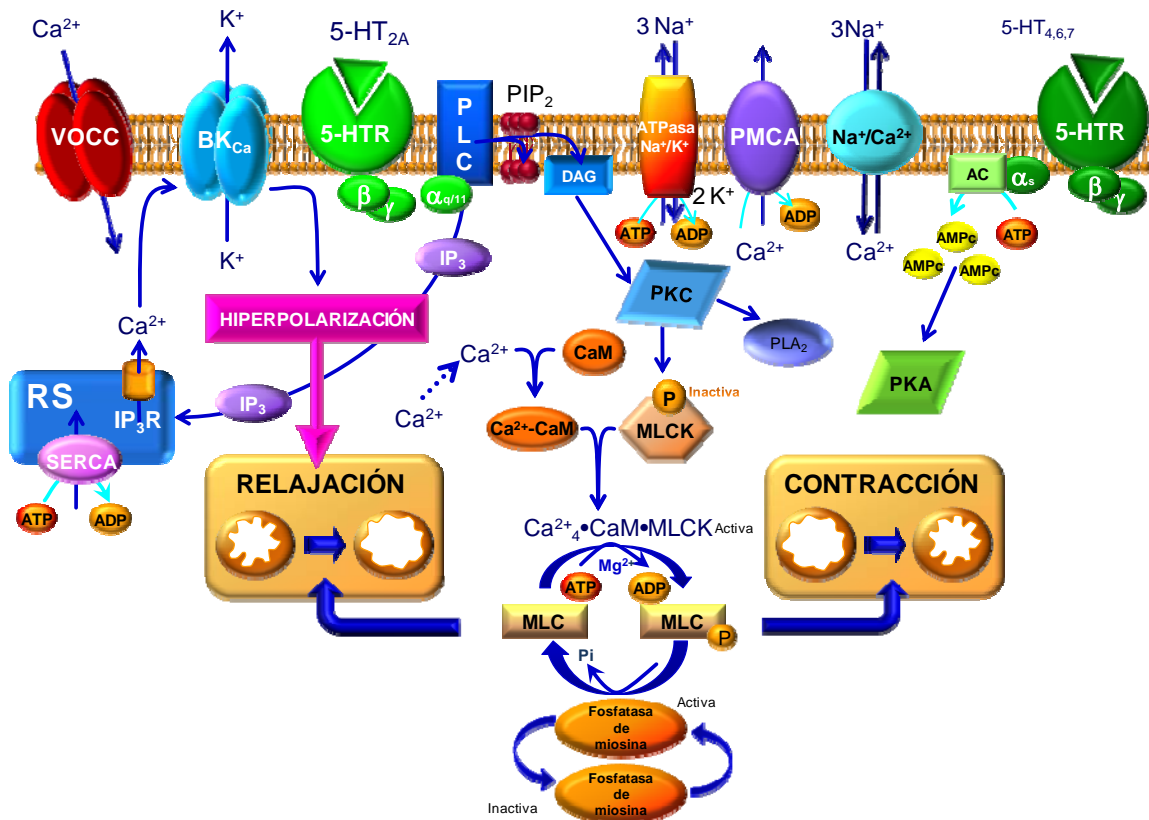
Bayer y col. [128] muestran que la 5-HT estimula diferentes vías de señalización y regula la liberación de quimiocinas y otras citocinas (IL-6 y CXCL8/IL-8) por las células epiteliales de las vías aéreas.

En un trabajo realizado recientemente por nuestro grupo se evaluó el papel de la 5-HT en el desarrollo de la hiperreactividad de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica en cobayos sensibilizados a la ovoalbúmina (OVA) [156]. En ese estudio se hicieron curvas dosis-respuesta a ACh intravenosa en animales anestesiados, midiendo como respuesta la resistencia pulmonar. Los resultados mostraron que un reto antigénico incrementa notablemente la sensibilidad de las vías aéreas a la ACh (es decir, causó hiperreactividad), y que este efecto era bloqueado por antagonistas de los receptores 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>4</sub> o 5-HT<sub>7</sub>. Experimentos farmacológicos adicionales permitieron sugerir que los receptores 5-HT<sub>4</sub> y 5-HT<sub>7</sub> estaban situados a nivel presináptico y facilitaban la liberación de ACh. Más aún, en homogenados pulmonares se pudo constatar que el proceso de sensibilización alérgica causa un incremento significativo de la concentración de 5-HT.

### **Efecto de la 5-HT sobre el músculo liso**

La 5-HT puede activar diferentes mecanismos intracelulares para producir contracción o relajación del músculo liso, dependiendo del subtipo de receptor involucrado (*Figura 5*).

---



**Figura 5.** Mecanismos intracelulares de contracción y relajación del músculo liso inducidos por serotonina (5-HT). Al unirse el agonista 5-HT<sub>2A</sub> con su receptor 5-HT<sub>2A</sub> (5-HTR<sub>2A</sub>), la proteína G (G<sub>q/11</sub>), formada por tres subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  se disocia y libera su subunidad catalítica  $\alpha$ , la cual activa la fosfolipasa C $\beta$  (PLC) e inicia la hidrólisis de los fosfoinosítidos, el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato ( $PIP_2$ ) y da origen a dos mensajeros: 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato ( $IP_3$ ). El DAG, unido a la membrana plasmática, activa la cinasa de proteína C (PKC), la cual cataliza la fosforilación de una gran variedad de proteínas intracelulares. El  $IP_3$  se une a su receptor ( $IP_3R$ ) en el retículo sarcoplásmico (RS) e induce la liberación de calcio ( $Ca^{2+}$ ) del RS. El  $Ca^{2+}$  citoplásmico modifica la estructura de la calmodulina (CaM), formándose el complejo  $Ca^{2+}$ -calmodulina y que es capaz de activar a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) que fosforila a la cadena ligera de la miosina (MLC), produciéndose la contracción. Cuando la  $[Ca^{2+}]_i$  disminuye la CaM se disocia de la MLC y se produce la relajación. Cuando el agonista 5-HT se une a los receptores 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> o 5-HT<sub>7</sub> promueve la actividad de la adenilciclase (AC) que se encuentra unida a la membrana. La AC cataliza la formación de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) intracelular a partir del trifosfato de adenosina (ATP). El aumento de cAMP produce la activación de la cinasa de proteína A (PKA), la cual promueve la relajación del MLVA a través de la fosforilación de diversos elementos. La regulación del  $Ca^{2+}$  involucra la actividad de la ATPasa de  $Ca^{2+}$  de la membrana plasmática (PMCA), el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  la ATPasa de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoendoplásmico (SERCA). Se ilustran también los canales iónicos como los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes del voltaje (VOCC) y los canales de  $K^+$  de alta conductancia dependiente de  $Ca^{2+}$  ( $BK_{Ca}$ ).

---

**Contracción**

Diversas publicaciones científicas describen la participación de la 5-HT en los mecanismos de contracción y relajación de las vías aéreas de animales. La 5-HT produce broncoconstricción en muchas especies de mamíferos [160, 161], pero no en seres humanos sanos o asmáticos [157]. Por lo anterior, la importancia de la participación de la 5-HT en la función pulmonar ha sido controversial, y algunos autores han definido que la relevancia de la 5-HT en la clínica es incierta [161].

Otros autores han demostrado que en condiciones *in vitro* la 5-HT produce contracción del MLVA, siendo el mecanismo principal la estimulación directa de los receptores 5-HT<sub>2</sub> y de manera específica el receptor 5-HT<sub>2A</sub> [162-168]. Ha sido ampliamente demostrado que la activación de receptores 5-HT<sub>2</sub> produce de manera directa una respuesta de contracción del MLVA [162, 169]. Sin embargo, también se ha descrito que receptores presinápticos de 5-HT facilitan la liberación de neurotransmisores de nervios colinérgicos y eNANC de las vías aéreas, tanto en humanos como en roedores [153, 166, 168, 170-175]. Además, se ha reportado que la estimulación de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> de las células epiteliales de la vía aérea de ratón produce la liberación de ACh por estas células [173]. Lo anterior ha llevado a sugerir que la contracción del MLVA por 5-HT depende parcialmente de la liberación de otros neurotransmisores o mediadores.

Van Oosterhout y col. (1991) describieron en tráqueas de ratón que los receptores presinápticos que favorecen la liberación de ACh de neuronas parasimpáticas son los previamente clasificados como 5-HT<sub>1-like</sub> [176] (actualmente se sabe que los 5-HT<sub>1-like</sub> corresponden a los 5-HT<sub>1B/1D</sub> y/o 5-HT<sub>7</sub> [177, 178]). Este mismo mecanismo de liberación de ACh por estimulación presináptica se ha encontrado en cobayos a través de receptores 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub> y 5-HT<sub>7</sub> [156, 174, 175], y en el ser humano a través de receptores 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub> [175, 179].

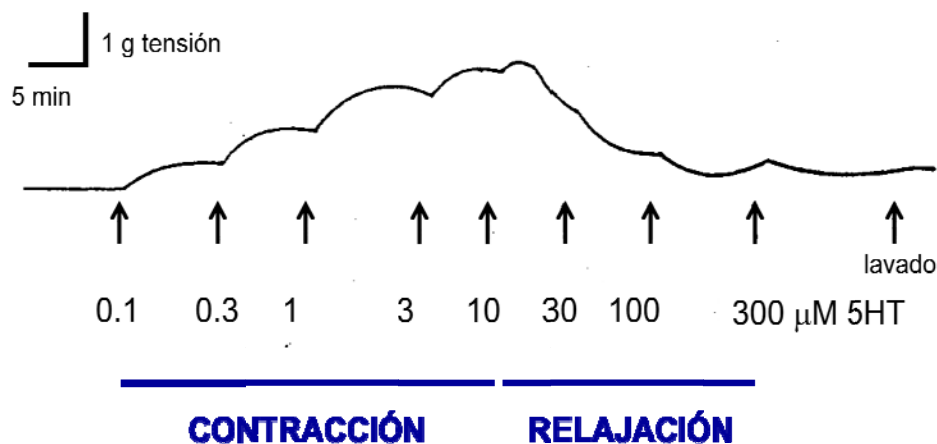
---



## Relajación

La caracterización de los mecanismos involucrados en la relajación inducida por 5-HT ha sido escasamente investigada. En condiciones *in vitro* la 5-HT induce una contracción sostenida en el MLVA de bovino, perro, caballo o ratón [37, 164, 166, 180-182], pero no en preparaciones de cobayo y bronquio humano, las que responden con una respuesta bifásica (una contracción seguido de una relajación) [169, 181, 183].

Baumgartner y col., (1990) encontraron que, en el músculo liso traqueal de cobayo la 5-HT producía contracción a concentraciones bajas (0.1 a 10  $\mu\text{M}$ ) y causaba relajación a concentraciones mayores (10 a 300  $\mu\text{M}$ ) (**Figura 6**). Estos autores propusieron que tanto la fase de contracción como la de relajación eran debidas a la estimulación de un mismo receptor, que en la fase de contracción tendría una alta afinidad para 5-HT y en la fase de relajación baja afinidad. Así también, observaron que a dosis altas de 5-HT se induce preferentemente la producción de  $\text{IP}_3$  y un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  liberado de los almacenes intracelulares[169].



**Figura 6.** Respuesta de contracción y relajación descrita por Baumgartner y col., (1990). En este estudio, la 5-HT a dosis bajas (0.1 a 10  $\mu\text{M}$ ) produjo un incremento en la contracción de músculo liso de las vías aéreas y a concentraciones mayores ( $>10 \mu\text{M}$ ) indujo una relajación.

Ben-Harari y col. [183] postularon que la fase de relajación inducida por una concentración de 5-HT era producida por una desensibilización del receptor 5-HT<sub>2</sub>.

En este contexto, Kitazawa y col. [184, 185] e Inoue y col. [186] propusieron que en el músculo liso uterino porcino la acción relajadora de la 5-HT es a través de una elevación de cAMP, con una disminución de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y de la sensibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  de los elementos contráctiles, así como la probable activación de los canales de  $\text{K}^+$ , sugiriendo que dicho efecto está mediado por receptores 5-HT<sub>7</sub>. Recientemente Glusa y Pertz [187] encontraron que la 5-HT induce relajación de la arteria pulmonar del cerdo a través de los receptores 5-HT<sub>2B</sub> del endotelio.

Evalutando la recaptura de  $^{86}\text{Rb}^+$  sensible a OUA en células de músculo liso traqueal de cobayo, Rhoden y col. [91] encontraron que la 5-HT estimula la actividad de la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  a través de los receptores 5-HT<sub>2A</sub>, pero estos autores no exploraron las consecuencias funcionales de dicha estimulación.

Finalmente, algunos otros mecanismos relajadores que pueden actuar sobre el MLVA y cuya participación no se ha explorado durante la relajación inducida por 5-HT son la estimulación de receptores adrenérgicos  $\beta_2$ , la producción de NO, así como la activación de los canales  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ .

---

---

---

## PLANTEAMIENTO DE ESTUDIO

Como se mencionó previamente, todavía se desconocen muchos aspectos de los mecanismos fisiológicos por los cuales la 5-HT produce contracción del MLVA y, más aún, de los mecanismos por los cuales origina relajación. Por lo tanto, el presente estudio evalúa al MLVA de cobayo durante la contracción y relajación inducidas por 5-HT, con o sin intervención farmacológica con diversos agonistas o antagonistas de sus receptores, y mediante diversas técnicas de laboratorio, tales como baño de órganos aislados, microfluorometría en célula única y registro de corrientes iónicas con *patch-clamp*. La información que se puede obtener del sistema de órganos aislados es diferente a la que deriva de los otros dos tipos de registro. En los órganos aislados se evalúa no sólo al MLVA, sino también a otros grupos celulares como células epiteliales, células cebadas y neuronas, todos ellos con capacidad de interactuar con el músculo liso. Por el contrario, en los sistemas de célula única como el *patch-clamp* y la microfluorometría se tiene la seguridad de que la respuesta observada (corrientes iónicas o concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, respectivamente) son debidas a la estimulación directa del miocito por el compuesto químico evaluado. Teniendo en mente estas distintas técnicas para evaluar el efecto de la 5-HT y otros agentes farmacológicos, se plantean las siguientes preguntas de investigación:

1. ¿Cuáles son los receptores 5-HT involucrados en la contracción y relajación del MLVA de cobayo?
  2. ¿Qué otros mecanismos adicionales (como la liberación de ACh, la estimulación de receptores adrenérgicos  $\beta_2$  o la producción de óxido nítrico [NO]) están involucrados en la contracción y relajación inducidas por la 5-HT en el MLVA de cobayos?
  3. ¿Cuáles son los cambios que ocurren en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durante la estimulación con 5-HT?
  4. ¿La 5-HT incrementa la actividad de la SERCA?
  5. ¿Se modifican las corrientes de  $\text{K}^+$  por la 5-HT?
-

---

---

## JUSTIFICACIÓN DE ESTUDIO

La 5-HT produce broncoconstricción en muchas especies de mamíferos actuando directamente sobre el MLVA [161, 169, 188]. Aunque en seres humanos sanos la 5-HT inhalada no produce cambios en el calibre de las vías aéreas [161], hay indicios de su posible participación en el asma. Así, se ha encontrado que durante la crisis asmática existe incremento de los niveles plasmáticos de 5-HT y este aumento guarda una asociación significativa con la gravedad del asma y una correlación inversa muy estrecha con la función pulmonar [158].

Por otro lado, en niños asmáticos el tratamiento con tianeptina, un compuesto promotor de la recaptura de 5-HT, reduce los niveles plasmáticos de 5-HT y mejora la función pulmonar y los síntomas del asma [159]. Hasta la fecha, existen escasos estudios que identifiquen los subtipos de los receptores 5-HT involucrados en la contracción y relajación del MLVA en cobayos sensibilizados y no sensibilizados.

El presente trabajo tiene como objetivo comprender mejor la participación de la 5-HT en la fisiología del MLVA a través de la caracterización farmacológica de sus diferentes tipos de receptores involucrados en el proceso contracción-relajación.

---

---

---

## HIPÓTESIS

1. La 5-HT induce contracción del MLVA a través de los receptores 5-HT<sub>2A</sub>.
  2. La 5-HT induce relajación del MLVA a través de los receptores 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y/o 5-HT<sub>7</sub>.
  3. La relajación inducida por la 5-HT involucra la estimulación del receptor adrenérgico  $\beta_2$ .
  4. La relajación promovida por la 5-HT es producida por la liberación del NO.
  5. La 5-HT induce un incremento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular en miocitos aislados a través de los receptores 5-HT<sub>2A</sub>.
  6. La 5-HT incrementa la actividad de la SERCA.
  7. La 5-HT aumenta las corrientes salientes de K<sup>+</sup> en miocitos aislados a través de los receptores 5-HT.
-

---

---

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Caracterizar farmacológicamente los principales receptores 5-HT involucrados en la contracción y relajación del MLVA de cobayo, e identificar algunos de sus posibles mecanismos reguladores.

### Objetivos específicos

#### *1. Estudios en baños de órganos aislados*

- 1a. Evaluar el efecto de contracción y/o relajación de la 5-HT en el MLVA de cobayo (anillos traqueales) a concentraciones únicas no acumulativas (1  $\mu\text{M}$  a 1000  $\mu\text{M}$ ).
  - 1b. Evaluar la modificación de la contracción y/o relajación causada por 5-HT (32  $\mu\text{M}$ ) con los siguientes fármacos:
    - i. Diversos antagonistas de los receptores 5-HT (ver *Cuadro 2*).
    - ii. Un antagonista colinérgico (atropina).
    - iii. Un antagonista de los receptores adrenérgicos  $\beta_2$  (propranolol, PROP).
    - iv. Un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico (L-NAME).
  - 1c. Evaluar la capacidad de la 5-HT para producir relajación en anillos traqueales contracturados con histamina.
  - 1d. Evaluar la participación específica de los receptores 5-HT<sub>2</sub> mediante el uso de un agonista selectivo para este receptor ( $\alpha$ -MET).
  - 1e. Analizar los diversos mecanismos señalados en los objetivos 1a, 1b y 1c, empleando  $\alpha$ -MET en sustitución de 5-HT.
-

---

---

**2. Estudios con mediciones en célula única**

- 2a. Evaluar los cambios que ocurren en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en miocitos aislados durante la estimulación inducida por 5-HT, con o sin preincubación con un antagonista de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> (ketanserina, KT).
  - 2b. Evaluar los cambios que ocurren en las corrientes de  $\text{K}^{+}$  en miocitos aislados durante la estimulación con 5-HT, con o sin preincubación con diversos antagonistas de los receptores 5-HT (ver **Cuadro 2**).
  - 2c. Evaluar la contribución de los canales de  $\text{K}^{+}$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  en el mecanismo de relajación inducido por una dosis única de 5-HT (32  $\mu\text{M}$ ).
  - 2d. Evaluar de forma indirecta el efecto de la 5-HT sobre la actividad de la SERCA.
  - 2e. Evaluar la participación específica de los receptores 5-HT<sub>2</sub> mediante el uso de un agonista selectivo para este receptor ( $\alpha$ -MET), y sobre sus respuestas analizar los diversos mecanismos señalados en los objetivos 2a y 2b, empleando  $\alpha$ -MET en sustitución de 5-HT.
-

---

---

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales de estudio

Se utilizaron cobayos machos, cepa Hartley, con peso de 500-600 g, criados en condiciones convencionales de bioterio (aire acondicionado filtrado,  $21\pm 1^\circ\text{C}$ , 50-70% de humedad, cama estéril) con acceso a agua y alimento esterilizado Harlan<sup>®</sup> *ad libitum* con un ciclo de luz y oscuridad de 12-12 horas. El protocolo de investigación fue evaluado y aprobado por los Comités Científico y de Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (B22-07) y por la Comisión Nacional de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (2006/1A/I-077). Los experimentos se realizaron de acuerdo con lo establecido en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación y la NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

### Estudios en sistema de órganos aislados *in vitro* (anillos traqueales)

Los animales se anestesiaron con pentobarbital ( $35 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ) administrado por vía intraperitoneal y fueron exsanguinados. La tráquea se extrajo y se colocó en una caja de Petri con solución Ringer Krebs a temperatura ambiental. Después de retirar el tejido conjuntivo adyacente se realizaron cortes transversales de 5 mm de largo para obtener hasta ocho anillos traqueales. Cada uno de estos anillos fue sometido a condiciones experimentales diferentes. Los tejidos se colocaron en cámaras de órganos aislados que contenían 5 ml de solución Ringer Krebs a  $37^\circ\text{C}$  con la siguiente composición (mM): NaCl 120, KCl 4.77,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{MgSO}_4$  1.2,  $\text{NaHCO}_3$  25,  $\text{CaCl}_2$  2.5, y glucosa 11. A esta solución se le administró  $1 \mu\text{M}$  de indometacina para evitar la síntesis de prostaglandinas endógenas, como ha sido descrito previamente [189]. Además, la solución se burbujeó continuamente con una mezcla de 5% de  $\text{CO}_2$  en oxígeno (pH 7.4).

Los tejidos se mantuvieron a una tensión de 1 g por una hora, periodo durante el cual fueron lavados con solución Ringer Krebs a intervalos de 15 min. La tensión

---



isométrica se registró con un transductor de tensión (Grass FT03, Grass Instruments, West Warwick, RI, EUA) conectado a un preamplificador (Cyber Amp 380, Axon Instruments, Foster City, CA, EUA). Las señales fueron digitalizadas con una interfaz (Digidata 1200, Axon) y para obtener los datos y los registros de la contracción del músculo liso traqueal se utilizó el programa para computación AxoScope v9.0 (Axon Instruments, Inc). Los anillos traqueales fueron estimulados tres veces con  $K^+$  60 mM para confirmar su viabilidad y el último estímulo se consideró como la respuesta máxima de contracción. Todas las respuestas fueron expresadas como porcentaje de esta respuesta máxima a KCl. Se evaluó la evolución temporal de las respuestas midiéndolas cada 2 min por un periodo de 24 min.

### **Evaluación de mecanismos involucrados en la contracción y/o relajación inducidas por 5-HT**

Con el fin de evaluar el efecto de contracción y/o relajación de la 5-HT, los tejidos se estimularon con concentraciones únicas no acumulativas de 5-HT (1, 3.2, 10, 32, 100, 320, 1000  $\mu$ M). De estas respuestas se seleccionó la concentración de 32  $\mu$ M para ser utilizada en el resto de los experimentos, ya que esta concentración produjo una mejor respuesta de contracción y relajación (ver Resultados).

Para la evaluación de los distintos subtipos de receptores 5-HT involucrados en los mecanismos de contracción y de relajación se utilizaron diferentes antagonistas de receptores 5-HT, tal como se describe en el **Cuadro 2**. Estos antagonistas 5-HT se preincubaron durante 20 min antes de la administración de la dosis única de 5-HT.

Se realizaron experimentos *in vitro* adicionales para determinar la posible participación de otros mecanismos en la contracción y/o relajación inducidas por 5-HT. Para ello, fueron administrados al baño de órganos aislados los compuestos descritos en el **Cuadro 3**, todos ellos administrados 15 min antes de adicionar la concentración de 32  $\mu$ M de 5-HT.

---



**Cuadro 3. Evaluación de mecanismos de contracción y/o relajación en el músculo liso de las vías aéreas**

Compuesto	Efecto	Concentración	Referencia
Atropina	Antagonista muscarínico	1 $\mu$ M	[190]
Pirilamina	Estimulación de receptores H <sub>1</sub>	1 $\mu$ M	[191]
L-NAME	Inhibidor de la sintasa del NO	100 $\mu$ M	[192]
Propranolol	Antagonista $\beta_2$ -adrenérgico	10 $\mu$ M	[193]
Ouabaína	Inhibidor de la ATPasa Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	1 mM	[109]
Caribdotoxina	Bloqueador del canal de K <sup>+</sup> activado por Ca <sup>2+</sup>	0.1 $\mu$ M	[194]
Iberiotoxina	Bloqueador selectivo de los canales de K <sup>+</sup> activados por Ca <sup>2+</sup> de alta conductancia	0.1 $\mu$ M	[195]
ICI 118,551	Antagonista selectivo $\beta_2$ -adrenérgico	0.1 $\mu$ M	[196]
4-Aminopiridina	Bloqueador selectivo de los canales de K <sup>+</sup> activados por voltaje	1 mM	[194]

### Experimentos *in vitro* con $\alpha$ -metil-5-HT

Para evaluar la participación del receptor 5-HT<sub>2</sub> en la contracción y/o relajación del MLVA se utilizó un agonista con alta afinidad por estos receptores, el  $\alpha$ -metil-5-HT ( $\alpha$ -MET). Este compuesto es ampliamente utilizado como herramienta farmacológica para caracterizar la respuesta de 5-HT<sub>2</sub> en diversos tejidos, incluyendo el MLVA [163, 173, 197]. Básicamente, muchos de los experimentos arriba mencionados realizados con 5-HT se replicaron utilizando ahora  $\alpha$ -MET. Así, se realizaron dos tipos de experimentos: 1) Se evaluó la actividad temporal de la respuesta a  $\alpha$ -MET a concentraciones únicas (0.1, 1, 3.2, 10, 32 y 100  $\mu$ M) en los anillos traqueales de cobayo. Al igual que con 5-HT, se seleccionó 32  $\mu$ M como la mejor concentración de  $\alpha$ -MET para los experimentos subsecuentes (ver Resultados). 2) Algunos de los tejidos fueron preincubados con 0.1  $\mu$ M de PROP durante 15 min antes de la adición de la administración de 32  $\mu$ M de  $\alpha$ -MET. Segundo, para evaluar el efecto de relajación del  $\alpha$ -MET, los anillos traqueales fueron contracturados con

10  $\mu\text{M}$  de histamina y después se realizó una curva acumulativa concentración-respuesta a  $\alpha\text{-MET}$  (1, 3, 10, 32 y 100  $\mu\text{M}$ ). Estos experimentos se realizaron en presencia de KT (3 nM) para bloquear la respuesta inducida por los receptores  $5\text{-HT}_{2A}$ . En algunos de estos estudios se añadió 0.1 mM de PROP ó 1 mM de ICI 118,551 (ICI, un antagonista selectivo  $\beta_2$ -adrenérgico) 10 minutos antes de la administración de  $\alpha\text{-MET}$ .

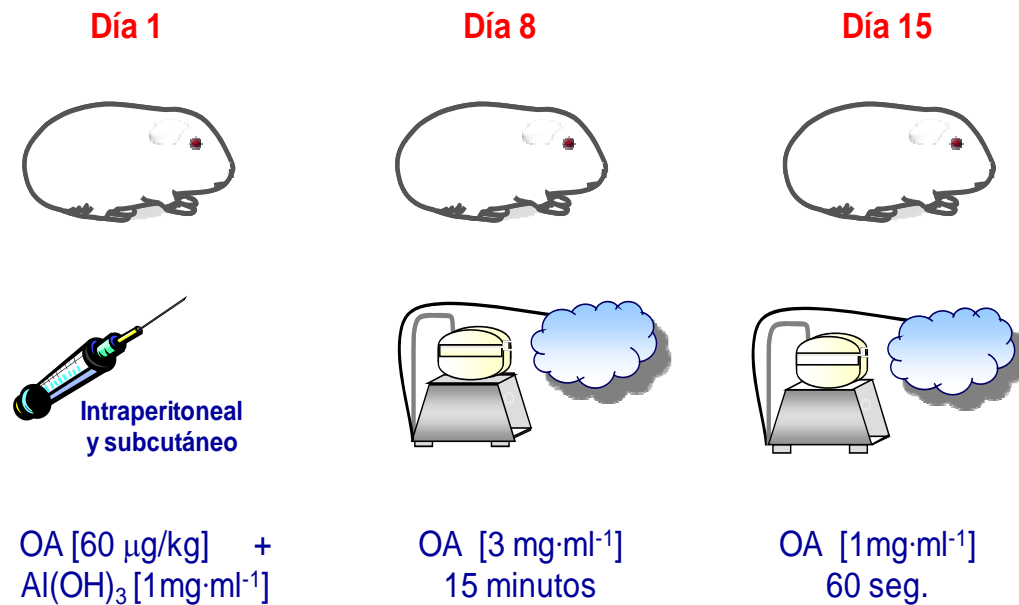
Las respuestas a los agonistas fueron expresadas como porcentaje de la tercera respuesta a KCl, mientras que la respuesta de relajación fue analizada como porcentaje de inhibición de la respuesta máxima de contracción por histamina.

### **Proceso de sensibilización**

En el primer día del proceso de sensibilización se inyectó a los cobayos con 60  $\mu\text{g}$  de ovoalbúmina (OA) y 1 mg de hidróxido de aluminio ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) como adyuvante disueltos en 1 ml de solución salina fisiológica (SSF) que se aplicó a razón de 0.5 ml por vía intraperitoneal y 0.5 ml por vía subcutánea. Siete días después se les administró un refuerzo por vía inhalada con 3 mg/ml de OA disueltos en SSF durante 15 min. El día 15 se realizó un segundo refuerzo por vía inhalada con 1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  de OA en SSF durante 60 s. Todos los animales sensibilizados fueron utilizados a partir del día 21. Se utilizó un equipo de pletismografía para animales en libre movimiento con el fin de evaluar cuantitativamente la respuesta fisiológica a los refuerzos antigénicos (*Figura 7*).

---

## MÉTODO DE SENSIBILIZACIÓN



**Figura 7.** Método de sensibilización con ovoalbúmina (OA) en cobayos. 60  $\mu\text{g}$  de ovoalbúmina (OA) y 1 mg de hidróxido de aluminio (Al(OH)<sub>3</sub>) como adyuvante disueltos en 1 ml de solución salina fisiológica que se aplicó por vía intraperitoneal y por vía subcutánea. En el día 8 se les administró por vía inhalada 3 mg·ml<sup>-1</sup> de OA disueltos en SSF durante 15 min. En el día 15 se aplicó una segunda dosis por vía inhalada con 1 mg·ml<sup>-1</sup> de OA en solución salina fisiológica durante 60 s.

### Estudio de registro de corrientes de K<sup>+</sup> en miocitos

Como se mencionó previamente, en el MLVA la respuesta a la 5-HT es bifásica, con una fase inicial de contracción seguida de relajación. Por lo tanto, se diseñaron algunos experimentos para investigar posibles mecanismos de la fase de relajación. Mediante la técnica de *patch-clamp* se obtuvieron registros de las corrientes de K<sup>+</sup> en células aisladas de MLVA.

#### Obtención de miocitos

Para el aislamiento de células de MLVA se obtuvo un fragmento de tráquea de cobayo, del cual se disecó el MLVA con la ayuda de un microscopio estereoscópico, removiendo el

tejido conjuntivo y los vasos sanguíneos. El músculo liso se colocó en 5 ml de solución de Hanks con 2 mg de cisteína y  $0.05 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$  de papaína, y fue incubado a  $37^\circ\text{C}$  por 10 min, después de lo cual la actividad enzimática se inhibió mediante lavado con solución de Leibovitz. Posteriormente, el tejido se colocó nuevamente en solución de Hanks con una combinación de colagenasa tipo I ( $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y dispasa II (proteasa neutra; Blendzyme 2, Roche, Indianápolis, IN;  $4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) durante 20 min a  $37^\circ\text{C}$ . Al término de este periodo las células de músculo liso se dispersaron por agitación mecánica, después de lo cual la actividad enzimática se detuvo añadiendo solución de Leibovitz. Los miocitos se centrifugaron a 800 rpm a  $20^\circ\text{C}$  durante 5 min y el sobrenadante se descartó. Este último paso se repitió. El botón celular se resuspendió en medio esencial con 5% de suero de cobayo, 2 mM de L-glutamina,  $10 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$  de penicilina,  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de estreptomycinina y 15 mM de glucosa, después de lo cual se cultivó en cajas multipozos en cuyo fondo los cubreobjetos estaban impregnados con colágena esterilizada. El cultivo celular se llevó a cabo a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$  en oxígeno durante 24-48 h. Se permitió que los miocitos se fijaran en el fondo del cubreobjetos previamente cubierto con una capa de colágena de cola de rata.

### **Técnica de patch clamp**

Las células se observaron con un microscopio de luz invertido (IDO3, Zeiss, Jena, Alemania). La cámara se perfundió por gravedad ( $\sim 1.5\text{-}2.0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ) con solución externa con la siguiente composición (mM): NaCl 130, KCl 5,  $\text{CaCl}_2$  1.8, HEPES 10, glucosa 10,  $\text{MgCl}_2$  0.5,  $\text{NaHCO}_3$  3,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2, y ácido niflúmico 0.1 (pH 7.4, ajustado con NaOH). Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiental ( $\sim 21^\circ\text{C}$ ).

Se utilizó la técnica de *patch clamp* (*whole cell*) en configuración de fijación de voltaje en célula entera. Los registros de las corrientes de  $\text{K}^+$  activados por la generación de pulsos de voltaje regulados con un amplificador Axopatch 200-A (Axon). Las pipetas de registro se fabricaron a partir de capilares de borosilicato (1B200F-6 vidrio, World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA) utilizando un programa de estiramiento de dos etapas con un estirador de pipetas (P-87, Sutter Instruments Co, Novato, CA, EUA). La resistencia de la pipeta fue del rango de 2 a 4 M $\Omega$ . Los microelectrodos fueron llenados con una solución interna con la siguiente composición (mM): gluconato de potasio 140, NaCl 5, HEPES 5,

EGTA 10, ATP disódico 5 y GTP sódico 0.1 y leupeptin 0.1 (pH 7.3, ajustado con KOH). La resistencia en serie (10-15 MHz) y la capacitancia total de la célula fueron compensadas electrónicamente. Para asegurar la isopotencialidad durante el procedimiento de fijación de voltaje, se excluyeron aquellas células con capacitancia mayor de 20 pF. Las corrientes fueron filtradas a 1-5 KHz y digitalizadas (Digidata 1200, Axon) a una frecuencia de 10 Hz. Los registros se almacenaron en el disco duro de la computadora para un posterior análisis a través de un programa (p-Clamp v8.0, Axon).

El registro electrofisiológico se realizó aplicando una serie de pulsos cuadrados despolarizantes (-70 a +40 mV) de 500 ms de duración y 1 Hz de frecuencia, en incrementos de 10 mV a partir de un potencial de membrana de -60 mV. Este protocolo de pulsos condicionantes generó corrientes salientes estables. Estas corrientes fueron bloqueadas con la perfusión de 1 mM de tetraetilamonio (TEA), lo que comprobó que éstas correspondían a corrientes de potasio ( $I_{K^+}$ ).

En estas condiciones experimentales, se evaluó el efecto de 32  $\mu$ M de 5-HT con o sin la adición de dos bloqueadores de los canales  $BK_{Ca}$ , uno no selectivo (100 nM de CTX) y otro selectivo para los de alta conductancia (100 nM de IBTX) o un antagonista de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> (10 nM de KT). Con la finalidad de eliminar la actividad de los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje (rectificador tardío), todos los grupos experimentales recibieron 3 mM de 4 aminopiridina (4-AP).

Para evaluar de forma más específica el efecto de la activación de receptores 5-HT<sub>2A</sub> sobre las  $I_{K^+}$ , se añadió un agonista de estos receptores (32  $\mu$ M de  $\alpha$ -MET). Después de realizar este protocolo en condiciones control, se realizaron diferentes protocolos experimentales empleando salbutamol (1 mM), PROP (0.1  $\mu$ M) o ICI 118-551 (ICI, 1  $\mu$ M).

### **Estudio de medición de $Ca^{2+}$ intracelular (microfluorimetría) en miocitos**

Una vez aislados los miocitos traqueales de cobayo, tal como se describió anteriormente (*Obtención de miocitos*), éstos fueron cargados con un marcador de  $Ca^{2+}$  incubándolos durante 1 hora con fura 2-AM (0.5  $\mu$ M) en solución baja en  $Ca^{2+}$  (0.1 mM), a temperatura ambiental (22-25°C) [19, 198]. Al final de este periodo las células se colocaron en un

---

cubreobjetos cubierto previamente con colágena de rata, y esta preparación se colocó en una cámara de perfusión a 37°C y se observó a través de un microscopio invertido (Diaphot 200, Nikon, Tokio, Japón). Los miocitos fueron perfundidos continuamente (2-2.5 ml·min<sup>-1</sup>) con solución Krebs (composición mM: 118 NaCl, 4.6 KCl, 2.0 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>; 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11 glucosa), a 37°C, un pH 7.4 y burbujeada con 5% CO<sub>2</sub> en oxígeno.

Las células cargadas con Fura 2 se estimularon alternadamente con luz de 340 y 380 nm de longitud de onda, y la emisión de luz se colectó a 510 nm usando un microfluorómetro (Photon Technology International, Modelo D-104, Princeton, NJ). La fluorescencia basal se midió en un campo sin células antes de iniciar los experimentos, y ésta fue restada automáticamente de los registros. La tasa de adquisición de fluorescencia fue de 0.5 s. La [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> fue calculada de acuerdo con la fórmula de Grynkiewicz y col. [199]:

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

donde R<sub>max</sub> y R<sub>min</sub> se obtuvieron en presencia de Ca<sup>2+</sup> saturante (10 mM) + ionomicina 10 μM y en ausencia de Ca<sup>2+</sup>+ EGTA 10 mM, respectivamente. El valor de β se calculó a partir del cociente de la fluorescencia observada a 380 nm en ausencia de Ca<sup>2+</sup> y en presencia de Ca<sup>2+</sup> saturante. R se calculó como el cociente de fluorescencia 340/380 nm. De acuerdo con Kajita y Yamaguchi [40], la constante de disociación (K<sub>d</sub>) del Fura-2 es 386 nM. La R<sub>max</sub> fue 8.99 y la R<sub>min</sub> 0.35. Usando una excitación luminosa de 380 nm la relación de fluorescencia (β) entre solución salina libre de Ca<sup>2+</sup> y células saturadas de Ca<sup>2+</sup> fue 3.93.

Después de corroborar la viabilidad de la célula a través de la estimulación con 10 mM de cafeína, algunos miocitos fueron estimulados con 10 μM de 5-HT (para evaluar la capacidad de la 5-HT de liberar Ca<sup>2+</sup> intracelular), y este estímulo fue repetido nuevamente en presencia de 10 nM de KT.

Para evaluar de manera indirecta la actividad de la SERCA se midió la capacidad de los miocitos para rellenar los almacenes de Ca<sup>2+</sup> del RS. Para este fin, después de un estímulo inicial con 10 mM de cafeína (para corroborar viabilidad) los miocitos fueron perfundidos con un medio libre de Ca<sup>2+</sup> y un minuto después con 10 mM de cafeína. La respuesta a este estímulo con cafeína constituye el valor basal (S<sub>1</sub>) y a la vez produce el



---

vaciamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS [198, 200]. A continuación las células fueron lavadas en un medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$  para remover la cafeína y después fueron perfundidas con solución Krebs ( $2.5 \text{ mM Ca}^{2+}$ ) durante 10 minutos para permitir el relleno de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS. Finalmente, la estimulación con cafeína fue repetida una vez más bajo las mismas condiciones libre de  $\text{Ca}^{2+}$  como se realizó previamente para obtener el valor de  $S_2$ . En algunos miocitos, antes de obtener  $S_2$  las células fueron incubadas con  $32 \mu\text{M}$  de 5-HT durante 10 min. En todos estos experimentos la proporción  $S_2/S_1$  corresponde al grado de relleno de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS. Con la finalidad de evaluar si la estimulación de los receptores  $5\text{-HT}_{2A}$  podía incrementar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , con o sin  $10 \text{ nM}$  de KT. Al final de cada experimento se aplicó un nuevo estímulo con cafeína para corroborar la viabilidad del miocito. En otro grupo de experimentos, se evaluó el efecto de  $0.1 \mu\text{M}$  PROP en la respuesta de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a tres estímulos consecutivos con  $100 \mu\text{M}$  de  $\alpha$ -metil-5-HT.

---

---

**Análisis estadístico**

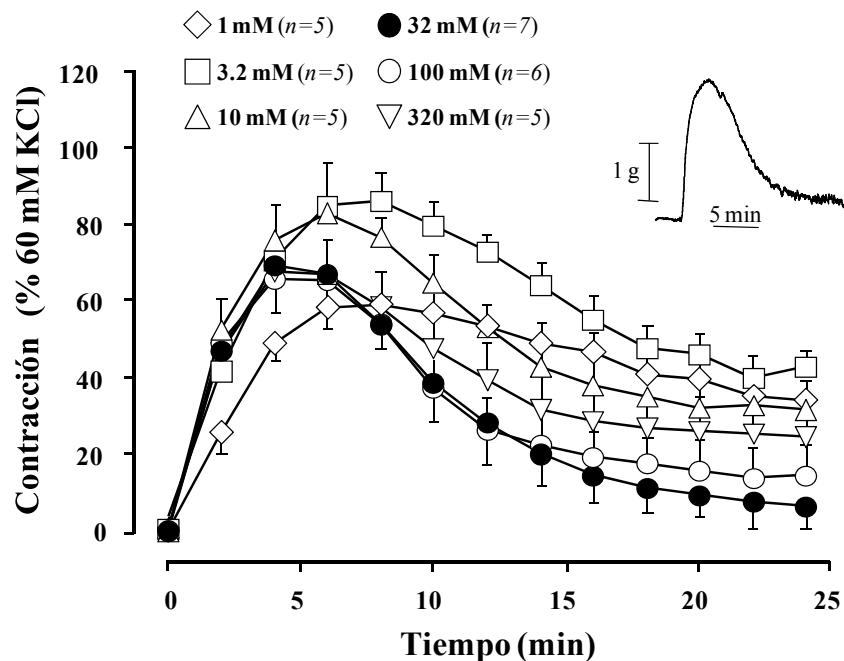
Las diferencias en las respuestas de los anillos traqueales y de la  $[Ca^{2+}]_i$  fueron evaluadas a través de prueba t de Student para datos pareados y no pareados, según aplicara, o bien a través de ANOVA de una vía seguido de prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Los experimentos con *patch-clamp* fueron evaluados a través de ANOVA para mediciones repetidas seguido de prueba de Dunnett. La significancia estadística se fijó a un nivel de  $p < 0.05$  a dos colas. Los datos se expresaron en el texto y las ilustraciones como promedio  $\pm$  error estándar.

---

## RESULTADOS

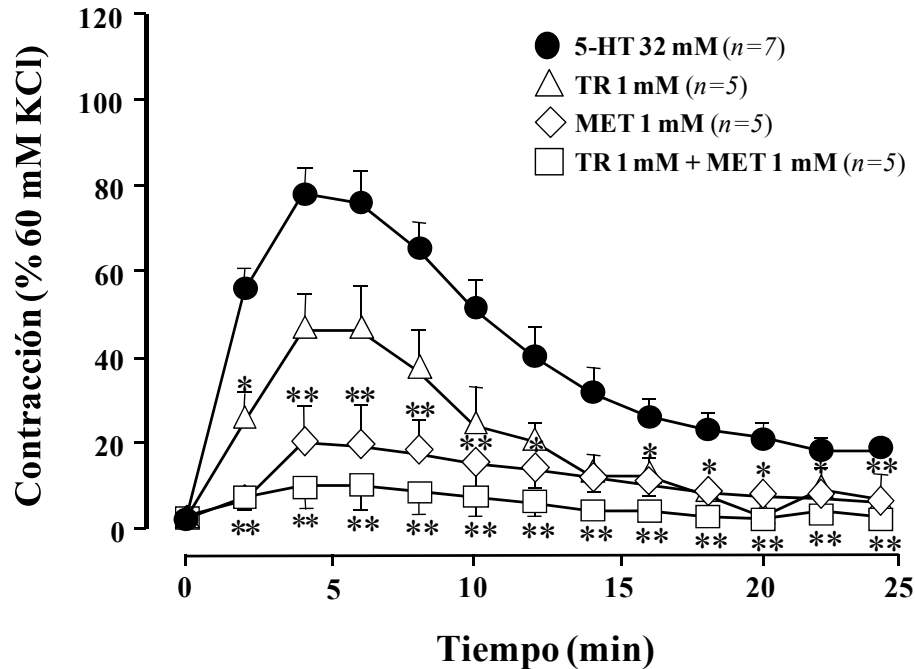
### Estudios en sistema de órganos aislados *in vitro* (anillos traqueales)

La exploración inicial del efecto de la 5-HT sobre el MLVA de cobayo se llevó a cabo mediante la realización de una curva concentración-respuesta acumulativa en segmentos traqueales *in vitro*. Como se puede observar en la **Figura 8**, cada una de las concentraciones no acumulativas de 5-HT (desde 1  $\mu$ M hasta 320  $\mu$ M) produjo una respuesta bifásica en los anillos traqueales, es decir, una respuesta de contracción seguida de una respuesta de relajación (n=5-7). Para poder seleccionar la concentración de 5-HT más representativa, en la cual se observara la mayor contracción seguida de la mayor relajación, se analizó cada una de las dos fases (contracción y relajación) de la respuesta mediante sus áreas bajo la curva (datos no mostrados). La concentración de 5-HT con una mejor representación de la respuesta bifásica fue la de 32  $\mu$ M, por lo que esta concentración fue la que se usó en los experimentos subsecuentes.



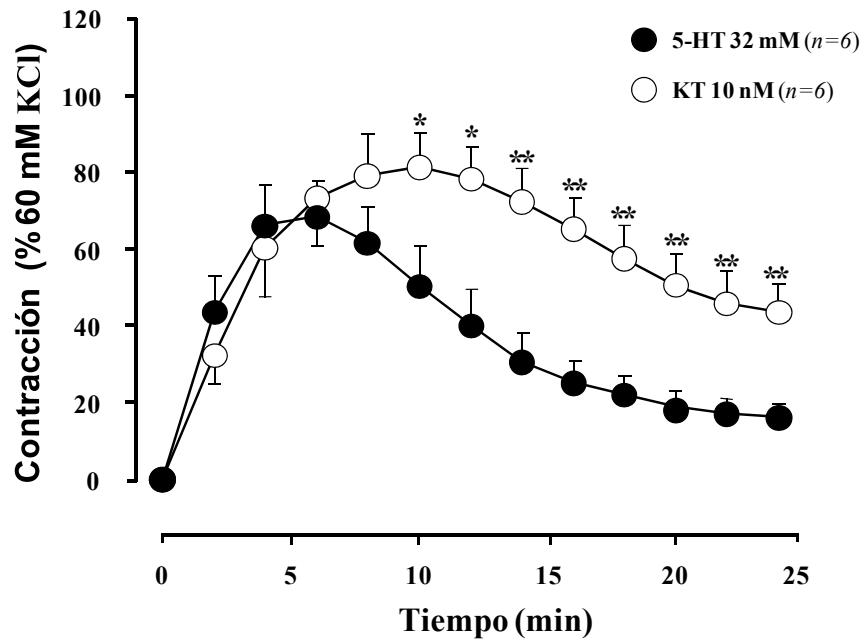
**Figura 8.** Respuesta de los anillos traqueales de cobayo a diferentes concentraciones de 5-HT. Las respuestas bifásicas (contracción-relajación) fueron observadas en cada una de las concentraciones de 5-HT. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  error estándar.

La posible participación de los diferentes receptores de 5-HT en los anillos traqueales fue evaluada con el uso de antagonistas serotoninérgicos. Como se observa en la **Figura 9**, la respuesta de contracción a 32  $\mu$ M de 5-HT ( $n=7$ ) fue reducida notablemente por tropisetron (TR,  $n=5$ ) o metiotepina (MET,  $n=5$ ), y esta respuesta fue prácticamente abolida por el uso de ambos compuestos ( $n=5$ ).



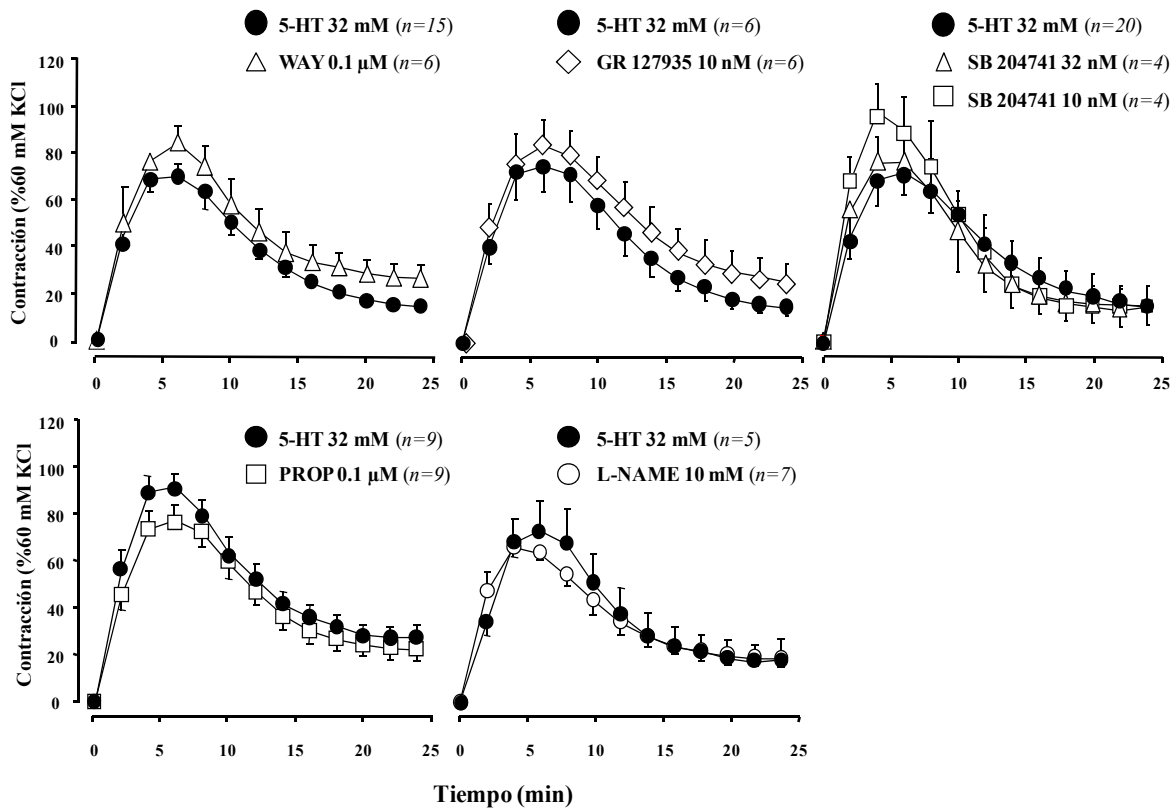
**Figura 9.** Efecto de tropisetron (TR) y metiotepina (MET) en la respuesta bifásica inducida por 5-HT. La combinación de ambos antagonistas bloqueó casi completamente la respuesta a 32  $\mu$ M de 5-HT. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  comparado con el grupo de 5-HT (ANOVA de una vía seguido de prueba de Dunnett). Los símbolos representan el promedio  $\pm$  error estándar.

Por el contrario, la incubación con 10 nM de ketanserina (n=6), un antagonista selectivo de los receptores 5-HT<sub>2A</sub>, evitó significativamente la fase de relajación de la respuesta a 5-HT (*Figura 10*).



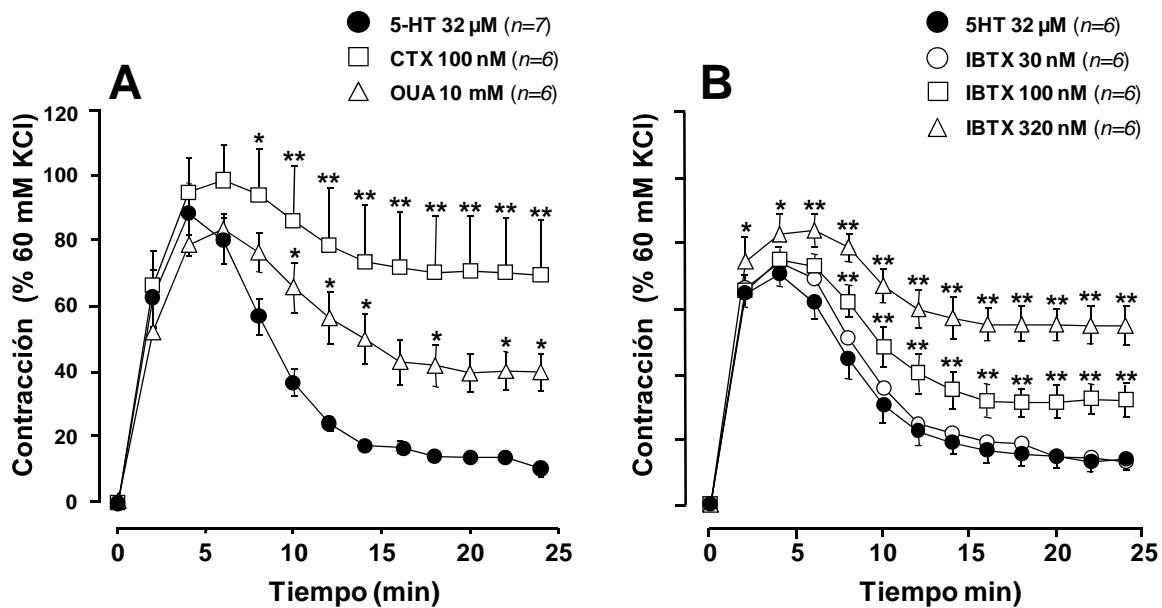
**Figura 10.** Decremento de la respuesta de relajación inducida por 5-HT por el antagonista 5-HT<sub>2A</sub> ketanserina (KT) en anillos traqueales de cobayo. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  (prueba *t* de Student pareada). Los símbolos representan el promedio  $\pm$  error estándar.

La *Figura 11* muestra diversos antagonistas de los receptores 5-HT que no modificaron la respuesta bifásica a la 5-HT. Tal fue el caso del WAY-100135 (antagonista 5-HT<sub>1</sub>, n=6), GR 127935 (antagonista 5-HT<sub>1B</sub>/5-HT<sub>1D</sub>, n=6), y SB 204741 (antagonista 5-HT<sub>2B</sub>/5-HT<sub>3</sub>/5-HT<sub>4</sub>, n=4). De igual forma, la respuesta bifásica tampoco fue modificada por el PROP (antagonista  $\beta_2$ -adrenérgico, n=9) o por L-NAME (inhibidor de la sintasa del NO, n=7).



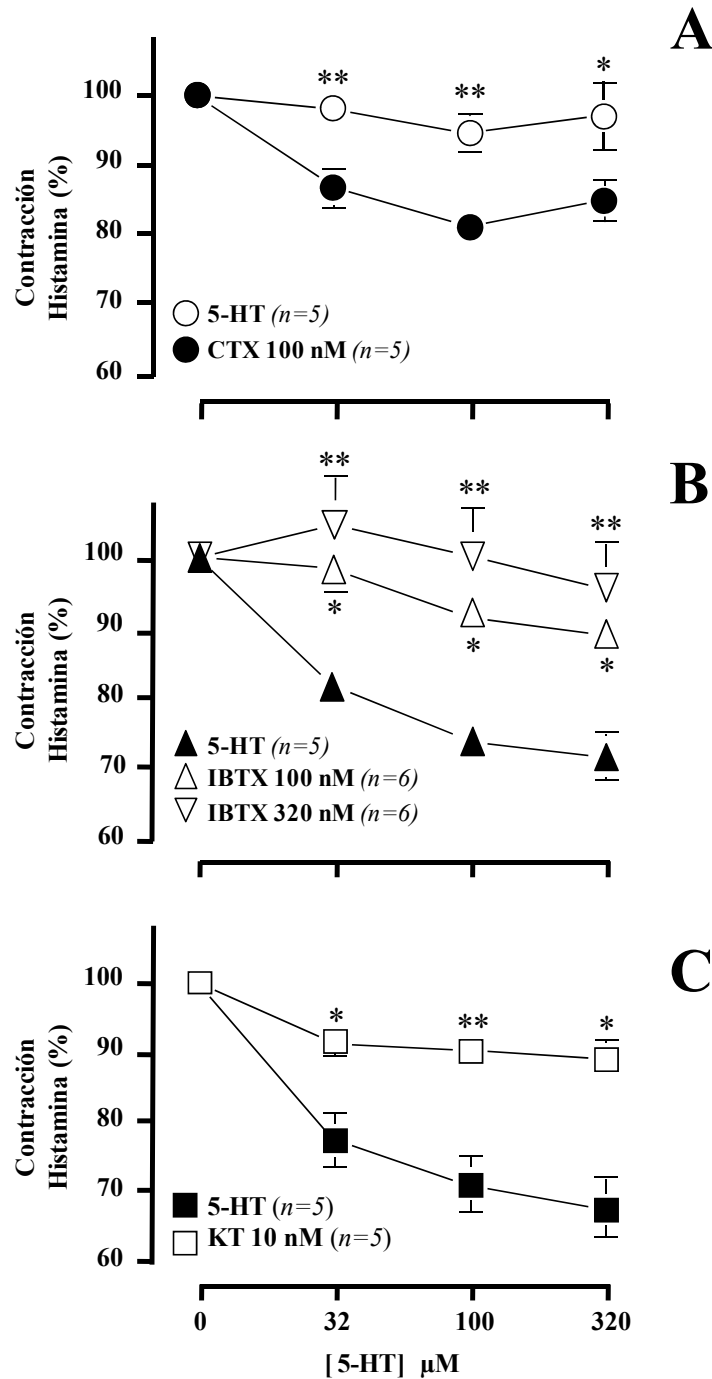
**Figura 11.** Efecto de algunos fármacos en la respuesta bifásica inducida por 5-HT en anillos traqueales de cobayo. Se puede observar que WAY 100135 (antagonista  $5\text{-HT}_{1A}$ , WAY), GR 127935 (antagonista  $5\text{-HT}_{1B/1D}$ , GR), SB 204741 (antagonista  $5\text{-HT}_{2B}$ , SB), así como propranolol (antagonista  $\beta_2$ -adrenérgico, PROP) y L-NAME (inhibidor de la sintasa de NO) no modificaron la respuesta a 5-HT. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  error estándar.

La inhibición de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  por ouabaína (n=6) hizo que la fase de relajación de la respuesta a 5-HT fuera menor (**Figura 12A**). De igual forma, la CTX, un bloqueador de los canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$ , inhibió de manera importante la relajación inducida por 5-HT (**Figura 12A**). Finalmente, cuando se usó IBTX (30, 100 y 320  $\mu\text{M}$ ) para bloquear de forma más específica los canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  de alta conductancia se observó una inhibición de la fase de relajación, la cual alcanzó significancia estadística a las dos concentraciones más altas (**Figura 12B**). Aunque se realizaron algunos experimentos añadiendo de manera simultánea OUA y CTX, éstos fueron no valorables debido a que esta combinación provocó una contracción prolongada e irregular de los anillos traqueales, sin cambios notables de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en experimentos hecho en miocitos aislados (datos no mostrados).



**Figura 12.** Efecto de caribdotoxina (CTX) y ouabaína (OUA) o de diferentes concentraciones de ibertoxina (IBTX) en la fase de relajación inducida por 5-HT en anillos traqueales de cobayo. **A.** El bloqueo de la actividad de los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  por CTX y, en menor grado, el bloqueo de la ATPasa  $Na^+/K^+$  por OUA evitaron de forma significativa la relajación durante la respuesta a 5-HT. **B.** El bloqueo específico de la actividad de los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  de alta conductancia por IBTX causó una disminución de la relajación inducida por 5-HT, mismo que fue dependiente de la concentración. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  comparado con el grupo de 5-HT (ANOVA de una vía [A] y ANOVA para mediciones repetidas [B]). Los símbolos representan el promedio  $\pm$  error estándar.

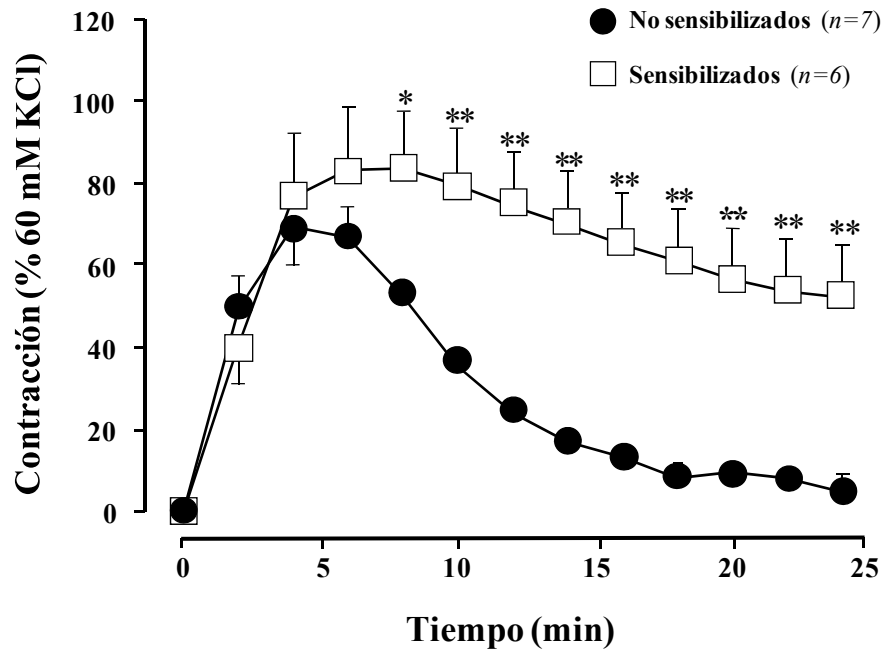
Con base en los experimentos mencionados previamente, decidimos evaluar si la 5-HT tenía un efecto relajador directo, por lo que realizamos curvas concentración-respuesta a la 5-HT en tráqueas precontracturadas con 10  $\mu$ M de histamina ( $n=5$ ). Estos resultados mostraron que todas las concentraciones de 5-HT utilizadas (32, 100 y 320  $\mu$ M) produjeron una relajación de alrededor del 27% (**Figura 13**). Esta relajación fue notablemente disminuida por CTX ( $n=5$ ), IBTX ( $n=6$ ) o KT ( $n=5$ ) (**Figura 13A, B y C**, respectivamente). Con la concentración de 32 mM de 5-HT se produjo una pequeña contracción transitoria de  $21.4 \pm 5.7\%$  precedida de una relajación (datos no mostrados).



**Figura 13.** Curva acumulativa concentración-respuesta en anillos traqueales de cobayo precontracturados con histamina. Efecto de la caribdotoxina (CTX)(A), iberiotoxina (IBTX) (B) y ketanserina (KT) (C) en la relajación que produce la 5-HT sobre la contracción causada por 10  $\mu\text{M}$  de histamina. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  con prueba t de Student (A, C) y ANOVA de una vía (B) seguido de prueba de Dunnett. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  error estándar.

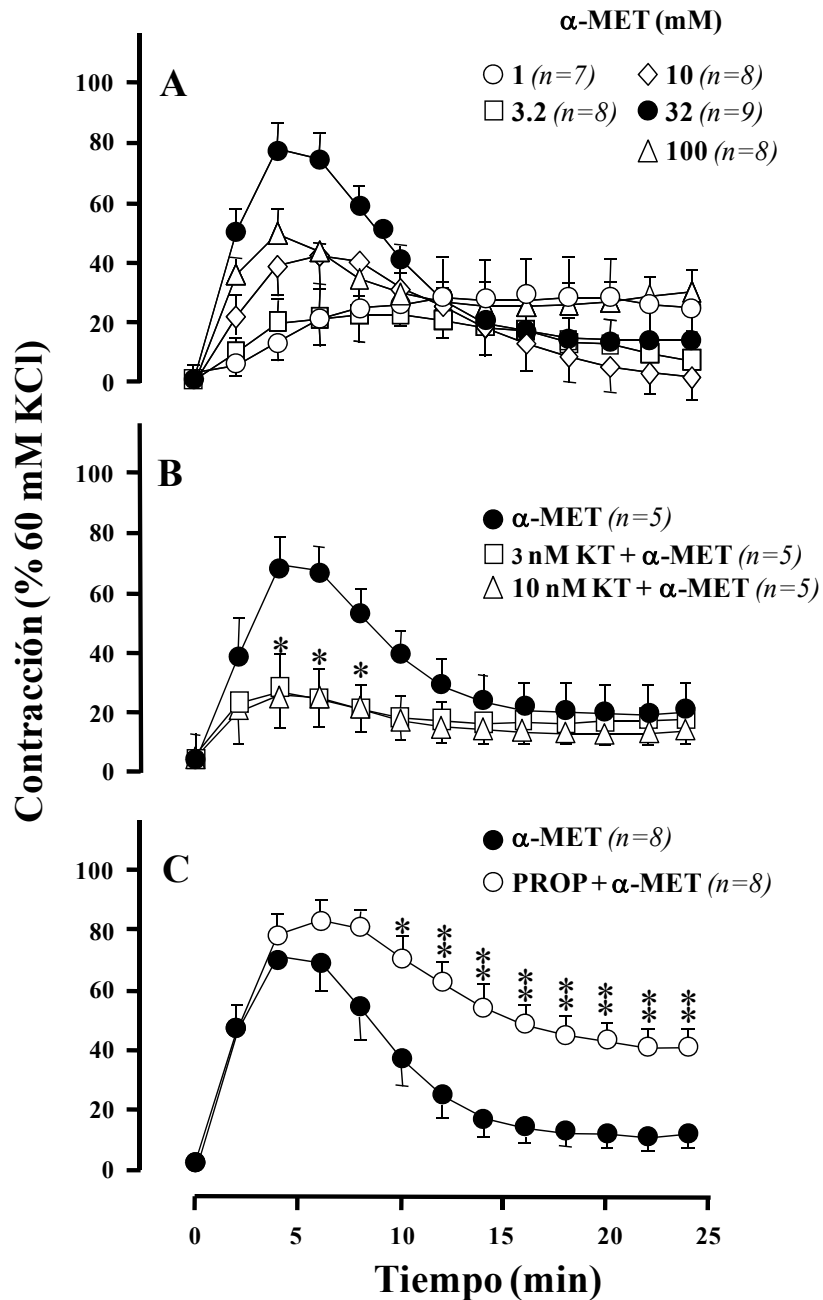


Contrastando con la naturaleza bifásica de la respuesta a 32 mM de 5-HT ( $n=7$ ) de la tráquea control (obtenida de animales no sensibilizados), cuando los tejidos fueron obtenidos de animales sensibilizados a la OA se obtuvo una contracción más sostenida, alcanzando diferencias significativas a partir de los 8 min (\* $p<0.05$  y \*\* $p<0.01$ ,  $n=6$ , *Figura 14*).



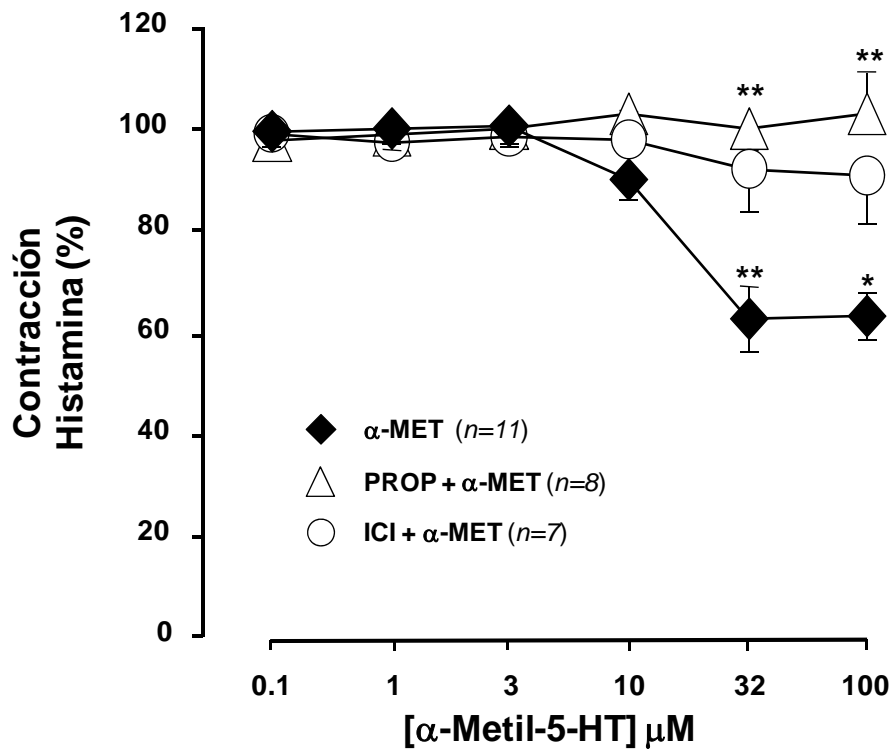
**Figura 14.** Efecto de la sensibilización en la respuesta a 5-HT en anillos traqueales de cobayo. En las tráqueas obtenidas de animales sensibilizados a ovoalbúmina la fase de relajación fue menos evidente, comparada con tejidos controles de animales no sensibilizados. \* $p<0.05$  y \*\* $p<0.01$  con prueba *t* de Student no pareada. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  error estándar.

Debido a su alta afinidad por los receptores 5-HT<sub>2</sub>, la  $\alpha$ -MET es utilizada para caracterizar estos receptores. Del mismo modo descrito previamente para la 5-HT, las concentraciones no acumulativas de  $\alpha$ -MET también indujeron una respuesta bifásica (contracción seguido de una relajación) en los anillos traqueales de cobayo (*Figura 15A*,  $n=7-9$ ). La respuesta bifásica a la concentración de 32  $\mu$ M fue la respuesta más representativa. Por tal motivo, en los experimentos subsiguientes realizados con  $\alpha$ -MET se utilizó esta concentración. Como se observa en la *Figura 15B*, la fase de contracción inducida por  $\alpha$ -MET fue reducida significativamente por KT (3 y 10 nM). A su vez, el PROP (0.1  $\mu$ M) bloqueó de manera importante la fase de relajación (*Figura 15C*).



**Figura 15.** Respuesta de anillos traqueales de cobayo a  $\alpha$ -metil-5-HT ( $\alpha$ -MET) y el efecto de la ketanserina (KT) y el propranolol (PROP). (A) Cada concentración no acumulativa de  $\alpha$ -MET produjo una respuesta bifásica (contracción seguida por relajación). (B) Tanto 3 nM ( $n=5$ ) como 10 nM ( $n=5$ ) de KT redujeron de manera considerable la contracción inducida por 32  $\mu$ M de  $\alpha$ -MET ( $n=5$ ). (C) La preincubación con PROP ( $n=8$ ) bloqueó notablemente la fase de relajación inducida por 32  $\mu$ M de  $\alpha$ -MET ( $n=8$ ). \* $p<0.05$  y \*\* $p<0.01$  con prueba  $t$  de Student (C) o ANOVA seguido de prueba de Dunnett (B), en comparación con sus respectivos grupos controles. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  error estándar.

Al igual que con la 5-HT, también se evaluó si la  $\alpha$ -MET tenía un efecto relajador directo. Para esto, en tráqueas precontracturadas con 10  $\mu$ M de histamina se añadieron concentraciones acumulativas de  $\alpha$ -MET. Se encontró que la  $\alpha$ -MET produjo una relajación que alcanzó su efecto máximo ( $\sim$ 37% de relajación) a una concentración 32  $\mu$ M (**Figura 16**). Esta respuesta de relajación inducida por  $\alpha$ -MET fue bloqueada por 0.1  $\mu$ M de PROP y también por el antagonista  $\beta_2$ -adrenérgico ICI 118,551 (1  $\mu$ M).



**Figura 16.** Efecto relajador de la  $\alpha$ -metil-5-HT ( $\alpha$ -MET) en anillos traqueales de cobayo precontracturados con histamina. En anillos traqueales de cobayo previamente contracturados con 10  $\mu$ M de histamina la  $\alpha$ -MET produjo una relajación dependiente de la concentración. Este efecto fue bloqueado por la preincubación del tejido con 0.1  $\mu$ M de propranolol (PROP, n=8) o 1  $\mu$ M ICI 118,551 (ICI, n=7). Para prevenir la activación de los receptores 5-HT<sub>2A</sub>, todos los tejidos fueron preincubados con 3 nM de ketanserina antes de adicionar la histamina. \* $p$ <0.05 y \*\* $p$ <0.01 en comparación con el grupo control con  $\alpha$ -MET sola (n=11). Los símbolos representan el promedio  $\pm$  error estándar.

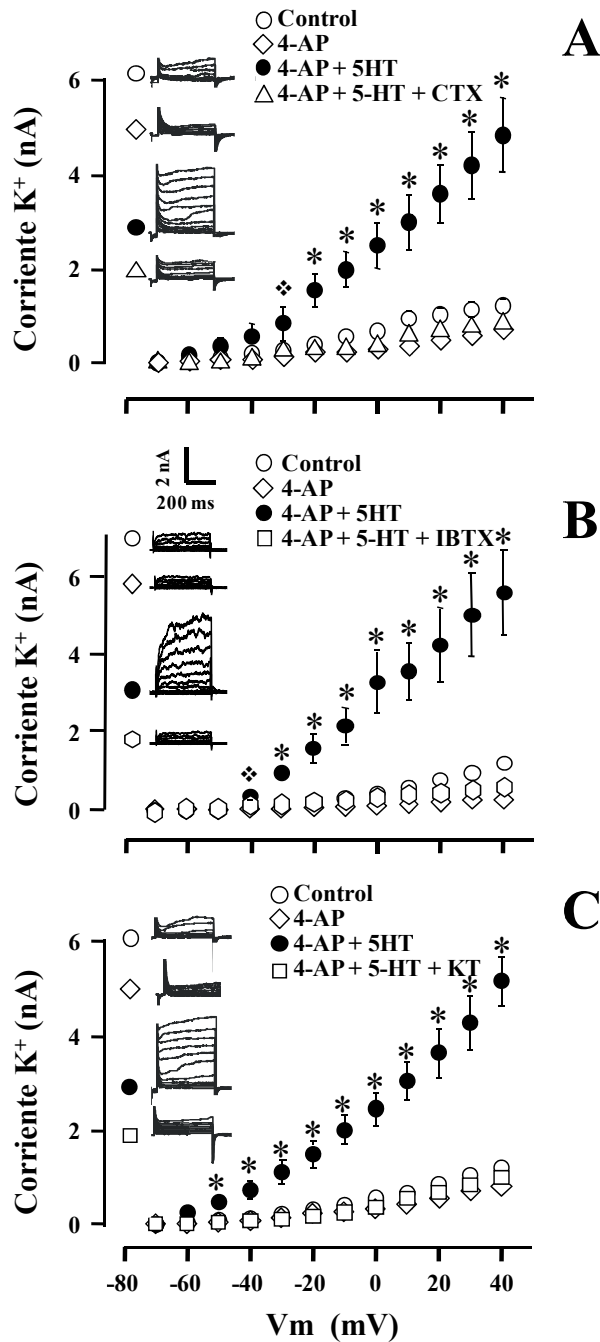
---

**Estudio de corrientes de K<sup>+</sup> en miocitos (*patch clamp*)**

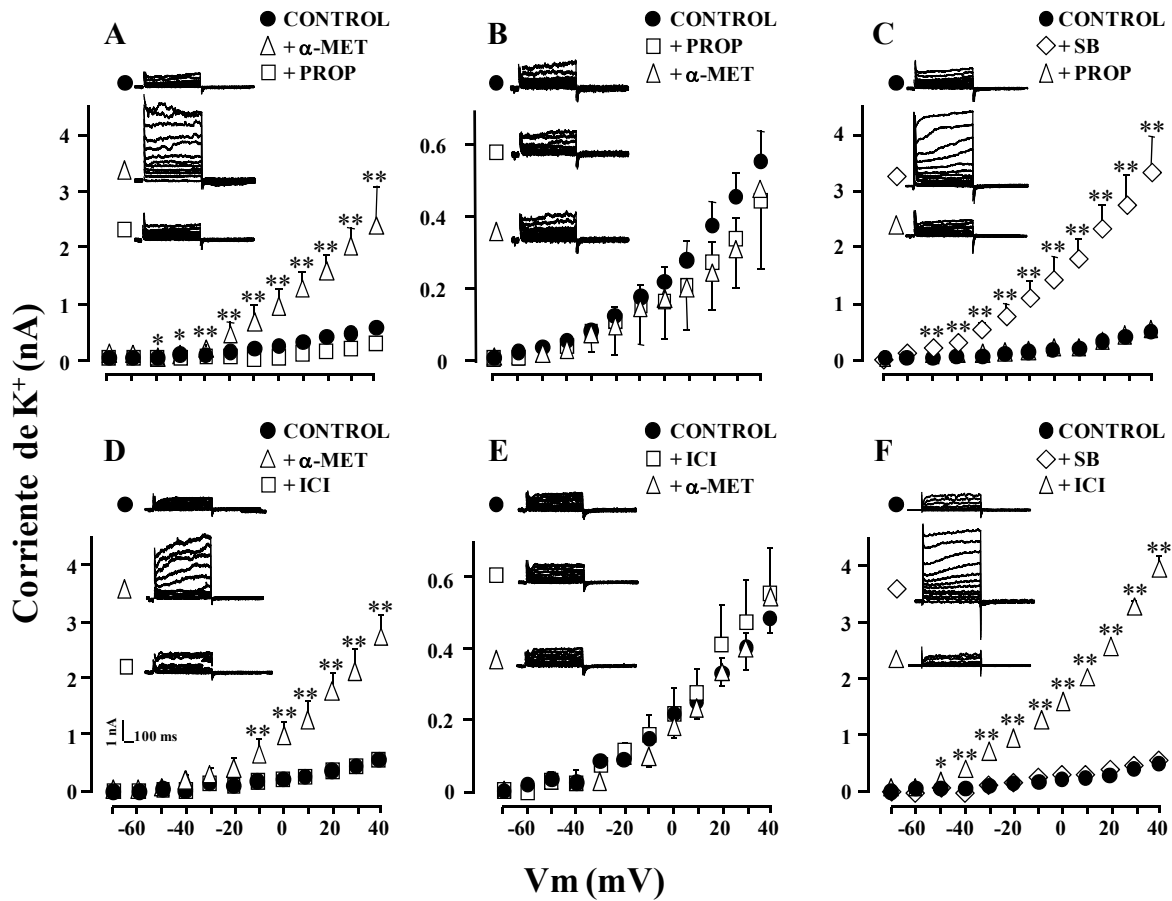
En miocitos aislados de tráquea de cobayo se hicieron experimentos electrofisiológicos de fijación de voltaje, en los cuales se activaron corrientes salientes de K<sup>+</sup> (I<sub>K+</sub>) mediante una serie de pulsos despolarizantes de -70 a +40 mV, con un potencial mantenido a -60 mV (**Figura 17**, grupo control). Con la finalidad de eliminar la actividad de los canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje (rectificador tardío), todos los grupos experimentales recibieron 3 mM de 4 aminopiridina (4-AP), la cual *per se* puede causar una reducción significativa de las corrientes de K<sup>+</sup> control (no se muestra el análisis estadístico). La adición de 32 μM de 5-HT en presencia de 4-AP incrementó notablemente las corrientes de K<sup>+</sup>, y este incremento fue bloqueado con 100 nM de CTX (un bloqueador de los canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup>) o por 100 nM de IBTX (un bloqueador selectivo de los canales de BK<sub>Ca</sub>), corroborando así que dichas corrientes correspondían a las I<sub>K(Ca)</sub> (**Figura 17A, B**). En otro grupo de experimentos usando el mismo protocolo encontramos que 10 nM de KT abolió totalmente el incremento de las I<sub>K(Ca)</sub> inducido por 5-HT (**Figura 17C**).

Cuando se evaluó la actividad de 32 μM de α-MET se encontró que, al igual que la 5-HT, este compuesto también incrementó las I<sub>K+</sub> (p<0.01) (**Figura 18A**). Con el voltaje más alto utilizado (+40 mV) este incremento alcanzó ~4.4 veces más la respuesta basal. El incremento de las I<sub>K+</sub> inducidas por α-MET fue completamente revertido con la adición subsecuente de 0.1 μM de PROP ó 1 μM de ICI 118,551 (**Figura 18A y 18D**, respectivamente). Cuando el PROP o el ICI 118,551 fueron incubados *antes* de la administración de la α-MET, ambos compuestos evitaron completamente el efecto de la α-MET (**Figura 18B y 18E**, respectivamente). El salbutamol (SB, agonista adrenérgico β<sub>2</sub>, 1 μM) mimetizó totalmente las respuestas de la α-MET sobre las I<sub>K+</sub>, incluyendo el efecto inhibitorio que sobre estas respuestas tuvieron el PROP y el ICI 118,551 (**Figura 18C y 18F**, respectivamente).

---



**Figura 17.** Efecto de la 5-HT en las corrientes de  $I_{K(Ca)}$  en las células del músculo liso de las vías aéreas de cobayo. Las corrientes de  $K^+$  fueron producidas por la despolarización progresiva desde  $-70$  hasta  $+40$  mV (grupo control). La adición de 3 mM de 4 aminopiridina (4-AP, un bloqueador del canal rectificador tardío de  $K^+$ ) redujo las corrientes de  $K^+$ . La adición de 32  $\mu$ M de 5-HT, en presencia de 4-AP, incrementó las  $I_{K(Ca)}$ , y este aumento fue bloqueado por 100 nM de caribdotoxina (CTX, **A**), 100nM de iberiotoxina (IBTX, **B**) ó 10 nM de ketanserina (KT, **C**). Los insertos corresponden a ejemplos de registros originales después de cada tratamiento \*  $p < 0.05$  y \*  $p < 0.01$  con prueba de ANOVA para mediciones repetidas seguida de prueba de Dunnett. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  error estándar.



**Figura 18.** Efecto de  $\alpha$ -metil-5-HT ( $\alpha$ -MET, 32  $\mu$ M) sobre las corrientes de  $K^+$  de las células del músculo liso de las vías aéreas de cobayo. Los pulsos despolarizantes (incrementos de 10 mV, de -70 a +40 mV, durante 500 ms) de un potencial mantenido a -60 mV. En las figuras están incluidos ejemplos de los registros de patch clamp originales. (A) La perfusión con  $\alpha$ -MET indujo un incremento significativo de las corrientes de  $K^+$ . Este efecto fue bloqueado con la adición de 0.1  $\mu$ M de propranolol (PROP). (B) El PROP por sí solo no modificó la relación corriente-voltaje, pero en estas condiciones una exposición subsecuente a  $\alpha$ -MET no indujo cambios en las corrientes de  $K^+$ . (C) 1  $\mu$ M de salbutamol (SB) induce un incremento significativo de las corrientes de  $K^+$  similar al observado con  $\alpha$ -MET. Este efecto del SB provocó con 0.1  $\mu$ M de PROP (D, E, F). Un antagonista específico de los receptores adrenérgicos  $\beta_2$ , el ICI 118,551 (ICI, 1  $\mu$ M) reprodujo los efectos del PROP. Cada curva representa el promedio  $\pm$  error estándar de 4-6 experimentos. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

---

---

## Estudio de registro de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular en miocitos

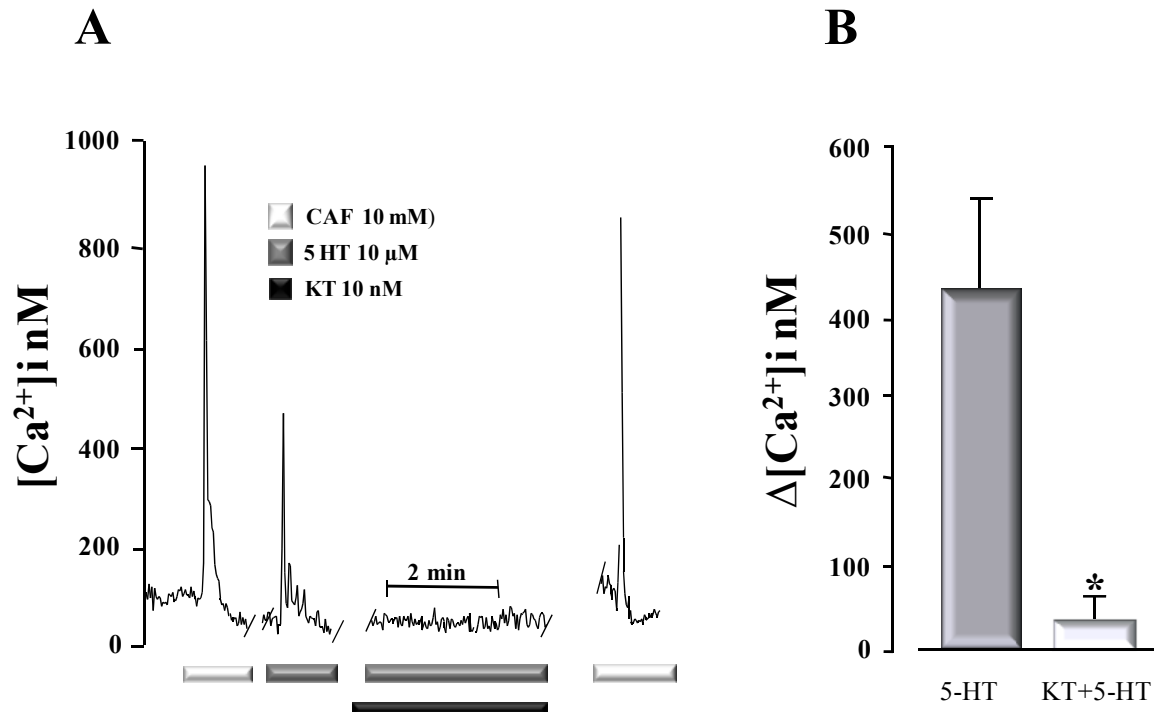
En los experimentos realizados con esta metodología se encontró que la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  basal en los miocitos de tráquea de cobayo fue de  $83 \pm 18$  nM. Para corroborar la viabilidad de la célula, se administró 10 mM de cafeína durante 3 min, lo que produjo una respuesta transitoria de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que habitualmente fue alrededor de 950 nM. Al final de los experimentos, se dio una segunda estimulación con cafeína para evaluar si las células se mantuvieron en condiciones adecuadas hasta el final del estudio.

Inicialmente se evaluó el efecto de la 5-HT (n=5, **Figura 19**). La respuesta a 10  $\mu\text{M}$  de 5-HT consistió en un aumento transitorio de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de hasta  $428 \pm 142$  nM. Esta respuesta fue notablemente disminuida por 10 nM de KT.

Del mismo modo, al evaluar el efecto de 100  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -MET (n=5, **Figura 20**) encontramos que este compuesto produjo un incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de  $405 \pm 109$  nM, el cual fue casi abolido por 10 nM de KT.

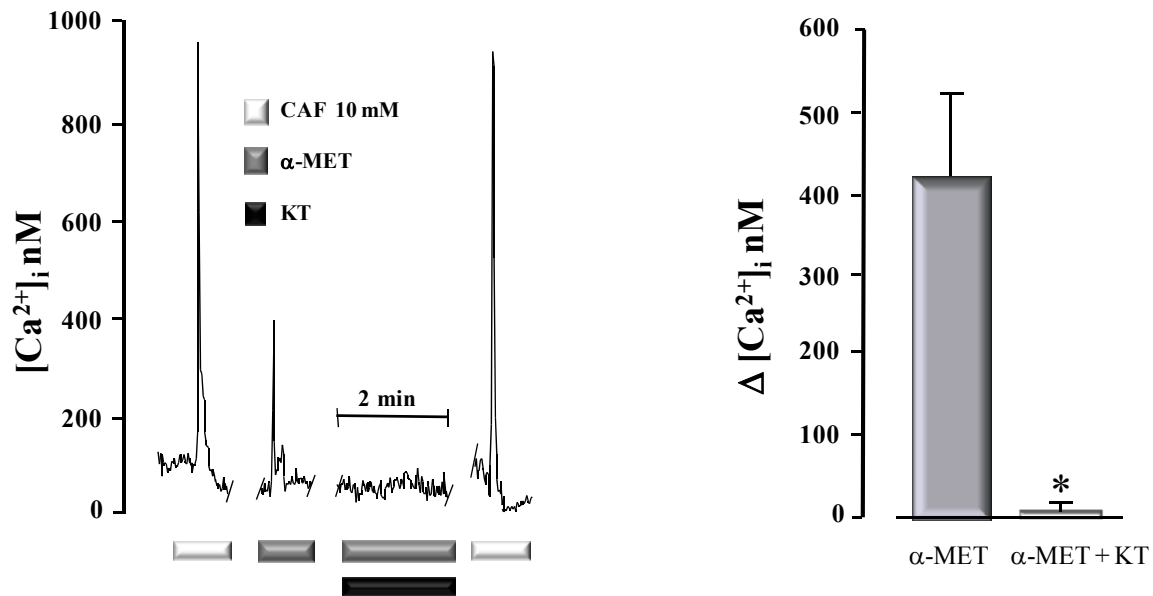
Por otro lado, se encontró que si se administran tres estímulos secuenciales con 100  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -MET la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  disminuye gradualmente (**Figura 21**). Paradójicamente, cuando los tejidos son preincubados con 0.1  $\mu\text{M}$  de PROP las respuestas a estos tres estímulos son progresivamente mayores.

---

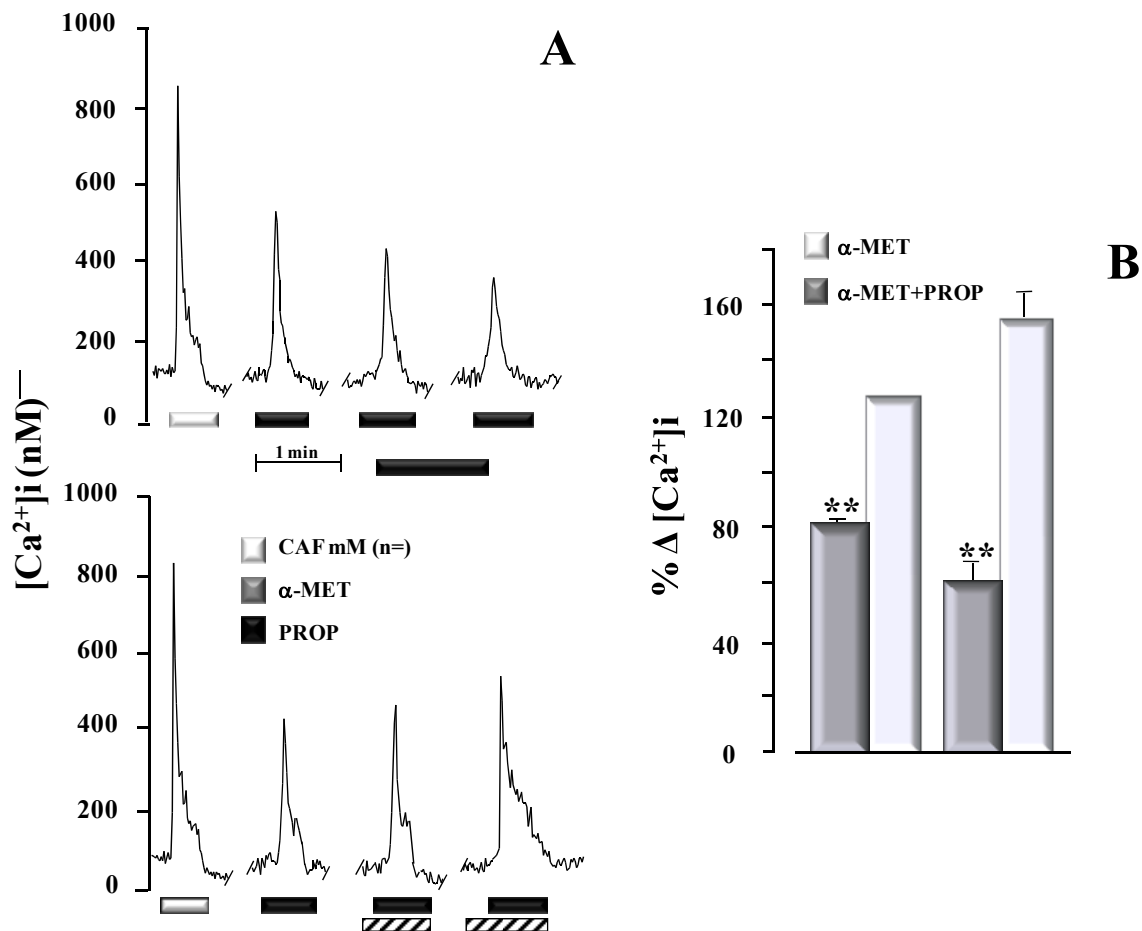


**Figura 19.** Efecto de la 5-HT sobre las  $[Ca^{2+}]_i$  en miocito aislado de tráquea de cobayo. Registro típico donde 10  $\mu$ M de 5-HT induce un pico transitorio de  $Ca^{2+}$ , el cual fue disminuido con 10 nM de ketanserina (KT) ( $n=5$ ). Se empleó cafeína (10 mM) para confirmar la viabilidad celular. \* $p < 0.01$  (prueba t de Student pareada). Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar.



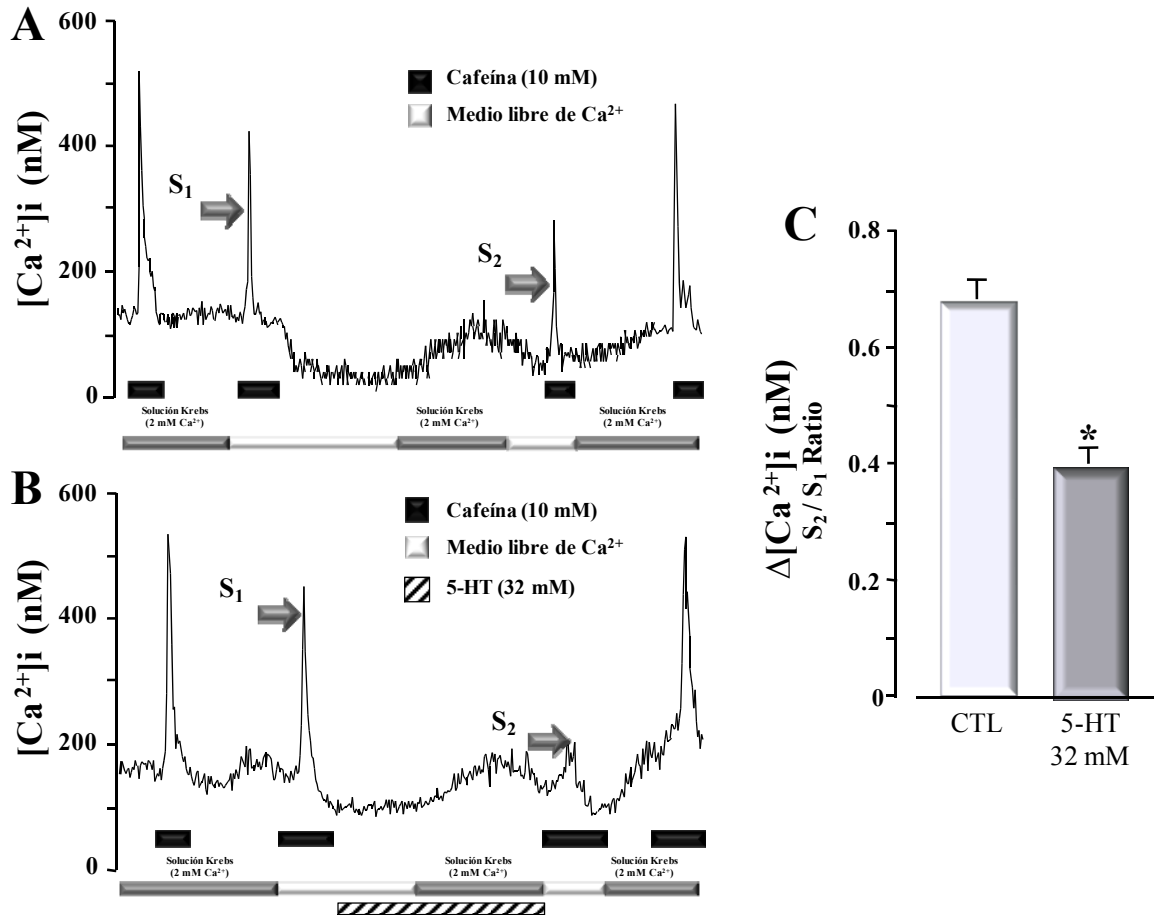


**Figura 20.** Efecto de  $\alpha$ -metil-5-HT ( $\alpha$ -MET) sobre las  $[Ca^{2+}]_i$  en miocito aislado de tráquea de cobayo. El incremento de  $Ca^{2+}$  inducido por  $100 \mu M$  de  $\alpha$ -MET es mediada por la activación de los receptores  $5-HT_{2A}$  como se muestra en el hecho que este efecto es inhibido por  $10 nM$  de ketanserina (KT). Se empleó cafeína ( $10 mM$ ) para confirmar la viabilidad celular. \* $p < 0.01$  (prueba t de Student pareada). Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar.



**Figura 21.** Efecto del propranolol (PROP) en el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por  $\alpha$ -metil-5-HT ( $\alpha$ -MET) en miocito aislado de tráquea de cobayo. (A) Sección superior: Tres estimulaciones consecutivas con  $100 \mu M$  de  $\alpha$ -MET provocan respuestas de  $Ca^{2+}$  cada vez menores ( $n=5$ ). Sección inferior: La incubación con PROP ( $0.1 \mu M$ ) incrementa la respuesta secuencial inducida por  $\alpha$ -MET ( $n=4$ ). (B) Respuesta del segundo y el tercero estímulo de  $\alpha$ -MET, como porcentaje de la primera. \*\* $p < 0.01$  (prueba  $t$  de Student no pareada), comparado con su respectivo grupo  $\alpha$ -MET+PROP. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar.

La actividad de la SERCA fue evaluada de manera indirecta a través del rellenado de  $Ca^{2+}$  del RS. En estos experimentos, los miocitos control mostraron una relación  $S_2/S_1$  de  $0.68 \pm 0.03$  ( $n=6$ ), y esta relación fue significativamente reducida por  $32 \mu M$  de 5-HT ( $0.40 \pm 0.04$ ,  $n=5$ ,  $p < 0.01$ ) (**Figura 22**).



**Figura 22.** Efecto de la 5-HT en el rellenado de Ca<sup>2+</sup> del RS en el miocito aislado de tráquea de cobayo. (A) Registro típico del protocolo experimental para evaluar el rellenado de Ca<sup>2+</sup> del RS, donde S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub> son la primera y segunda estimulación con cafeína (10 mM), respectivamente, y (B) el efecto de 32 μM de 5-HT. (C) Análisis estadístico demostrando que la 5-HT (n=5) reduce el rellenado de Ca<sup>2+</sup> del RS (expresado como la relación S<sub>2</sub>/S<sub>1</sub>), en comparación con el grupo control (CTL, n=6). \*p<0.01 (prueba t de Student no pareada). Las barras representan el promedio ± error estándar.

---

---

## DISCUSIÓN

El efecto de contracción producido por la 5-HT en el MLVA de diversas especies de animales, incluyendo el MLVA del ser humano, ha sido ampliamente descrito [164, 166, 180, 182, 188, 201]. Se ha encontrado que al menos en el bronquio de humano y de cobayo la contracción inducida por 5-HT es seguida por una fase de relajación, por lo que a este tipo de respuesta se le denominó respuesta bifásica [169, 188]. Baumgartner y col. [169] establecieron que esta respuesta bifásica solo se presentó al utilizar concentraciones altas de 5-HT ( $\geq 10 \mu\text{M}$ ). Contrario a estos hallazgos, nuestros resultados señalan que la respuesta bifásica (contracción-relajación) se presenta en todas las concentraciones utilizadas de 5-HT (de 1 a  $320 \mu\text{M}$ ). Más importante aún, la capacidad de relajación inducida por 5-HT se corroboró con los anillos traqueales precontracturados con histamina. El mecanismo por el cual la 5-HT causa relajación no se conoce bien.

En el presente trabajo empleamos diferentes antagonistas de receptores de 5-HT con el propósito de identificar farmacológicamente los mecanismos potenciales implicados en la respuesta de las vías aéreas de cobayo a 5-HT, especialmente aquellos receptores postulados en la relajación. Encontramos que la combinación de los agonistas TR y MET bloqueó casi por completo la respuesta bifásica a 5-HT, demostrando que la respuesta fue dependiente de la activación de receptores de 5-HT.

La fase de contracción ha recibido mucha atención y se ha sugerido que está mediada, al menos en parte, por la activación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> en el MLVA, además de ser promovida también por la activación de los receptores presinápticos 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>7</sub>, facilitando la liberación de ACh [157]. El hecho de que en nuestros experimentos la KT haya abolido completamente el pico transitorio de Ca<sup>2+</sup> inducido por 5-HT, pero que en anillos traqueales no haya disminuido la contracción, sugiere que otros mecanismos adicionales a la activación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> podrían tener mayor relevancia para generar la contracción. Algunos de estos mecanismos podrían ser el decremento del cAMP por la activación de los receptores 5-HT<sub>1</sub>, la liberación secundaria de neurotransmisores o el bloqueo de los mecanismos de relajación.

---

A diferencia de los mecanismos de contracción, los mecanismos involucrados en la fase de la relajación han sido escasamente investigados. Baumgartner y col. [169] fueron los primeros en postular que la relajación producida por 5-HT era mediada por la activación de los receptores 5-HT<sub>2</sub>. En nuestro estudio nosotros corroboramos que la KT reduce de manera notable esta relajación, confirmando la participación de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> en esta fase de relajación.

### **Participación de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>**

Es muy conocido que un incremento en la actividad de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> induce la hiperpolarización de la membrana y favorece la relajación [97]. En el músculo liso vascular se ha demostrado que la 5-HT induce la activación de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> causando un decremento en el tono vascular [94, 95]. Rhoden y col. [91] demostraron que la 5-HT estimula la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> en células de músculo liso de las vías aéreas de cobayos a través de la activación del receptor 5-HT<sub>2A</sub>, y postularon que en ciertas circunstancias puede facilitar la relajación. Nuestros resultados muestran que la OUA (inhibidor de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>) redujo la fase de relajación, sugiriendo que la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> tiene una participación en la relajación inducida por 5-HT. Con base en el estudio de Rhoden y col. [91], y en congruencia con el hecho de que la KT disminuyó la relajación, la activación de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> en nuestras condiciones experimentales pudo haber sido mediada por el receptor 5-HT<sub>2A</sub>.

Los mecanismos por los cuales la estimulación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> estimula la actividad de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> no están descritos, pero se podría especular lo siguiente. Se sabe que la actividad de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> puede ser modulada mediante su fosforilación por distintas cinasas como la PKA, PKC y la cinasa de tirosina [202-204]. En este sentido, la PKC fosforila a diferentes tipos de residuos de serina en la subunidad catalítica  $\alpha$  de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> y, dependiendo del tipo celular, el resultado final será la activación o la inhibición [205]. Debido a que uno de los segundos mensajeros producidos por la estimulación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> es el DAG, la activación subsecuente de PKC por este último podría modificar la actividad de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>.

---

## Participación de los canales $BK_{Ca}$

El MLVA posee un alta densidad de diferentes tipos de canales de  $K^+$  que regulan el potencial de membrana y la excitabilidad, además de inducir la hiperpolarización y la relajación [102, 206-210]. Los principales canales de  $K^+$  en este tejido son: a) los canales de  $K^+$  rectificadores tardíos dependientes de voltaje ( $K_v$ ) [211], los cuales son bloqueados por 4-AP; b) los canales de  $K^+$  rectificadores entrantes ( $K_{ir}$ ), regulados por voltaje [212], los cuales son bloqueados por  $Ba^{2+}$ , y c) los canales de  $K^+$  de alta conductancia activados por  $Ca^{2+}$  ( $KCa$ , Maxi K ó  $BK_{Ca}$ ) [102], los cuales son bloqueados por CTX, IBTX y TEA.

En el presente trabajo encontramos que los canales  $BK_{Ca}$  parecen participar de forma importante en la relajación inducida por 5-HT. Esta conclusión se basa en dos tipos de evidencias experimentales:

- I. La CTX y la IBTX bloquearon casi por completo la respuesta de relajación inducida por 5-HT en anillos traqueales, tanto en la respuesta bifásica a una concentración única de 5-HT como en la curva concentración-respuesta a 5-HT en tejidos precontracturados.
- II. Con la técnica de *patch clamp* en miocitos aislados la 5-HT incrementó las  $I_{KCa}$ . El hecho de que los miocitos estaban siendo perfundidos con 4-AP (bloqueador de los canales  $K_v$ ), sugirió que el incremento de las  $I_{KCa}$  era debido a los canales  $BK_{Ca}$ , lo cual se comprobó cuando este aumento fue bloqueado por CTX y IBTX.

Los canales  $BK_{Ca}$  requieren un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  para ser activados [213], y en nuestras condiciones experimentales corroboramos que la 5-HT induce un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  vía receptores  $5-HT_{2A}$ . Esto, coincide con nuestro postulado de que los  $BK_{Ca}$  tienen una participación en la relajación inducida por 5-HT, la KT bloqueó completamente el incremento de las  $I_{KCa}$  inducido por 5-HT. Sin embargo, si cualquier incremento global de  $Ca^{2+}$  citosólico activara a los  $BK_{Ca}$  sería esperable que prácticamente todos los agonistas constrictores tuvieran este efecto, lo que resultaría paradójico, ya que estarían promoviendo simultáneamente la contracción ( $Ca^{2+}$  citosólico) y la relajación ( $BK_{Ca}$ ). Una posibilidad para resolver esta contradicción podría basarse en que en el miocito existen sitios puntuales donde pueden ocurrir modificaciones locales de la  $[Ca^{2+}]_i$  [215]. Uno de tales sitios

---

puntuales es la región subplasmalémica, donde el RS entra en relación estrecha con la membrana plasmática, y donde puede haber aumentos localizados de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducidos por la apertura de los receptores a rianodina (RyR). Esta apertura de los canales RyR parece ser lo causante de la apertura de los canales  $BK_{Ca}$  [216]. Por lo tanto, si bien todos los agonistas constrictores del MLVA producen incrementos globales de  $[Ca^{2+}]_i$  que originan contracción, podría ser que la 5-HT tuviera la facultad adicional de estimular la elevación subplasmalémica de la  $[Ca^{2+}]_i$ , promoviendo así la apertura de canales  $BK_{Ca}$  y con ello la hiperpolarización de la membrana, el cierre de otros canales de  $Ca^{2+}$  y la reducción del influjo de  $Ca^{2+}$  lo cual llevaría a la relajación del músculo liso [77, 105].

Hasta donde sabemos, la participación de los canales  $BK_{Ca}$  en la relajación inducida por 5-HT no había sido descrita anteriormente, así como tampoco su activación mediada principalmente por los receptores 5-HT<sub>2A</sub>. Queda aún por esclarecer el papel potencial de otros canales de  $K^+$  diferentes a los  $BK_{Ca}$ .

### **Participación de la SERCA**

En el presente estudio también evaluamos si cambios en la actividad de la SERCA pudieran estar participando en la relajación del MLVA. Se sabe que una disminución de  $[Ca^{2+}]_i$  debido al incremento de la actividad de la SERCA puede constituir un mecanismo que induce relajación. Por ejemplo, los fármacos broncodilatadores que incrementan la concentración de cAMP aumentan la actividad de esta bomba a través de la inhibición del fosfolambán. En su estado no fosforilado el fosfolambán se encuentra inhibiendo a la SERCA, pero una vez que es fosforilado se acaba su efecto inhibitorio. Esta fosforilación puede ser ocasionada por la PKA dependiente de cAMP o por la proteína cinasa dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (CaM-KII) [214]. Sin embargo, contrario a nuestra hipótesis, encontramos que la 5-HT en vez de aumentar la actividad de la SERCA la disminuye, lo cual teóricamente debería favorecer la contracción del MLVA en lugar de la relajación.

---

## Exploración de otros mecanismos

Ben-Harari y col. [183, 215] por experimentos que realizaron en tráqueas aisladas de cobayo, concluyeron que un fenómeno de desensibilización de los receptores 5-HT<sub>2</sub> era el responsable de la disminución de la contracción inducida por 5-HT. Sin embargo, nuestros resultados muestran que la OUA, la CTX y la IBTX disminuyen de manera efectiva o anulan la respuesta de relajación. Estos hallazgos señalan que la relajación inducida por 5-HT es un fenómeno activo y no simplemente una terminación del efecto contráctil, por lo que la desensibilización, si es que ocurre, sólo está participando de manera parcial en la relajación.

D'Agostino y col. [216] han propuesto que la activación del receptor 5-HT<sub>1</sub> es un mecanismo involucrado en la relajación inducida por 5-HT en la tráquea de cobayo. Sin embargo, en nuestro estudio encontramos que el WAY-100135 y el GR 127935, dos antagonistas específicos para los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub>/5-HT<sub>1D</sub>, respectivamente, no modificaron la respuesta producida por 5-HT, por lo que consideramos que, al menos en nuestras condiciones experimentales, los receptores 5-HT<sub>1A</sub> no participan en la relajación. En algunos experimentos preliminares (datos no mostrados) encontramos que una concentración relativamente alta de WAY-100135 (10 µM) inhibió parcialmente la fase de relajación de la respuesta a 5-HT. Sin embargo, a esta concentración el WAY-100135 también redujo significativamente el pico intracelular de Ca<sup>2+</sup> inducido por 5-HT en células aisladas de MLVA de cobayo (una respuesta exclusivamente mediada por receptores 5-HT<sub>2A</sub>), por lo que su efecto sobre la relajación podría ser una acción inespecífica.

Otros dos mecanismos potenciales de relajación, la activación de los receptores β<sub>2</sub>-adrenérgicos y la producción de NO también fueron evaluados en este estudio. Ambos mecanismos fueron descartados debido a que PROP y L-NAME no modificaron la respuesta bifásica inducida por 5-HT. La ausencia de efecto del PROP sobre la relajación inducida por 5-HT contrasta notablemente con otros experimentos, en los que se usó α-MET, un agonista con alta afinidad al receptor 5-HT<sub>2</sub> [189]. Como en el caso de la 5-HT, el α-MET también produjo una respuesta bifásica en el MLVA del cobayo, pero con este último agonista la fase de relajación fue bloqueada de forma importante por PROP, evidenciando que los receptores β<sub>2</sub>-adrenérgicos estaban involucrados en dicha relajación.



Estos resultados sorprendentes con  $\alpha$ -MET motivaron que se hicieran experimentos adicionales con *patch-clamp* y registro de  $[Ca^{2+}]_i$  en miocitos para tratar de dilucidar con más detalle la participación del receptor  $\beta_2$  adrenérgico en la relajación.

### Respuestas a $\alpha$ -MET

Como mencionamos previamente, el  $\alpha$ -MET es un compuesto sintético considerado como un agonista ampliamente utilizado para caracterizar a la respuesta del receptor 5-HT<sub>2</sub> en diferentes tejidos, incluyendo el MLVA [163, 173, 197]. Sin embargo, han aparecido algunos reportes que sugieren que  $\alpha$ -MET puede ejercer también algunos otros efectos, tales como ser agonista de los receptores 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>7</sub> [143, 217].

En el presente trabajo corroboramos que el principal receptor activado por  $\alpha$ -MET, al menos para la contracción, fue el receptor 5-HT<sub>2A</sub>, el cual fue notablemente inhibido por KT y la respuesta de la  $[Ca^{2+}]_i$  fue anulada por éste último fármaco en miocitos aislados.

No obstante, en el presente estudio nosotros encontramos evidencias indirectas de que  $\alpha$ -MET también estimula receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos en el MLVA de cobayo, tal como se describe a continuación.

- a. La fase de relajación de la respuesta a  $\alpha$ -MET fue bloqueada tanto por un antagonista  $\beta$ -adrenérgico no selectivo (PROP) como por un antagonista  $\beta_2$  adrenérgico selectivo (ICI-118,551).
  - b. En anillos traqueales precontracturados con histamina la  $\alpha$ -MET produjo una relajación dependiente de la concentración, y este efecto relajante fue ampliamente disminuido por PROP e ICI-118,551. Aunque el efecto de relajación de  $\alpha$ -MET fue observado durante una contracción producida por carbacol (datos sin mostrar), el efecto de los antagonistas  $\beta$ -adrenérgico no fue explorado.
  - c. El  $\alpha$ -MET produjo un incremento en las  $I_{K+}$  en los miocitos aislados, y estas corrientes fueron notablemente bloqueadas por PROP e ICI 118,551. Este efecto de  $\alpha$ -MET fue mimetizado por SB, un efecto que fue bloqueado por PROP e ICI 118,551. Estos últimos hallazgos concuerdan con reportes previos
-

que describen que la activación de los receptores adrenérgicos  $\beta_2$  incrementan la probabilidad de apertura de los canales de  $K^+$ , lo que produce una hiperpolarización y por consiguiente una relajación del músculo liso [77, 218, 219].

Un resultado interesante que parece confirmar el concepto de que el  $\alpha$ -MET estimula los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos es el hecho de que el PROP incrementó notablemente las  $[Ca^{2+}]_i$  inducidas por ese agonista. Esto sugiere que la activación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> por el  $\alpha$ -MET es simultánea con la activación del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico, de forma tal que el incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por la estimulación del primero está siendo contrarrestada parcialmente por la estimulación del segundo. Tal como se describió ampliamente en la Introducción, el mecanismo de señalización intracelular del receptor 5-HT<sub>2A</sub> involucra la generación de IP<sub>3</sub>, que al actuar con su receptor (IP<sub>3</sub>R) situado en el RS provoca la salida de  $Ca^{2+}$  de estos almacenes [146, 151]. Por su parte, el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico estimula la producción de cAMP, lo que favorece la activación de la PKA y una de las acciones de esta última es fosforilar e inactivar al IP<sub>3</sub>R [68], con lo cual tendría un efecto opuesto al desencadenado por el receptor 5-HT<sub>2A</sub>.

### **Efecto de la sensibilización a ovoalbúmina sobre la relajación inducida por 5-HT**

A largo de esta tesis hemos enfatizado la importancia de la participación de la 5-HT en las vías aéreas. Hemos comentado que la 5-HT podría estar involucrada de manera importante en la patogénesis del asma crónica y/o en sus exacerbaciones agudas.

En modelos animales se determinó que una dosis única de KT, un antagonista específico 5-HT<sub>2A</sub>, era capaz de disminuir la hiperreactividad de las vías aéreas producida por otros tipos de retos, como el estímulo colinérgico con metacolina y el estímulo con adenosina [220, 221], y también la participación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en el desarrollo de hiperreactividad bronquial [222]. Este subtipo de receptor ha sido de igual forma involucrado como posible responsable del desarrollo de la eosinofilia pulmonar inducida por el reto antigénico en un modelo murino [223].

---

Sin embargo, hasta ahora son desconocidos los mecanismos específicos estimulados por la sensibilización a en el MLVA y que provocan que la fase de contracción inducida por 5-HT sea más sostenida en los animales sensibilizados.

Es importante mencionar que la alergia es un evento complejo caracterizado por un patrón de inflamación que es promovido por la inmunoglobulina E (IgE) y que en gran medida depende de la activación de las células cebadas y otras células inflamatorias como los eosinófilos. La liberación de diversos mediadores por parte de estas células induce inflamación, broncoconstricción aguda, edema bronquial y secreción del moco [224, 225]. La peroxidasa del eosinófilo y otras proteasas modifican la permeabilidad epitelial en el cobayo [226]. En este sentido, la 5-HT favorece la migración y acumulación de células cebadas y eosinófilos en la inflamación alérgica [223, 227].

En algunas especies animales, como la rata, la respuesta aguda al reto antigénico parece depender principalmente de la 5-HT y no de otros mediadores como leucotrienos o histamina [228, 229]. En el ser humano, Lechin y col. [159] han sugerido fuertemente la participación de la 5-HT en la patofisiología del asma, ya que ellos han demostrado que la función pulmonar en niños asmáticos mejora al administrar tianeptina, una droga que disminuye los niveles plasmáticos 5-HT debido a su recaptura. Las concentraciones plasmáticas libres en sujetos asmáticos se incrementan notablemente durante las exacerbaciones asmáticas y dicho incremento está directamente correlacionado a la severidad de la crisis [158].

Yamaguchi y col. [224] encontraron que la respuesta de contracción inducida por estuvo disminuida en tráqueas pretratadas con KT y atropina, proponiendo que esta respuesta era a través de la activación de los receptores 5-HT<sub>2</sub> y la liberación de ACh. Estos autores realizaron experimentos en tráqueas sensibilizadas por ovoalbúmina y contracturadas con 5-HT y ACh, y de acuerdo con sus resultados propusieron que la 5-HT liberada por la estimulación de ovoalbúmina produce la contracción por dos mecanismos. Un mecanismo mediado por una acción directa del agonista a los receptores de 5-HT del músculo liso traqueal y el otro mecanismo por la activación de los receptores 5-HT en las terminaciones nerviosas parasimpáticas.

En otro estudio, realizado con ratas sensibilizadas con y estimuladas con adenosina, proponen que el efecto broncoconstrictor de la adenosina puede ser regulado por

---

mecanismos indirectos a través de la participación de mediadores broncoconstrictores liberados por otros tipos celulares. De esta forma se propone que la activación de las células cebadas puede ocasionar la liberación de la 5-HT [229]. Además de la clásica liberación de mediadores de neoformación y/o preformados, estas células también liberan al espacio extracelular cantidades importantes de ATP [230, 231], que al ser metabolizado por las ectonucleotidasas se transforma en adenosina [232]. La adenosina induce broncoconstricción de forma directa (vía receptores A<sub>1</sub> en músculo liso) o indirecta (vía receptores A<sub>1</sub> y A<sub>2B</sub>) [233]. En este sentido, Cazzola y col. [234] encontraron que la KT disminuía la broncoconstricción inducida por adenosina en sujetos asmáticos. Se ha demostrado que los receptores 5-HT<sub>2</sub> facilitan la liberación de ACh endógena de las terminales parasimpáticas colinérgicas en ratones sensibilizados [235].

En un trabajo realizado recientemente por nuestro grupo se evaluó el papel de la 5-HT en el desarrollo de la hiperreactividad de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica en cobayos sensibilizados a la [156]. En ese estudio se hicieron curvas dosis-respuesta a ACh intravenosa en animales anestesiados, midiendo como respuesta la resistencia pulmonar. Los resultados mostraron que un reto antigénico incrementa notablemente la sensibilidad de las vías aéreas a la ACh (es decir, causó hiperreactividad), y que este efecto era bloqueado por antagonistas de los receptores 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>4</sub> o 5-HT<sub>7</sub>. Experimentos farmacológicos adicionales permitieron sugerir que los receptores 5-HT<sub>4</sub> y 5-HT<sub>7</sub> estaban situados a nivel presináptico y facilitaban la liberación de ACh. Más aún, en homogenados pulmonares se pudo constatar que el proceso de sensibilización alérgica causa un incremento significativo de la concentración de 5-HT [156].

Existen otros trabajos de investigación que describen la participación de diferentes neurotransmisores en la sensibilización por en anillos traqueales de cobayo.

Gentilini y col. [236] demostraron que en anillos traqueales de animales sensibilizados a través de la estimulación de los GABA<sub>B</sub> inhibe las contracciones inducidas por ovoalbúmina.

Otros autores han propuesto que la estimulación antigénica por incrementa la sensibilidad de las de la vía aéreas produciendo la liberación de taquicinas y que tiene efectos directos sobre la excitabilidad de las neuronas del ganglio parasimpático [237]. Por otro lado, es posible que el proceso de sensibilización, *per se* cause una anomalía en la

---

---

conductancia de los canales  $BK_{Ca}$ , que como hemos descrito participa en la relajación del MLVA, y este pueda ser un mecanismo hasta ahora no descrito.

Por lo mencionado previamente, es indiscutible que se necesitan más estudios que exploren la participación de la 5-HT y su posible vinculación con el asma alérgica y la potencialidad terapéutica de los fármacos antagonistas de los receptores 5-HT.

---

---

---

## CONCLUSIONES

1. En el sistema de órganos aislado *in vitro*, la 5-HT induce una respuesta bifásica (concentración y relajación) en el MLVA de cobayo, independiente de la concentración.
  2. La respuesta de relajación del MLVA depende de la activación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> y está mediada por la activación de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>
  3. Los canales BK<sub>Ca</sub> participan también en el mecanismo de la relajación inducido por los receptores 5-HT<sub>2A</sub> en el MLVA de cobayo.
  4. Los receptores β<sub>2</sub> adrenérgicos y el L-NAME no participan en la relajación del MLVA.
  5. La sensibilización a ovoalbúmina (alérgica) interfiere con la fase de relajación inducida por 5-HT.
  6. El α-metil-5-HT, un agonista de alta afinidad al receptor 5-HT<sub>2</sub>, produce una respuesta bifásica en MLVA del cobayo, y en la fase de relajación están involucrados los receptores β<sub>2</sub>-adrenérgicos.
-

---

---

## PERSPECTIVAS EN INVESTIGACIÓN

En este trabajo estudiamos la participación de la 5-HT en los mecanismos de contracción y relajación del músculo liso de las vías aéreas (MLVA) de cobayo. Los resultados revelan indicios que señalan claramente a algunos elementos involucrados en la relajación producida por la 5-HT, pero que a la vez plantean nuevas interrogantes que son un preámbulo para continuar con estudios en esta área de investigación.

En nuestro trabajo evidenciamos que la relajación del MLVA depende del receptor 5-HT<sub>2A</sub> y uno de los mecanismos involucrados es la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. Se ha descrito que la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> también puede funcionar como una transductor de señales, que envía mensajes de la membrana plasmática al interior de los organelos a través de las interacciones proteína-proteína, interacciones que involucran a esta bomba o puede estar modulada por las distintas cinasas como la PKA, PKC y la cinasa de tirosina. De este modo, una vía de investigación sería, por ejemplo, evaluar la posible participación de la PKC, y si ésta fosforila a los residuos de serina en la subunidad catalítica  $\alpha$  de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, activando o inhibiendo a esta bomba.

Por otro lado, confirmamos que en la respuesta de relajación inducida por 5-HT participan los canales de K<sup>+</sup> de tipo BK<sub>Ca</sub>. Esto plantea la interrogante de por qué no todos los agonistas que estimulan la producción de IP<sub>3</sub>, tal como lo hace la 5-HT a través de sus receptores 5-HT<sub>2</sub>, producen esta mayor probabilidad de apertura de los BK<sub>Ca</sub>. ¿Qué mecanismo fisiológico, que no es compartido por otros agonistas, activa la 5-HT para lograr este efecto?

Otro hallazgo interesante fue el efecto que el proceso de sensibilización alérgica tuvo sobre la respuesta bifásica a 5-HT: la relajación se vio profundamente afectada. ¿Es la respuesta inflamatoria alérgica de las vías aéreas la que interfiere con algún mecanismo de relajación? ¿Cuál es el mediador proinflamatorio involucrado? ¿Existirá esta misma relación con otros procesos inflamatorios inducidos por el ozono o el humo del tabaco?

Finalmente, un enfoque que siempre está latente en toda investigación en modelos animales es el evaluar si los resultados alcanzados son también aplicables al ser humano, ya sea en condiciones de salud o de enfermedad. Así, será interesante evaluar el papel de la 5-HT en afecciones respiratorias como el asma e investigar si los mismos mecanismos aquí

---

---

encontrados se desarrollan también en los pacientes asmáticos. De ser así, se abrirían otras líneas de investigación para evaluar el potencial terapéutico de compuestos que favorezcan la activación de los canales  $BK_{Ca}$  o de la  $ATPasa Na^+/K^+$ , con el fin de promover la broncodilatación en el asma.

---



---

---

**REFERENCIAS**

1. West J.B., *Respiratory Physiology. The Essentials*. 2004, Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins.
  2. Reznik G.K., *Comparative anatomy, physiology, and function of the upper respiratory tract*. Environ Health Perspect, 1990. 85: 171-176.
  3. Calogero C., Sly, P.D., *Developmental physiology: lung function during growth and development from birth to old age*. European Respiratory Monograph, 2010. 47: 1-15.
  4. Stephens N.L., *Airway smooth muscle*. Lung, 2001. 179(6): 333-373.
  5. Stephens N.L., *Airway smooth muscle*. Am Rev Respir Dis, 1987. 135(4): 960-975.
  6. Seow C.Y. Pare P.D., *Ultrastructural basis of airway smooth muscle contraction*. Can J Physiol Pharmacol, 2007. 85(7): 659-665.
  7. Belvisi M.G., *Overview of the innervation of the lung*. Curr Opin Pharmacol, 2002. 2(3): 211-215.
  8. Gabella G., *Innervation of airway smooth muscle: fine structure*. Annu Rev Physiol, 1987. 49: 583-594.
  9. Belvisi M.G., Stretton C.D., Verleden G.M., Ledingham S.J., Yacoub M.H. Barnes P.J., *Inhibition of cholinergic neurotransmission in human airways by opioids*. J Appl Physiol, 1992. 72(3): 1096-1100.
  10. Barnes P.J., Baraniuk J.N. Belvisi M.G., *Neuropeptides in the respiratory tract. Part II*. Am Rev Respir Dis, 1991. 144(6): 1391-1399.
  11. Ward J.K., Belvisi M.G., Fox A.J., Miura M., Tadjkarimi S., Yacoub M.H. Barnes P.J., *Modulation of cholinergic neural bronchoconstriction by endogenous nitric oxide and vasoactive intestinal peptide in human airways in vitro*. J Clin Invest, 1993. 92(2): 736-742.
  12. Howarth P.H., Bradding P., Feather I., Wilson S., Church M.K. Holgate S.T., *Mucosal cytokine expression in allergic rhinitis*. Int Arch Allergy Immunol, 1995. 107(1-3): 390-391.
  13. Ollerenshaw S., Jarvis D., Woolcock A., Sullivan C. Scheibner T., *Absence of immunoreactive vasoactive intestinal polypeptide in tissue from the lungs of patients with asthma*. N Engl J Med, 1989. 320(19): 1244-1248.
  14. Joos G.F., Germonpre P.R. Pauwels R.A., *Neural mechanisms in asthma*. Clin Exp Allergy, 2000. 30 Suppl 1: 60-65.
-

15. Richardson J.D. Vasko M.R., *Cellular mechanisms of neurogenic inflammation*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. 302(3): 839-845.
  16. Bers D.M., *Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes*. Annu Rev Physiol, 2008. 70: 23-49.
  17. Grover A.K. Khan I., *Calcium pump isoforms: diversity, selectivity and plasticity*. Review article. Cell Calcium, 1992. 13(1): 9-17.
  18. Oh-hora M. Rao A., *Calcium signaling in lymphocytes*. Curr Opin Immunol, 2008. 20(3): 250-258.
  19. Montano L.M., Carbajal V., Arreola J.L., Barajas-Lopez C., Flores-Soto E. Vargas M.H., *Acetylcholine and tachykinins involvement in the caffeine-induced biphasic change in intracellular Ca<sup>2+</sup> in bovine airway smooth muscle*. Br J Pharmacol, 2003. 139(6): 1203-1211.
  20. Laporte R., Hui A. Laher I., *Pharmacological modulation of sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle*. Pharmacol Rev, 2004. 56(4): 439-513.
  21. Pande J. Grover A.K., *Plasma membrane calcium pumps in smooth muscle: from fictional molecules to novel inhibitors*. Can J Physiol Pharmacol, 2005. 83(8-9): 743-754.
  22. Thirstrup S., *Control of airway smooth muscle tone. I--electrophysiology and contractile mediators*. Respir Med, 2000. 94(4): 328-336.
  23. Jude J.A., Wylam M.E., Walseth T.F. Kannan M.S., *Calcium signaling in airway smooth muscle*. Proc Am Thorac Soc, 2008. 5(1): 15-22.
  24. Liu C., Zuo J., Pertens E., Helli P.B. Janssen L.J., *Regulation of Rho/ROCK signaling in airway smooth muscle by membrane potential and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. 289(4): L574-582.
  25. Worley J.F., 3rd Kotlikoff M.I., *Dihydropyridine-sensitive single calcium channels in airway smooth muscle cells*. Am J Physiol, 1990. 259(6 Pt 1): L468-480.
  26. Montano L.M., Barajas-Lopez C. Daniel E.E., *Canine bronchial sustained contraction in Ca<sup>2+</sup>-free medium: role of intracellular Ca<sup>2+</sup>*. Can J Physiol Pharmacol, 1996. 74(11): 1236-1248.
  27. Fleischmann B.K., Wang Y.X., Pring M. Kotlikoff M.I., *Voltage-dependent calcium currents and cytosolic calcium in equine airway myocytes*. J Physiol, 1996. 492 ( Pt 2): 347-358.
  28. Janssen L.J., *T-type and L-type Ca<sup>2+</sup> currents in canine bronchial smooth muscle: characterization and physiological roles*. Am J Physiol, 1997. 272(6 Pt 1): C1757-1765.
-

29. Guibert C., Ducret T., Savineau J.P., *Voltage-independent calcium influx in smooth muscle*. Prog Biophys Mol Biol, 2008. 98(1): 10-23.
  30. Murray R.K., Kotlikoff M.I., *Receptor-activated calcium influx in human airway smooth muscle cells*. J Physiol, 1991. 435: 123-144.
  31. Parekh A.B., Putney J.W., Jr., *Store-operated calcium channels*. Physiol Rev, 2005. 85(2): 757-810.
  32. Putney J.W., Jr., *Capacitative calcium entry revisited*. Cell Calcium, 1990. 11(10): 611-624.
  33. Ito S., Kume H., Naruse K., Kondo M., Takeda N., Iwata S., Hasegawa Y., Sokabe M., *A novel Ca<sup>2+</sup> influx pathway activated by mechanical stretch in human airway smooth muscle cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008. 38(4): 407-413.
  34. Nagaoka M., Nara M., Tamada T., Kume H., Oguma T., Kikuchi T., Zaini J., Moriya T., Ichinose M., Tamura G., Hattori T., *Regulation of adenosine 5'-triphosphate (ATP)-gated P2X(4) receptors on tracheal smooth muscle cells*. Respir Physiol Neurobiol, 2009. 166(1): 61-67.
  35. Flores-Soto E. C.V., Reyes-García J., García-Hernández, L. M., Figueroa A., Checa M., Barajas-López C., Montaña L.M., *In airways ATP refills sarcoplasmic reticulum via P2X smooth muscle receptors and induces contraction through P2Y epithelial receptors*. Pflugers Arch - Eur J Physiol 2011. 461: 261-275.
  36. Sieck G.C., Kannan M.S., Prakash Y.S., *Heterogeneity in dynamic regulation of intracellular calcium in airway smooth muscle cells*. Can J Physiol Pharmacol, 1997. 75(7): 878-888.
  37. Baron C.B., Cunningham M., Strauss J.F., Coburn R.F., *Pharmacomechanical coupling in smooth muscle may involve phosphatidylinositol metabolism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. 81(21): 6899-6903.
  38. Bazan-Perkins B., Carbajal V., Sommer B., Macias-Silva M., Gonzalez-Martinez M., Valenzuela F., Daniel E.E., Montano L.M., *Involvement of different Ca<sup>2+</sup> pools during the canine bronchial sustained contraction in Ca<sup>2+</sup>-free medium: lack of effect of PKC inhibition*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1998. 358(5): 567-573.
  39. Montano L.M., Bazan-Perkins B., *Resting calcium influx in airway smooth muscle*. Can J Physiol Pharmacol, 2005. 83(8-9): 717-723.
  40. Kajita J., Yamaguchi H., *Calcium mobilization by muscarinic cholinergic stimulation in bovine single airway smooth muscle*. Am J Physiol, 1993. 264(5 Pt 1): L496-503.
-

41. Horowitz A., Menice C.B., Laporte R.Morgan K.G., *Mechanisms of smooth muscle contraction*. *Physiol Rev*, 1996. 76(4): 967-1003.
  42. Marin J., Encabo A., Briones A., Garcia-Cohen E.C.Alonso M.J., *Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: calcium pumps*. *Life Sci*, 1999. 64(5): 279-303.
  43. Somlyo A.P. Somlyo A.V., *Signal transduction and regulation in smooth muscle*. *Nature*, 1994. 372(6503): 231-236.
  44. Perez J.F. Sanderson M.J., *The frequency of calcium oscillations induced by 5-HT, ACH, and KCl determine the contraction of smooth muscle cells of intrapulmonary bronchioles*. *J Gen Physiol*, 2005. 125(6): 535-553.
  45. Perez-Zoghbi J.F., Karner C., Ito S., Shepherd M., Alrashdan Y.Sanderson M.J., *Ion channel regulation of intracellular calcium and airway smooth muscle function*. *Pulm Pharmacol Ther*, 2009. 22(5): 388-397.
  46. Billington C.K. Penn R.B., *Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle*. *Respir Res*, 2003. 4: 2.
  47. Chiba Y., Sakai H.Misawa M., *Possible involvement of G(i3) protein in augmented contraction of bronchial smooth muscle from antigen-induced airway hyperresponsive rats*. *Biochem Pharmacol*, 2001. 61(7): 921-924.
  48. Joshi S., Abebe W.Agrawal D.K., *G-proteins in guinea pig airway smooth muscle: identification and functional involvement*. *Pharmacol Res*, 1996. 33(3): 195-202.
  49. Joshi S., Abebe W.Agrawal D.K., *Identification of guanine nucleotide binding regulatory proteins in bovine tracheal smooth muscle*. *Mol Cell Biochem*, 1996. 154(2): 179-184.
  50. Penn R.B. Benovic J.L., *Regulation of heterotrimeric G protein signaling in airway smooth muscle*. *Proc Am Thorac Soc*, 2008. 5(1): 47-57.
  51. Hirshman C.A. Emala C.W., *Actin reorganization in airway smooth muscle cells involves Gq and Gi-2 activation of Rho*. *Am J Physiol*, 1999. 277(3 Pt 1): L653-661.
  52. Johnson E.N. Druey K.M., *Heterotrimeric G protein signaling: role in asthma and allergic inflammation*. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. 109(4): 592-602.
  53. Hakonarson H. Grunstein M.M., *Regulation of second messengers associated with airway smooth muscle contraction and relaxation*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. 158(5 Pt 3): S115-122.
  54. McGraw D.W., Elwing J.M., Fogel K.M., Wang W.C., Glinka C.B., Mihlbachler K.A., Rothenberg M.E.Liggett S.B., *Crosstalk between Gi and Gq/Gs pathways in airway smooth muscle regulates bronchial contractility and relaxation*. *J Clin Invest*, 2007. 117(5): 1391-1398.
-

- 
55. Linder M.E. Gilman A.G., *G proteins*. Sci Am, 1992. 267(1): 56-61, 64-55.
  56. Pyne N.J., Grady M.W., Shehnaz D., Stevens P.A., Pyne S.Rodger I.W., *Muscarinic blockade of beta-adrenoceptor-stimulated adenylyl cyclase: the role of stimulatory and inhibitory guanine-nucleotide binding regulatory proteins (Gs and Gi)*. Br J Pharmacol, 1992. 107(3): 881-887.
  57. Berridge M.J., *Inositol trisphosphate and calcium signalling*. Nature, 1993. 361(6410): 315-325.
  58. Chiba Y. Misawa M., *The role of RhoA-mediated Ca<sup>2+</sup> sensitization of bronchial smooth muscle contraction in airway hyperresponsiveness*. J Smooth Muscle Res, 2004. 40(4-5): 155-167.
  59. Janssen L.J. Killian K., *Airway smooth muscle as a target of asthma therapy: history and new directions*. Respir Res, 2006. 7: 123.
  60. Allen B.G. Walsh M.P., *The biochemical basis of the regulation of smooth-muscle contraction*. Trends Biochem Sci, 1994. 19(9): 362-368.
  61. Amrani Y., Lazaar A.L.Panettieri R.A., Jr., *Up-regulation of ICAM-1 by cytokines in human tracheal smooth muscle cells involves an NF-kappa B-dependent signaling pathway that is only partially sensitive to dexamethasone*. J Immunol, 1999. 163(4): 2128-2134.
  62. Pfitzer G., *Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle*. J Appl Physiol, 2001. 91(1): 497-503.
  63. Janssen L.J., *Ionic mechanisms and Ca(2+) regulation in airway smooth muscle contraction: do the data contradict dogma?* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. 282(6): L1161-1178.
  64. Kitazawa T., Gaylinn B.D., Denney G.H.Somlyo A.P., *G-protein-mediated Ca<sup>2+</sup> sensitization of smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation*. J Biol Chem, 1991. 266(3): 1708-1715.
  65. Fust A. Stephens N.L., *Relaxation of canine airway smooth muscle*. Can J Physiol Pharmacol, 2007. 85(7): 672-678.
  66. Gil F.R. Lauzon A.M., *Smooth muscle molecular mechanics in airway hyperresponsiveness and asthma*. Can J Physiol Pharmacol, 2007. 85(1): 133-140.
  67. Carvajal J.A., Germain A.M., Huidobro-Toro J.P.Weiner C.P., *Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation*. J Cell Physiol, 2000. 184(3): 409-420.
  68. Bai Y. Sanderson M.J., *Airway smooth muscle relaxation results from a reduction in the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations induced by a cAMP-mediated inhibition of the IP<sub>3</sub> receptor*. Respir Res, 2006. 7: 34.
-

- 
69. Floyd R. Wray S., *Calcium transporters and signalling in smooth muscles*. Cell Calcium, 2007. 42(4-5): 467-476.
  70. Kargacin M.E. Kargacin G.J., *Direct measurement of Ca<sup>2+</sup> uptake and release by the sarcoplasmic reticulum of saponin permeabilized isolated smooth muscle cells*. J Gen Physiol, 1995. 106(3): 467-484.
  71. Guerini D., Guidi F. Carafoli E., *Differential membrane targeting of the SERCA and PMCA calcium pumps: experiments with recombinant chimeras*. FASEB J, 2002. 16(6): 519-528.
  72. Eisner D.A. Lederer W.J., *Na-Ca exchange: stoichiometry and electrogenicity*. Am J Physiol, 1985. 248(3 Pt 1): C189-202.
  73. Blaustein M.P. Lederer W.J., *Sodium/calcium exchange: its physiological implications*. Physiol Rev, 1999. 79(3): 763-854.
  74. Hirota S., Pertens E. Janssen L.J., *The reverse mode of the Na(+)/Ca(2+) exchanger provides a source of Ca(2+) for store refilling following agonist-induced Ca(2+) mobilization*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. 292(2): L438-447.
  75. Abdel-Latif A.A., *Cross talk between cyclic nucleotides and polyphosphoinositide hydrolysis, protein kinases, and contraction in smooth muscle*. Exp Biol Med (Maywood), 2001. 226(3): 153-163.
  76. Kotlikoff M.I. Kamm K.E., *Molecular mechanisms of beta-adrenergic relaxation of airway smooth muscle*. Annu Rev Physiol, 1996. 58: 115-141.
  77. Tanaka Y., Yamashita Y., Yamaki F., Horinouchi T., Shigenobu K. Koike K., *MaxiK channel mediates beta2-adrenoceptor-activated relaxation to isoprenaline through cAMP-dependent and -independent mechanisms in guinea-pig tracheal smooth muscle*. J Smooth Muscle Res, 2003. 39(6): 205-219.
  78. Yue C., Dodge K.L., Weber G. Sanborn B.M., *Phosphorylation of serine 1105 by protein kinase A inhibits phospholipase Cbeta3 stimulation by Galphaq*. J Biol Chem, 1998. 273(29): 18023-18027.
  79. GINA, ed. *Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention*. 2009, WHO/NLBI.
  80. Benovic J.L., *Novel beta2-adrenergic receptor signaling pathways*. J Allergy Clin Immunol, 2002. 110(6 Suppl): S229-235.
  81. Mueller E. van Breemen C., *Role of intracellular Ca<sup>2+</sup> sequestration in beta-adrenergic relaxation of a smooth muscle*. Nature, 1979. 281(5733): 682-683.
  82. Koike K., Yamashita Y., Horinouchi T., Yamaki F. Tanaka Y., *cAMP-independent mechanism is significantly involved in beta2-adrenoceptor-mediated tracheal relaxation*. Eur J Pharmacol, 2004. 492(1): 65-70.
-

- 
83. Kume H., Hall I.P., Washabau R.J., Takagi K., Kotlikoff M.I., *Beta-adrenergic agonists regulate K<sub>Ca</sub> channels in airway smooth muscle by cAMP-dependent and -independent mechanisms*. J Clin Invest, 1994. 93(1): 371-379.
  84. Jones T.R., Charette L., Garcia M.L., Kaczorowski G.J., *Selective inhibition of relaxation of guinea-pig trachea by charybdotoxin, a potent Ca<sup>(++)</sup>-activated K<sup>+</sup> channel inhibitor*. J Pharmacol Exp Ther, 1990. 255(2): 697-706.
  85. Devillier P., Corompt E., Breant D., Caron F., Bessard G., *Relaxation and modulation of cyclic AMP production in response to atrial natriuretic peptides in guinea pig tracheal smooth muscle*. Eur J Pharmacol, 2001. 430(2-3): 325-333.
  86. Redington A.E., *Modulation of nitric oxide pathways: therapeutic potential in asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Eur J Pharmacol, 2006. 533(1-3): 263-276.
  87. Ricciardolo F.L., Nijkamp F.P., Folkerts G., *Nitric oxide synthase (NOS) as therapeutic target for asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Curr Drug Targets, 2006. 7(6): 721-735.
  88. Luhrs H., Papadopoulos T., Schmidt H.H., Menzel T., *Type I nitric oxide synthase in the human lung is predominantly expressed in capillary endothelial cells*. Respir Physiol, 2002. 129(3): 367-374.
  89. Dumitriu I.L., Petrescu B.C., Gurzu M.B., Gurzu B., Slatineanu S.M., *[New insight into nitric oxide involvement in regulation of airways smooth muscle tone]*. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2007. 111(2): 454-458.
  90. Shan J., Carbonara P., Karp N., Tulic M., Hamid Q., Eidelman D.H., *Localization and distribution of NOS1 in murine airways*. Nitric Oxide, 2007. 17(1): 25-32.
  91. Rhoden K.J., Dodson A.M., Ky B., *Stimulation of the Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup> pump in cultured guinea pig airway smooth muscle cells by serotonin*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. 293(1): 107-112.
  92. Dodson A.M., Rhoden K.J., *Bradykinin increases Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup> pump activity in cultured guinea-pig tracheal smooth muscle cells*. Br J Pharmacol, 2001. 133(8): 1339-1345.
  93. Janssen L.J., Nana R., *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase mediates rhythmic spontaneous relaxations in canine airway smooth muscle*. Respir Physiol, 1997. 108(2): 187-194.
  94. Moreland R.S., van Breemen C., Bohr D.F., *Mechanism by which serotonin attenuates contractile response of canine mesenteric arterial smooth muscle*. J Pharmacol Exp Ther, 1985. 232(2): 322-329.
  95. Fernandez-Alfonso M.S., Sanchez-Ferrer C.F., Salices M., Marin J., *Functional role of sodium pump in human placental arteries*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1992. 345(1): 108-116.
-

- 
96. Ghatta S., Nimmagadda D., Xu X.O'Rourke S.T., *Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications*. Pharmacol Ther, 2006. 110(1): 103-116.
  97. Pelaia G., Gallelli L., Vatrella A., Grembiale R.D., Maselli R., De Sarro G.B.Marsico S.A., *Potential role of potassium channel openers in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Life Sci, 2002. 70(9): 977-990.
  98. Liu X.S. Xu Y.J., *Potassium channels in airway smooth muscle and airway hyperreactivity in asthma*. Chin Med J (Engl), 2005. 118(7): 574-580.
  99. Alexander S.P.H., Peters, J.A., *2000 Receptor and ion channel nomenclature*. Trends Pharmacol Sci, 2000. Suppl(21): 106-112.
  100. Sausbier M., Zhou X.B., Beier C., Sausbier U., Wolpers D., Maget S., Martin C., Dietrich A., Ressemeyer A.R., Renz H., Schlossmann J., Hofmann F., Neuhuber W., Gudermann T., Uhlig S., Korth M.Ruth P., *Reduced rather than enhanced cholinergic airway constriction in mice with ablation of the large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel*. FASEB J, 2007. 21(3): 812-822.
  101. Latorre R. Brauchi S., *Large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BK) channel: activation by Ca<sup>2+</sup> and voltage*. Biol Res, 2006. 39(3): 385-401.
  102. Snetkov V.A. Ward J.P., *Ion currents in smooth muscle cells from human small bronchioles: presence of an inward rectifier K<sup>+</sup> current and three types of large conductance K<sup>+</sup> channel*. Exp Physiol, 1999. 84(5): 835-846.
  103. Kaczorowski G.J., Knaus H.G., Leonard R.J., McManus O.B.Garcia M.L., *High-conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function*. J Bioenerg Biomembr, 1996. 28(3): 255-267.
  104. Toro L., Wallner M., Meera P.Tanaka Y., *Maxi-K(Ca), a Unique Member of the Voltage-Gated K Channel Superfamily*. News Physiol Sci, 1998. 13: 112-117.
  105. Wu S.N., *Large-conductance Ca<sup>2+</sup>- activated K<sup>+</sup> channels:physiological role and pharmacology*. Curr Med Chem, 2003. 10(8): 649-661.
  106. Ong H.L. Barritt G.J., *Transient receptor potential and other ion channels as pharmaceutical targets in airway smooth muscle cells*. Respiriology, 2004. 9(4): 448-457.
  107. Tanaka Y., Koike K., Alioua A., Shigenobu K., Stefani E.Toro L., *Beta1-subunit of MaxiK channel in smooth muscle: a key molecule which tunes muscle mechanical activity*. J Pharmacol Sci, 2004. 94(4): 339-347.
  108. Knot H.J. B.J.E., Nelson M.T., *Calcium channels and potassium channels, in Biochemistry of smooth muscle contraction*, M. Bárány, Editor. 1996, Academic Press: San Diego. p. 203-239.
-



- 
109. Janssen L.J., Netherton S.J.Walters D.K., *Ca(2+)-dependent K(+) channels and Na(+)-K(+)-ATPase mediate H(2)O(2)- and superoxide-induced relaxations in canine trachealis*. J Appl Physiol, 2000. 88(2): 745-752.
  110. Alioua A., Mahajan A., Nishimaru K., Zarei M.M., Stefani E.Toro L., *Coupling of c-Src to large conductance voltage- and Ca2+-activated K+ channels as a new mechanism of agonist-induced vasoconstriction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(22): 14560-14565.
  111. Lu R., Alioua A., Kumar Y., Eghbali M., Stefani E.Toro L., *MaxiK channel partners: physiological impact*. J Physiol, 2006. 570(Pt 1): 65-72.
  112. Green A.R., *Neuropharmacology of 5-hydroxytryptamine*. Br J Pharmacol, 2006. 147 Suppl 1: S145-152.
  113. Whitaker-Azmitia P.M., *The discovery of serotonin and its role in neuroscience*. Neuropsychopharmacology, 1999. 21(2 Suppl): 2S-8S.
  114. Erspamer V., Vialli, M., *Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini*. Boll d Soc Med-chir Pavia 1937. 51: 357-363.
  115. Rapport M.M., Green A.A.Page I.H., *Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization*. J Biol Chem, 1948. 176(3): 1243-1251.
  116. Rapport M.M., Green A.A.Page I.H., *Serum vasoconstrictor, serotonin; chemical inactivation*. J Biol Chem, 1948. 176(3): 1237-1241.
  117. Rapport M.M., Green A.A.Page I.H., *Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum*. J Biol Chem, 1948. 174(2): 735-741.
  118. Udenfriend S., Weissbach H.Clark C.T., *The estimation of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in biological tissues*. J Biol Chem, 1955. 215(1): 337-344.
  119. Rapport M.M., *Serum vasoconstrictor (serotonin) the presence of creatinine in the complex; a proposed structure of the vasoconstrictor principle*. J Biol Chem, 1949. 180(3): 961-969.
  120. Erspamer V. Asero B., *Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine*. Nature, 1952. 169(4306): 800-801.
  121. Erspamer V. Asero B., *Isolation of enteramine from extracts of posterior salivary glands of Octopus vulgaris and of Discoglossus pictus skin*. J Biol Chem, 1953. 200(1): 311-318.
  122. Kimura M., *Fluorescence histochemical study on serotonin and catecholamine in some plants*. Jpn J Pharmacol, 1968. 18(2): 162-168.
-

- 
123. Carlberg M. Anctil M., *Biogenic amines in coelenterates*. Comp Biochem Physiol C, 1993. 106(1): 1-9.
  124. Flyachinskaya L.P., *Localization of serotonin and FMRFamide in the bivalve mollusc Mytilus edulis at early stages of its development* Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology, 2000. 36(2): 66-70.
  125. Harzsch S., *Phylogenetic comparison of serotonin-immunoreactive neurons in representatives of the Chilopoda, Diplopoda, and Chelicerata: Implications for arthropod relationships*. Journal of Morphology, 2003. 259(2): 198 - 213.
  126. Pucadyil T.J., Kalipatnapu S.Chattopadhyay A., *The serotonin<sub>1A</sub> receptor: a representative member of the serotonin receptor family*. Cell Mol Neurobiol, 2005. 25(3-4): 553-580.
  127. Markstein R., Matsumoto M., Kohler C., Togashi H., Yoshioka M.Hoyer D., *Pharmacological characterisation of 5-HT receptors positively coupled to adenylyl cyclase in the rat hippocampus*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1999. 359(6): 454-459.
  128. Bayer H., Muller T., Myrtek D., Sorichter S., Ziegenhagen M., Norgauer J., Zissel G.Idzko M., *Serotonergic receptors on human airway epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. 36(1): 85-93.
  129. Cutz E., Yeger H.Pan J., *Pulmonary neuroendocrine cell system in pediatric lung disease-recent advances*. Pediatr Dev Pathol, 2007. 10(6): 419-435.
  130. Pan J., Luk C., Kent G., Cutz E.Yeger H., *Pulmonary neuroendocrine cells, airway innervation, and smooth muscle are altered in Cfr null mice*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. 35(3): 320-326.
  131. Uvnas B., *Chemistry and storage function of mast cell granules*. J Invest Dermatol, 1978. 71(1): 76-80.
  132. Dodson A.M., Anderson G.M.Rhoden K.J., *Serotonin uptake and metabolism by cultured guinea pig airway smooth muscle cells*. Pulm Pharmacol Ther, 2004. 17(1): 19-25.
  133. Herd C.M. Page C.P., *Pulmonary immune cells in health and disease: platelets*. Eur Respir J, 1994. 7(6): 1145-1160.
  134. Hart C.M. Block E.R., *Lung serotonin metabolism*. Clin Chest Med, 1989. 10(1): 59-70.
  135. Murphy D.L., *Peripheral indices of central serotonin function in humans*. Ann N Y Acad Sci, 1990. 600: 282-295; discussion 295-286.
  136. Kitson S.L., *5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor ligands*. Curr Pharm Des, 2007. 13(25): 2621-2637.
-

- 
137. Nakamura K. Hasegawa H., *Developmental role of tryptophan hydroxylase in the nervous system*. Mol Neurobiol, 2007. 35(1): 45-54.
  138. Sanders-Bush E.a.M., S.E., *5-Hydroxytryptamine (serotonin): Receptor agonist and antagonists*, in *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, L.L. Brunton, J.S. Lazo, and K.L. Parker, Editors. 2006, McGraw-Hill: New York. p. 297-315.
  139. Gaddum J.H. Picarelli Z.P., *Two kinds of tryptamine receptor*. Br J Pharmacol Chemother, 1957. 12(3): 323-328.
  140. Hannon J. Hoyer D., *Molecular biology of 5-HT receptors*. Behav Brain Res, 2008. 195(1): 198-213.
  141. Peroutka S.J. Snyder S.H., *Multiple serotonin receptors: differential binding of [3H]5-hydroxytryptamine, [3H]lysergic acid diethylamide and [3H]spiroperidol*. Mol Pharmacol, 1979. 16(3): 687-699.
  142. Bradley P.B., Engel G., Feniuk W., Fozard J.R., Humphrey P.P., Middlemiss D.N., Mylecharane E.J., Richardson B.P.Saxena P.R., *Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine*. Neuropharmacology, 1986. 25(6): 563-576.
  143. Hoyer D., Clarke D.E., Fozard J.R., Hartig P.R., Martin G.R., Mylecharane E.J., Saxena P.R.Humphrey P.P., *International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin)*. Pharmacol Rev, 1994. 46(2): 157-203.
  144. Hoyer D. Martin G., *5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome*. Neuropharmacology, 1997. 36(4-5): 419-428.
  145. Humphrey P.P., Hartig P.Hoyer D., *A proposed new nomenclature for 5-HT receptors*. Trends Pharmacol Sci, 1993. 14(6): 233-236.
  146. Raymond J.R., Mukhin Y.V., Gelasco A., Turner J., Collinsworth G., Gettys T.W., Grewal J.S.Garnovskaya M.N., *Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction*. Pharmacol Ther, 2001. 92(2-3): 179-212.
  147. Saxena P.R., *Serotonin receptors: subtypes, functional responses and therapeutic relevance*. Pharmacol Ther, 1995. 66(2): 339-368.
  148. Hoyer D. Martin G.R., *Classification and nomenclature of 5-HT receptors: a comment on current issues*. Behav Brain Res, 1996. 73(1-2): 263-268.
  149. Hoyer D. Humphrey P.P., *Nomenclature and classification of transmitter receptors: an integrated approach*. J Recept Signal Transduct Res, 1997. 17(1-3): 551-568.
-

- 
150. Andrade R., Barnes N. M., Baxter, G., Bockaert, J., Branchek, T., Cohen, M.L., Dumuis, A., Eglén, R., Göthert, M., Hamblin, M., Hamon, M., Hartig, P.R., Hen, R., Herrick-Davis K., Hills, R., Hoyer, D., Humphrey, P.P.A., Latté, K.P., Maroteaux, L., Martin, G.M., Middlemiss, D., Mylecharane, E., Peroutka, S. J., Saxena, P.R., Sleight, A., Villalón C.M., Yocca F.. (2010) *5-Hydroxytryptamine receptors*. Last modified on 2010-05-17.
  151. Gerhardt C.C. van Heerikhuizen H., *Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors*. Eur J Pharmacol, 1997. 334(1): 1-23.
  152. Lauweryns J.M., Cokelaere M., Theunynck P.Deleersnyder M., *Neuroepithelial bodies in mammalian respiratory mucosa: light optical, histochemical and ultrastructural studies*. Chest, 1974. 65: Suppl:22S-29S.
  153. Joos G.F., Lefebvre R.A., Bullock G.R.Pauwels R.A., *Role of 5-hydroxytryptamine and mast cells in the tachykinin-induced contraction of rat trachea in vitro*. Eur J Pharmacol, 1997. 338(3): 259-268.
  154. Scheuermann D.W., *Comparative histology of pulmonary neuroendocrine cell system in mammalian lungs*. Microsc Res Tech, 1997. 37(1): 31-42.
  155. Fu X.W., Nurse C.A., Wong V.Cutz E., *Hypoxia-induced secretion of serotonin from intact pulmonary neuroepithelial bodies in neonatal rabbit*. J Physiol, 2002. 539(Pt 2): 503-510.
  156. Segura P., Vargas M.H., Cordoba-Rodriguez G., Chavez J., Arreola J.L., Campos-Bedolla P., Ruiz V., Garcia-Hernandez L.M., Mendez C.Montano L.M., *Role of 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>4</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors in the antigen-induced airway hyperresponsiveness in guinea-pigs*. Clin Exp Allergy, 2010. 40(2): 327-338.
  157. Cazzola I. Matera M.G., *5-HT modifiers as a potential treatment of asthma*. Trends Pharmacol Sci, 2000. 21(1): 13-16.
  158. Lechin F., van der Dijs B., Orozco B., Lechin M.Lechin A.E., *Increased levels of free serotonin in plasma of symptomatic asthmatic patients*. Ann Allergy Asthma Immunol, 1996. 77(3): 245-253.
  159. Lechin F., van der Dijs B., Orozco B., Jara H., Rada I., Lechin M.E.Lechin A.E., *Neuropharmacologic treatment of bronchial asthma with the antidepressant tianeptine: a double-blind, crossover placebo-controlled study*. Clin Pharmacol Ther, 1998. 64(2): 223-232.
  160. Barnes P.J., Chung K.F.Page C.P., *Inflammatory mediators of asthma: an update*. Pharmacol Rev, 1998. 50(4): 515-596.
  161. Barnes P.J., *Histamine and serotonin*. Pulm Pharmacol Ther, 2001. 14(5): 329-339.
-

- 
162. Van Nueten J.M., Leysen J.E., Vanhoutte P.M.Janssen P.A., *Serotonergic responses in vascular and non-vascular tissues*. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1982. 256(2): 331-334.
  163. Cohen M.L., Schenck K.W., Colbert W.Wittenauer L., *Role of 5-HT<sub>2</sub> receptors in serotonin-induced contractions of nonvascular smooth muscle*. J Pharmacol Exp Ther, 1985. 232(3): 770-774.
  164. Lemoine H. Kaumann A.J., *Allosteric properties of 5-HT<sub>2</sub> receptors in tracheal smooth muscle*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1986. 333(2): 91-97.
  165. Cazzola M., Spinazzi A., Santangelo G., Steinijans V.W., Wurst W., Solleder P.Girbino G., *Acute effects of urapidil on airway response in hypertensive patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Drugs, 1990. 40 Suppl 4: 71-72.
  166. Buckner C.K., Dea D., Liberati N.Krell R.D., *A pharmacologic examination of receptors mediating serotonin-induced bronchoconstriction in the anesthetized guinea pig*. J Pharmacol Exp Ther, 1991. 257(1): 26-34.
  167. Briejer M.R., Akkermans L.M., Meulemans A.L., Lefebvre R.A.Schuurkes J.A., *Nitric oxide is involved in 5-HT-induced relaxations of the guinea-pig colon ascendens in vitro*. Br J Pharmacol, 1992. 107(3): 756-761.
  168. Szarek J.L., Zhang J.Z.Gruetter C.A., *Mechanisms of 5-hydroxytryptamine-induced contraction of isolated rat intrapulmonary bronchi*. Pulm Pharmacol, 1995. 8(6): 273-281.
  169. Baumgartner R.A., Wills-Karp M., Kaufman M.J., Munakata M.Hirshman C., *Serotonin induces constriction and relaxation of the guinea pig airway*. J Pharmacol Exp Ther, 1990. 255(1): 165-173.
  170. Aas P., *Serotonin induced release of acetylcholine from neurons in the bronchial smooth muscle of the rat*. Acta Physiol Scand, 1983. 117(3): 477-480.
  171. Eum S.Y., Norel X., Lefort J., Labat C., Vargaftig B.B.Brink C., *Anaphylactic bronchoconstriction in BP2 mice: interactions between serotonin and acetylcholine*. Br J Pharmacol, 1999. 126(1): 312-316.
  172. Germonpre P.R., Joos G.F.Pauwels R.A., *Modulation by 5-HT<sub>1A</sub> receptors of the 5-HT<sub>2</sub> receptor-mediated tachykinin-induced contraction of the rat trachea in vitro*. Br J Pharmacol, 1998. 123(8): 1571-1578.
  173. Moffatt J.D., Cocks T.M.Page C.P., *Role of the epithelium and acetylcholine in mediating the contraction to 5-hydroxytryptamine in the mouse isolated trachea*. Br J Pharmacol, 2004. 141(7): 1159-1166.
  174. Rizzo C.A., Kreutner W.Chapman R.W., *5-HT<sub>3</sub> receptors augment neuronal, cholinergic contractions in guinea pig trachea*. Eur J Pharmacol, 1993. 234(1): 109-112.
-

- 
175. Takahashi T., Ward J.K., Tadjkarimi S., Yacoub M.H., Barnes P.J., Belvisi M.G., *5-Hydroxytryptamine facilitates cholinergic bronchoconstriction in human and guinea pig airways*. Am J Respir Crit Care Med, 1995. 152(1): 377-380.
  176. Van Oosterhout A.J., Hofman G., Woutersen-Van Nijnanten F.M., Nijkamp F.P., *5-HT<sub>1</sub>-like receptors mediate potentiation of cholinergic nerve-mediated contraction of isolated mouse trachea*. Eur J Pharmacol, 1991. 209(3): 237-244.
  177. Eglen R.M., Jasper J.R., Chang D.J., Martin G.R., *The 5-HT<sub>7</sub> receptor: orphan found*. Trends Pharmacol Sci, 1997. 18(4): 104-107.
  178. Saxena P.R., De Vries P., Villalon C.M., *5-HT<sub>1</sub>-like receptors: a time to bid goodbye*. Trends Pharmacol Sci, 1998. 19(8): 311-316.
  179. Dupont L.J., Pype J.L., Meade C.J., DeLeyn P., Deneffe G., Demedts M.G., Verleden G.M., *Epinastine (WAL 801CL) inhibits the electrical field stimulation-induced cholinergic contraction in guinea pig and human airways in vitro*. Eur Respir J, 1999. 14(5): 1068-1075.
  180. Adner M., Rose A.C., Zhang Y., Sward K., Benson M., Uddman R., Shankley N.P., Cardell L.O., *An assay to evaluate the long-term effects of inflammatory mediators on murine airway smooth muscle: evidence that TNF $\alpha$  up-regulates 5-HT<sub>2A</sub>-mediated contraction*. Br J Pharmacol, 2002. 137(7): 971-982.
  181. Goldie R.G., Paterson J.W., Lulich K.M., *Adrenoceptors in airway smooth muscle*. Pharmacol Ther, 1990. 48(3): 295-322.
  182. Doucet M.Y., Jones T.R., Ford-Hutchinson A.W., *Responses of equine trachealis and lung parenchyma to methacholine, histamine, serotonin, prostanoids, and leukotrienes in vitro*. Can J Physiol Pharmacol, 1990. 68(3): 379-383.
  183. Ben-Harari R.R., Dalton B.A., Osman R., Maayani S., *Kinetic characterization of 5-hydroxytryptamine receptor desensitization in isolated guinea-pig trachea and rabbit aorta*. J Pharmacol Exp Ther, 1991. 257(1): 416-424.
  184. Kitazawa T., Takaoka K., Taneike T., *Mechanisms of 5-hydroxytryptamine-induced inhibition in the porcine myometrium*. J Auton Pharmacol, 1999. 19(2): 65-75.
  185. Kitazawa T., Yamada Y., Iwano H., Yokota H., Yuasa A., Taneike T., *Smooth muscle layer-dependent distribution of 5-hydroxytryptamine(7) receptor in the porcine myometrium*. Br J Pharmacol, 2000. 130(1): 79-89.
  186. Inoue M., Kitazawa T., Cao J., Taneike T., *5-HT<sub>7</sub> receptor-mediated relaxation of the oviduct in nonpregnant proestrus pigs*. Eur J Pharmacol, 2003. 461(2-3): 207-218.
  187. Glusa E., Pertz H.H., *Further evidence that 5-HT-induced relaxation of pig pulmonary artery is mediated by endothelial 5-HT<sub>2B</sub> receptors*. Br J Pharmacol, 2000. 130(3): 692-698.
-

- 
188. Goldie R.G., Paterson J.W.Wale J.L., *Pharmacological responses of human and porcine lung parenchyma, bronchus and pulmonary artery*. Br J Pharmacol, 1982. 76(4): 515-521.
  189. Campos-Bedolla P., Vargas M.H., Calixto E., Segura P., Mendoza-Patino N., Figueroa A., Flores-Soto E., Barajas-Lopez C.Montano L.M., *Alpha-methyl-5-HT, a 5-HT<sub>2</sub> receptor agonist, stimulates beta<sub>2</sub>-adrenoceptors in guinea pig airway smooth muscle*. Pharmacol Res, 2006. 54(6): 468-473.
  190. Zhang Y., Cardell L.O.Adner M., *IL-1beta induces murine airway 5-HT<sub>2A</sub> receptor hyperresponsiveness via a non-transcriptional MAPK-dependent mechanism*. Respir Res, 2007. 8: 29.
  191. Reynolds S.M., Docherty R., Robbins J., Spina D.Page C.P., *Adenosine induces a cholinergic tracheal reflex contraction in guinea pigs in vivo via an adenosine A<sub>1</sub> receptor-dependent mechanism*. J Appl Physiol, 2008. 105(1): 187-196.
  192. Dellabianca A., Sacchi M., Anselmi L., De Amici E., Cervio E., Agazzi A., Tonini S., Sternini C., Tonini M.Candura S.M., *Role of carbon monoxide in electrically induced non-adrenergic, non-cholinergic relaxations in the guinea-pig isolated whole trachea*. Br J Pharmacol, 2007. 150(2): 220-226.
  193. Sanchez M., de Boto M.J., Suarez L., Meana C., Bordallo J., Velasco L., Bordallo C.Cantabrana B., *Role of beta-adrenoceptors, cAMP phosphodiesterase and external Ca<sup>2+</sup> on polyamine-induced relaxation in isolated bovine tracheal strips*. Pharmacol Rep, 2010. 62(6): 1127-1138.
  194. Janssen LJ P.M., Lu-Chao H, Cox G, Keshavjee S., *NO(+) but not NO radical relaxes airway smooth muscle via cGMP-independent release of internal Ca<sup>2+</sup>*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. 278(5): L899-905.
  195. Eksert B. Usta C., *Role of potassium channels in the relaxant effect of levosimendan in guinea pig tracheal preparations*. Pharmacol Rep, 2009. 61(2): 275-280.
  196. Belvisi M.G., Patel H.J., Takahashi T., Barnes P.J.Giembycz M.A., *Paradoxical facilitation of acetylcholine release from parasympathetic nerves innervating guinea-pig trachea by isoprenaline*. Br J Pharmacol, 1996. 117(7): 1413-1420.
  197. Wilson H., Coffman W.J.Cohen M.L., *5-Hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptors mediate tachycardia in conscious instrumented dogs*. J Pharmacol Exp Ther, 1990. 252(2): 683-688.
  198. Bazan-Perkins B., Flores-Soto E., Barajas-Lopez C.Montano L.M., *Role of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> content in Ca<sup>2+</sup> entry of bovine airway smooth muscle cells*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2003. 368(4): 277-283.
  199. Grynkiewicz G., Poenie M.Tsien R.Y., *A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties*. J Biol Chem, 1985. 260(6): 3440-3450.
-

- 
200. Pessah I.N., Stambuk R.A., Casida J.E., *Ca<sup>2+</sup>-activated ryanodine binding: mechanisms of sensitivity and intensity modulation by Mg<sup>2+</sup>, caffeine, and adenosine nucleotides*. *Mol Pharmacol*, 1987. 31(3): 232-238.
  201. Baron C.B., Pompeo J., Blackman D., Coburn R.F., *Common phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate pools are involved in carbachol and serotonin activation of tracheal smooth muscle*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1993. 266(1): 8-15.
  202. Borghini I., Geering K., Gjinovci A., Wollheim C.B., Pralong W.F., *In vivo phosphorylation of the Na,K-ATPase alpha subunit in sciatic nerves of control and diabetic rats: effects of protein kinase modulators*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(13): 6211-6215.
  203. Lopina O.D., *Interaction of Na,K-ATPase catalytic subunit with cellular proteins and other endogenous regulators*. *Biochemistry (Mosc)*, 2001. 66(10): 1122-1131.
  204. Fisone G., Cheng S.X., Nairn A.C., Czernik A.J., Hemmings H.C., Jr., Hoog J.O., Bertorello A.M., Kaiser R., Bergman T., Jornvall H. et al., *Identification of the phosphorylation site for cAMP-dependent protein kinase on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and effects of site-directed mutagenesis*. *J Biol Chem*, 1994. 269(12): 9368-9373.
  205. Aydemir A., *Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase: a review*. *J Ankara Med School*, 2002. 24(2): 73-82.
  206. Snetkov V.A., Hirst S.J., Twort C.H., Ward J.P., *Potassium currents in human freshly isolated bronchial smooth muscle cells*. *Br J Pharmacol*, 1995. 115(6): 1117-1125.
  207. Small R.C., Berry J.L., Burka J.F., Cook S.J., Foster R.W., Green K.A., Murray M.A., *Potassium channel activators and bronchial asthma*. *Clin Exp Allergy*, 1992. 22(1): 11-18.
  208. Nielsen-Kudsk J.E., *Potassium channel modulation: a new drug principle for regulation of smooth muscle contractility. Studies on isolated airways and arteries*. *Dan Med Bull*, 1996. 43(5): 429-447.
  209. Morley J., *K<sup>+</sup> channel openers and suppression of airway hyperreactivity*. *Trends Pharmacol Sci*, 1994. 15(12): 463-468.
  210. Miura M., Belvisi M.G., Stretton C.D., Yacoub M.H., Barnes P.J., *Role of potassium channels in bronchodilator responses in human airways*. *Am Rev Respir Dis*, 1992. 146(1): 132-136.
  211. Zhao L.M., Xu Y.J., Zhang Z.X., Ni W., Chen S.X., *Effect of passive sensitization by serum from allergic asthmatic patients on the activity and expression of voltage-dependent delayed rectifier potassium channel in human bronchial smooth muscle cells*. *Chin Med J (Engl)*, 2004. 117(11): 1630-1636.
-



- 
212. Oonuma H., Iwasawa K., Iida H., Nagata T., Imuta H., Morita Y., Yamamoto K., Nagai R., Omata M., Nakajima T., *Inward rectifier K(+) current in human bronchial smooth muscle cells: inhibition with antisense oligonucleotides targeted to Kir2.1 mRNA*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002. 26(3): 371-379.
  213. Barrett J.N., Magleby K.L., Pallotta B.S., *Properties of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle*. *J Physiol*, 1982. 331: 211-230.
  214. Sathish V., Leblebici F., Kip S.N., Thompson M.A., Pabelick C.M., Prakash Y.S., Sieck G.C., *Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> reuptake in porcine airway smooth muscle*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008. 294(4): L787-796.
  215. Ben-Harari R.R., Dalton B.A., Garg U.C., *Modulation of rate at which serotonin-induced contraction decays in guinea pig trachea*. *Am J Physiol*, 1994. 266(1 Pt 2): R221-227.
  216. D'Agostino B., Matera M.G., Cazzola M., Mangrella M., Rossi F., *Effects of in vitro 5-HT<sub>1</sub> receptor activation in guinea pig trachea*. *Life Sci*, 1996. 59(2): 153-160.
  217. Ismaiel A.M., Titeler M., Miller K.J., Smith T.S., Glennon R.A., *5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> binding profiles of the serotonergic agents alpha-methylserotonin and 2-methylserotonin*. *J Med Chem*, 1990. 33(2): 755-758.
  218. Aiello E.A., Malcolm A.T., Walsh M.P., Cole W.C., *Beta-adrenoceptor activation and PKA regulate delayed rectifier K<sup>+</sup> channels of vascular smooth muscle cells*. *Am J Physiol*, 1998. 275(2 Pt 2): H448-459.
  219. Johnson M., *The beta-adrenoceptor*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. 158(5 Pt 3): S146-153.
  220. Cazzola M.A.G., Lucchetti G., Cicchitto G., D'Amato G., *Effect of ketanserine, a new blocking agent of the 5-HT<sub>2</sub> receptor, on airway responsiveness in asthma*. *Allergy*, 1990. 45: 151-153.
  221. Cazzola M.M.M., Santangelo G., Assogna G., D'Amato G., Rossi F., Girbino G., *Effect of the selective 5-HT<sub>2</sub> antagonist ketanserine on adenosine-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects*. *Immunopharmacology* 1992. 23: 21-28.
  222. De Bie J.J., Henricks, P.A., Cruikshank, W.W., Hofman, G., Jonker, E.H., Nijkamp, F.P., Van Oosterhout, A. J., *Modulation of airway hyperresponsiveness and eosinophilia by selective histamine and 5-HT receptor antagonists in a mouse model of allergic asthma*. *Br J Pharmacol*, 1998. 124: 857-864.
  223. Boehme S.A., Lio F.M., Sikora L., Pandit T.S., Lavrador K., Rao S.P., Sriramarao P., *Cutting edge: serotonin is a chemotactic factor for eosinophils and functions additively with eotaxin*. *J Immunol*, 2004. 173(6): 3599-3603.
-

- 
224. Yamaguchi M., Shibata O., Nishioka K., Makita T., Sumikawa K., *Propofol attenuates ovalbumin-induced smooth muscle contraction of the sensitized rat trachea: inhibition of serotonergic and cholinergic signaling*. *Anesth Analg*, 2006. 103(3): 594-600.
  225. Fujimoto K., Parker J.C., Kayes S.G., *Activated eosinophils increase vascular permeability and resistance in isolated perfused rat lungs*. *Am Rev Respir Dis*, 1990. 142(6 Pt 1): 1414-1421.
  226. Brottman G.M., Regelman W.E., Slungaard A., Wangenstein O.D., *Effect of eosinophil peroxidase on airway epithelial permeability in the guinea pig*. *Pediatr Pulmonol*, 1996. 21(3): 159-166.
  227. Kushnir-Sukhov N.M., Gilfillan A.M., Coleman J.W., Brown J.M., Bruening S., Toth M., Metcalfe D.D., *5-hydroxytryptamine induces mast cell adhesion and migration*. *J Immunol*, 2006. 177(9): 6422-6432.
  228. Ikawati Z., Nose M., Maeyama K., *Do mucosal mast cells contribute to the immediate asthma response?* *Jpn J Pharmacol*, 2001. 86(1): 38-46.
  229. Hannon J.P., Tigani B., Williams I., Mazzoni L., Fozard J.R., *Mechanism of airway hyperresponsiveness to adenosine induced by allergen challenge in actively sensitized Brown Norway rats*. *Br J Pharmacol*, 2001. 132(7): 1509-1523.
  230. Ferrero M.E., *A new approach to the inflammatory/autoimmune diseases*. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, 2009. 4(2): 108-113.
  231. Fitz J.G., *Regulation of cellular ATP release*. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 2007. 118: 199-208.
  232. Burnstock G., *Historical review: ATP as a neurotransmitter*. *Trends Pharmacol Sci*, 2006. 27: 166-176.
  233. Brown R.A., Spina D., Page C.P., *Adenosine receptors and asthma*. *Br J Pharmacol*, 2008. 153 Suppl 1: S446-456.
  234. Cazzola M. M., M. G., Santangelo, G., Assogna, G., D'Amato, G., Rossi, F., Girbino, G., *Effect of the selective 5-HT<sub>2</sub> antagonist ketanserin on adenosine-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects*. *Immunopharmacology* 1992. 23: 21-28.
  235. Weigand L.A., Myers A.C., Meeker S., Udem B.J., *Mast cell-cholinergic nerve interaction in mouse airways*. *J Physiol*, 2009. 587(Pt 13): 3355-3362.
  236. Gentilini G., Franchi-Micheli S., Mugnai S., Bindi D., Zilletti L., *GABA-mediated inhibition of the anaphylactic response in the guinea-pig trachea*. *Br J Pharmacol*, 1995. 115(3): 389-394.
-

237. Undem B.J., Riccio M.M., Weinreich D., Ellis J.L., Myers A.C., *Neurophysiology of mast cell-nerve interactions in the airways*. Int Arch Allergy Immunol, 1995. 107(1-3): 199-201.
-