



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**HISTAMINA, SEROTONINA Y CARBACOL  
INCREMENTAN LA RESPUESTA CONTRÁCTIL AL  
ATP EN TRÁQUEAS DE COBAYOS  
SENSIBILIZADOS: PARTICIPACIÓN DE LOS  
RECEPTORES P2Y**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I O L O G A**

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

**DIANA RODRÍGUEZ CLEMENTE**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. VERÓNICA ESTELA CARBAJAL SALINAS  
(2012)**



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.

## **ESTA TESIS SE REALIZÓ EN:**

- 1. El Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). México, D.F.**
- 2. Laboratorio de Investigación en Asma. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F.**
- 3. Esta tesis se realizó bajo contexto del Taller nivel IV: Respuesta Inmune humoral y celular en diferentes tipos de hipersensibilidad.**

*Bajo la dirección de la:*

**Dra. Verónica Estela Carbajal Salinas**

*Y los revisores de la tesis:*

**Dra. Rocío Salceda Sacanelles**

**Dr. Rene de Jesús Cárdenas Vázquez**

**Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez**

**Dra. Luz María García Hernández**

**Financiada con apoyos de:**

**Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”**

**(No. Proyecto B02-10)**

**Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, 81409).**

**DGAPA-PAPIIT, UNAM (IN201810-3)**

# **DEDICATORIA**

A Dios, a mis padres y a mis hermanos

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi directora de tesis la Dra. Verónica Estela Carbajal Salinas por su asesoría, el apoyo brindado en la realización de este proyecto y su amistad

A los miembros del jurado Dra. Rocío Salceda Sacanelles, Dr. Rene de Jesús Cárdenas Vázquez, Dra. Luz María García Hernández y especialmente al Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez por sus valiosos comentarios

Al Dr. Erasmo Martínez Cordero que a través de sus ideas y conocimientos alimentó mi formación intelectual

A DGAPA-PAPIIT, UNAM por la beca otorgada para realizar mi tesis

Al Departamento de Hiperreactividad Bronquial del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

# ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
El ATP como mediador químico extracelular.....	10
Mecanismo de contracción en el músculo liso de las vías aéreas .....	12
Asma .....	15
Fármacos.....	19
JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO .....	24
HIPÓTESIS .....	25
OBJETIVOS .....	25
MATERIAL Y MÉTODOS .....	26
1. ANIMALES .....	26
2. SENSIBILIZACIÓN DE ANIMALES .....	26
3. ÓRGANOS AISLADOS.....	27
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	29
RESULTADOS .....	30

<b>1. ESTUDIOS EN ÓRGANOS AISLADOS</b>	
a) Evaluación farmacológica de los receptores de ATP en la tráquea de cobayo.....	<b>30</b>
b) Efecto del Cch, la His o la 5-HT sobre la respuesta de contracción del ATP en el tejido traqueal de cobayos no sensibilizados y sensibilizados .....	<b>31</b>
c) El Cch, la His y la 5-HT no inducen hiperreactividad sobre ellos mismos en cobayos sensibilizados .....	<b>32</b>
d) Participación de los receptores P2Y en el fenómeno de hiperreactividad inducido por el Cch, la His o la 5-HT en el tejido traqueal de cobayos sensibilizados .....	<b>33</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>35</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>38</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>39</b>

## ABREVIATURAS

ACh	Acetil colina
ADP	Bifosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración de calcio intracelular
Cch	Carbacol
Cl <sup>-</sup>	Cloro
COX	Ciclooxigenasa
Cu <sup>2+</sup>	Cobre
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FEV <sub>1</sub>	Volumen expiratorio forzado al primer segundo
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
H <sup>+</sup>	Hidrógeno
H <sub>1</sub>	Receptor de histamina tipo 1
His	Histamina
5-HT	Serotonina o 5-hidroxitriptamina
5-HT <sub>2A</sub>	Receptor de serotonina tipo 2A
IL	Interleucina
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
i.p.	Intraperitoneal
IP <sub>3</sub>	1, 4, 5 trifosfato de inositol
K <sup>+</sup>	Potasio
kDa	Kilo daltones
LT	Leucotrieno



LTB <sub>2</sub>	Leucotrieno B <sub>2</sub>
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub>	Leucotrieno C <sub>4</sub>
LTD <sub>2</sub>	Leucotrieno D <sub>2</sub>
LTs	Leucotrienos
M <sub>3</sub>	Receptor muscarínico tipo 3
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de miosina
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de miosina
MLVA	Músculo liso de las vías aéreas
NS	No sensibilizado
O <sub>2</sub>	Oxígeno
P2	Receptor purinérgico
PAF	Factor de activación plaquetaria
PC <sub>20</sub>	Concentración provocativa 20%
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandina D <sub>2</sub>
PKC	Proteína cinasa C
PLCβ	Fosfolipasa Cβ
RB2	Reactivo Azul 2
RS	Retículo sarcoplásmico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
Ser 19	Serina en la posición 19 de la miosina
TK	Cinasa de tirosina
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
UDP	Difosfato de uridina
UTP	Trifosfato de uridina
VDCC	Canales de Ca <sup>2+</sup> tipo L dependientes de voltaje

## RESUMEN

El trifosfato de adenosina (ATP), además de su papel fundamental en el metabolismo energético, desempeña un papel importante en la señalización celular de diversos tejidos. Es liberado como neurotransmisor y bajo condiciones patológicas por plaquetas, células isquémicas y células inflamatorias. Una vez liberado en el espacio extracelular activa un grupo de receptores membranales llamados purinérgicos (P2), que se han clasificado en: P2X (1-7) y P2Y (1,2, 4, 6, 11, 12, 13). El asma se caracteriza por iniciar con un proceso inflamatorio que produce hiperreactividad en las vías aéreas. Ésta consiste en un incremento de la sensibilidad del músculo liso traqueobronquial ante estímulos físicos (aire frío, entre otros) y químicos (agonistas colinérgicos, histaminérgicos, serotoninérgicos, etc.), que en condiciones normales no se daría. Recientemente, el papel del ATP y la vía de señalización purinérgica han sido implicadas en ésta patogénesis, por lo tanto, es importante conocer el efecto del ATP en las vías aéreas. En este trabajo evaluamos la interacción entre diferentes agonistas constrictores como el carbacol (Cch), la histamina (His) o la serotonina (5-HT) y el ATP en el tejido traqueal de cobayos sensibilizados (con ovoálbumina) y el tipo de receptor purinérgico involucrado en este fenómeno. Los resultados obtenidos en experimentos *in vitro* señalan que en el tejido traqueal, el reactivo azul 2 (RB2, 100  $\mu$ M; antagonista de los receptores P2Y), la suramina (100  $\mu$ M, antagonista inespecífico de los P2X y P2Y), y la combinación de ambos modifican significativamente la curva concentración respuesta de contracción al ATP. La adición de 1  $\mu$ M de ATP a los tejidos produjo una contracción entre 15 y 30% con respecto a la respuesta a KCl (60 mM) y la incubación posterior de los tejidos con Cch (0.032  $\mu$ M), His (0.32  $\mu$ M) o 5-HT (0.1  $\mu$ M) incrementaron significativamente la segunda contracción inducida por 1  $\mu$ M de ATP. Esta hiperreactividad inducida por los diferentes agonistas al ATP fue bloqueada por la incubación previa con la combinación de Suramina (100  $\mu$ M) y RB2 (100  $\mu$ M). Concluimos que el Cch, la His o la 5-HT inducen hiperreactividad al ATP y que el principal receptor involucrado en este fenómeno es el P2Y.

# INTRODUCCIÓN

## EL ATP COMO MEDIADOR QUÍMICO EXTRACELULAR

En 1972, Burnstock postuló que el ATP podría actuar como una señal extracelular en las respuestas mediadas por los nervios del músculo liso del tracto gastrointestinal y de la vejiga. Inicialmente, este concepto fue recibido con considerable escepticismo. Ahora se conoce que la señalización extracelular a través de purinoceptores es vital no solo para células y tejidos excitables sino también para células y tejidos no-excitables (Schwiebert y Zsembery, 2003).

El ATP sintetizado de-novo es transportado afuera de la mitocondria a través del transportador de nucleótidos de adenina. La concentración citosólica normal del ATP es de 3-10 mM, y es una fuente de energía para un sin número de reacciones metabólicas. Por otro lado, la concentración extracelular normal del ATP es 10 nM, el gradiente para la salida de ATP es aproximadamente  $10^6$  veces, por lo que el ATP puede salir con un favorable gradiente de concentración químico. Sin embargo, se puede enfatizar que sólo se requiere del 1% o menos de la poza intracelular de ATP para ser liberado y activar todos los receptores. Por lo tanto, la señalización del ATP puede ocurrir sin comprometer el metabolismo celular o las reacciones enzimáticas esenciales (Schwiebert y Zsembery, 2003).

El ATP y los nucleótidos de trifosfato liberados extracelularmente por plaquetas, células isquémicas y células inflamatorias (Káiser y col., 2002; Khakh y col., 2001; Laitinen y col., 1985) tienen efectos biológicos significativos, incluyendo la modulación de la transmisión sináptica en el sistema nervioso periférico y central, la degranulación de células cebadas, la modulación de la contracción del músculo liso vascular y visceral (Govindaraju y col., 2005).

Una vez en el espacio extracelular, el ATP activa a un grupo de receptores en la membrana celular llamados purinoreceptores (P2), los cuales han sido clonados y clasificados en dos subfamilias: P2X y P2Y (Káiser y col., 2002; Khakh y col., 2001). Los receptores P2X son canales catiónicos no selectivos permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  operados por ATP extracelular que son modulados por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$  extracelular y metales iónicos como  $\text{Zn}^{2+}$  y/o  $\text{Cu}^{2+}$ . Los receptores

P2Y<sub>1,2,4,6</sub> están acoplados a proteínas Gq heterotriméricas y fosfolipasas (principalmente a la PLCβ) que liberan Ca<sup>2+</sup> del retículo sarcoplásmico (RS) vía 1,4,5 trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) y los receptores P2Y<sub>11,13</sub> están acoplados a proteínas Gs que activan a la adenilato ciclasa; mientras que el receptor P2Y<sub>12</sub> está acoplado a la proteína Gi inhibiendo la actividad de la adenilato ciclasa (Tabla I, Ralevic y Burnstock, 1998; North, 2002; Burnstock, 2006).

**TABLA I**

<b>Familia de receptores purinérgicos</b>		
	<b>Receptores P2X</b>	<b>Receptores P2Y</b>
Ligandos naturales	ATP	ATP ADP UTP UDP
Subfamilia	P2X	P2Y
	Canales iónicos no selectivos	Acoplados a proteínas G
subtipos	P2X <sub>1-7</sub> ,	P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub> , P2Y <sub>6</sub> , P2Y <sub>11</sub> , P2Y <sub>12</sub> , P2Y <sub>13</sub>

En 1994, Fedan y col., reportaron que el ATP y sus análogos producían una respuesta de contracción dependiente de la concentración en el músculo liso traqueal de cobayo, fenómeno que ha sido corroborado en el músculo liso de la vía aérea de la rata y el humano (Mounkaïla y col., 2005).

## MECANISMO DE CONTRACCIÓN EN EL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS

La actividad de contracción y relajación del músculo liso de las vías aéreas (MLVA) está bajo control neurogénico y hormonal, siendo el efecto final la regulación de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), la cual determinará el grado de tensión a desarrollar por el músculo liso.

Existen dos mecanismos de acople excitación-contracción en el MLVA: el acople electromecánico y el farmacomecánico. El acople electromecánico opera a través del cambio en el potencial de membrana a valores más positivos (despolarización) lo que produce la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L dependientes de voltaje (VDCC) produciendo un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . (Montaño y col., 1996). Un cambio a potenciales más negativos (hiperpolarización) puede causar relajación debido a la reducción en la probabilidad de apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje y a la apertura de los canales de  $\text{K}^+$  (Somlyo y Somlyo, 1994).

El acople farmacomecánico involucra la estimulación de receptores membranales por acción directa de neurotransmisores tales como la acetil colina (ACh) que activa al receptor muscarínico  $\text{M}_3$  y la 5-HT que modula de una manera no colinérgica a través del receptor  $5\text{HT}_{2A}$ , otros autacoides como la His que activa al receptor  $\text{H}_1$ , que desencadenan toda una vía de transducción de señales que involucra a las proteínas Gq/11 (Penn y Benovic, 2008; Pype y col., 1994; Segura P y col., 2010) y la producción de segundos mensajeros, siendo el efecto final la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS por el  $\text{IP}_3$  generado por el fosfatidilinositol (Baron y col., 1984; Montaño y col., 1996; Bazán y col., 1998). Asimismo, se presenta entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a través de canales operados por receptor y por canales dependientes de voltaje tipo L (Montaño y col., 1996; Janssen y col., 1997; Fleischmann y col., 1997).

En 1993, Kajita y Yamaguchi demostraron en músculo liso traqueal de bovino la presencia de receptores a ryanodina en el RS. Es muy probable que estos receptores sean activados por el incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico favoreciendo así la liberación de este ion del RS (Endo y Lino, 1993). Asimismo, se ha

propuesto que durante el vaciamiento del RS de su contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  se produce un mecanismo adicional de entrada de este ion, conocido como entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$ , la cual pudiera estar contribuyendo al incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico inducido por un agonista (Amrani y col., 1995). Cabe destacar que todos estos mecanismos son compartidos en mayor o menor grado dependiendo del agonista broncoconstrictor utilizado.

El incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induce la unión de éste a la calmodulina, y la asociación de éste complejo ( $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina) con la subunidad catalítica de la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) activa a esta enzima para fosforilar a la serina en la posición 19 (Ser 19) de la cadena ligera de miosina de 20 kDa. Esta fosforilación permite que la ATPasa de miosina incremente su actividad y desencadene el ciclo de puentes-cruzados de miosina a través de los filamentos de actina, y en consecuencia, el músculo se contrae (Somlyo y Somlyo, 1994; Amrani y Panettieri, 1998). Esta serina 19 de la cadena ligera de la miosina es susceptible de ser desfosforilada por la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP) y en esta forma inhibir el proceso de la contracción (Somlyo y col., 1989; Kitazawa y col., 1991).

Por otro lado, la actividad de la MLCP puede ser modulada por al menos 2 mecanismos. Se ha demostrado que se requiere una mínima cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  para mantener la contracción fenómeno llamado "sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$ ", el cual involucra la participación de la Rho cinasa. La activación de la Rho cinasa da como resultado la inhibición de la MLCP inhibiendo la desfosforilación de MLCK, favoreciendo así la contracción. La actividad de la MLCP puede también ser modulada por la proteína cinasa C (PKC). La PKC se activa cuando aumenta la concentración de diacilglicerol (activador fisiológico de la PKC), por los ésteres de forbol, por agonistas que actúan a través de proteínas G (Gq) y por concentraciones micromolares de  $\text{Ca}^{2+}$ . La PKC puede inhibir directamente a la MLCP evitando la desfosforilación de la cadena ligera de la miosina y mantener la contracción, aunque la PKC tiene un papel transitorio en la regulación de la contracción (Yang y col., 1993; Somlyo y Somlyo, 2000).

Se ha propuesto que durante la contracción inducida por carbacol o serotonina se activa la MLCK vía la tirosina cinasa (TK), sugiriendo un papel importante de esta proteína durante el proceso de contracción del músculo liso traqueobronquial (Jin y col., 1996; Tolloczko y col., 2000).

Aunque los efectos de los nucleótidos de purinas han sido ampliamente investigados en los sistemas cardiovascular, urogenital, gastrointestinal y nervioso, la investigación sobre los efectos de estos compuestos en el sistema respiratorio es más reciente (Govindaraju y col., 2005, Mounkaïla y col., 2005). Se ha reportado que el ATP induce la contracción del músculo liso de las vías aéreas y un incremento en las  $[Ca^{2+}]_i$ . Muchos autores han asociado el efecto de contracción del ATP a un incremento en las  $[Ca^{2+}]_i$ ; sin embargo, la contracción inducida por ATP en la tráquea de cobayo esta relacionada con la producción de tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ) en el epitelio de la vía aérea (Flores-Soto y col., 2011) e involucra a los receptores  $P2Y_4$  y  $P2Y_6$  (comunicación personal con el Dr. Luis Manuel Montaña). Por lo tanto, la contracción inducida por ATP en la tráquea de cobayo es indirecta, la cual no involucra una estimulación directa de los receptores purinérgicos sobre el músculo liso de la vía aérea (Flores-Soto y col., 2011).

Por lo tanto, estos nucleótidos de purina, que son liberados de las células cebadas, plaquetas y epiteliales durante el proceso inflamatorio, pueden desempeñar un papel importante en la patofisiología del asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC, Oguma y col., 2007).

## ASMA

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de una alta incidencia en el ser humano, que representa un problema de salud pública y la prevalencia mundial de esta enfermedad es de aproximadamente 5-10% de la población (Bittleman y Casale, 1994). En 2007, la revista Expert Panel Report, definió al **Asma como una enfermedad inflamatoria crónica** de las vías aéreas en la que participan muchas células, en particular, células cebadas, eosinófilos, linfocitos T, macrófagos, neutrófilos y células epiteliales todas ellas capaces de liberar mediadores químicos proinflamatorios, tales como los leucotrienos (LT) B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> y D<sub>4</sub> (Barnes, 1997; Spector, 1997; Abela y Daniel, 1994), TXA<sub>2</sub> (Takata y col., 1996), factor de activación plaquetaria (PAF; Vargaftig y col., 1987; Barnes y col., 1988) y algunas citocinas, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ; Amrani y Panettieri, 1998; Pennings y col., 1998) y la interleucina 5 (IL-5; Bittleman y Casale, 1994; Petrolani y Goldman, 1996) (ver tabla II). Adicionalmente, la degranulación de las células cebadas así como, la activación de las epiteliales y las plaquetas pueden liberar simultáneamente otras sustancias potencialmente broncoconstrictoras como el ATP (Adriansen y col., 2004; Mills y col., 1968; Osipchuk y col., 1992).

En personas susceptibles, la inflamación causa **episodios recurrentes** de sibilancias, disnea, opresión torácica y tos, en especial en las noches y en las primeras horas de la mañana. Estos episodios están usualmente asociados con **obstrucción difusa y variable del flujo aéreo, que suele ser reversible**, ya sea en forma espontánea o con tratamiento. Este proceso de inflamación produce **hiperreactividad bronquial** siendo un rasgo característico de esta enfermedad. (Hargreave y col., 1981; Hargreave y col., 1986; Jeffery y col., 1989; Barnes, 1997). Esta hiperreactividad consiste en un incremento de la sensibilidad del músculo liso traqueobronquial ante estímulos físicos (aire frío, etc.) o químicos (agonistas colinérgicos, histamina, etc.). Esta situación hace que las vías aéreas respondan en forma exagerada ante estos estímulos, produciendo una disminución en su calibre y dificultando el paso del aire. Aunque este fenómeno ha

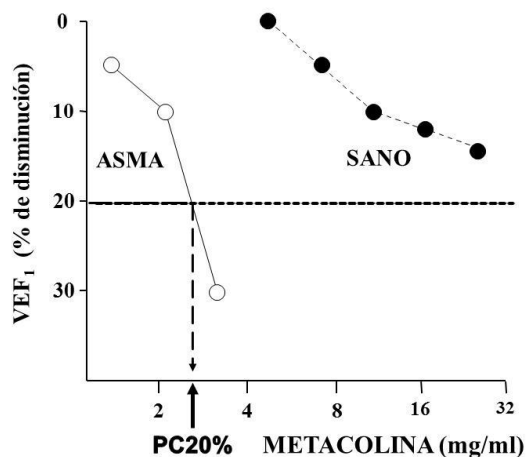


sido extensivamente estudiado, los mecanismos involucrados en su desarrollo aun no están bien comprendidos.

**TABLA II.** Mediadores químicos liberados y sus efectos.

<b>CÉLULA</b>	<b>MEDIADOR QUÍMICO</b>	<b>EFEECTO</b>
Cebada	LTC <sub>4</sub> , LTB <sub>4</sub> , TXA <sub>2</sub> , PGD <sub>2</sub> , TNF- $\alpha$ , ATP	Hiperreactividad Bronquial
	Histamina, ATP	Broncoconstricción
	PAF, PGD <sub>2</sub> , LTB <sub>4</sub> , Eotaxina	Quimiotaxis
Eosinófilo	LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub>	Hiperreactividad Bronquial
	PAF	Broncoconstricción
	Proteína básica mayor	Citotoxicidad, daño epitelial
Basófilo	LTD <sub>4</sub>	Hiperreactividad Bronquial
	Histamina	Broncoconstricción
Linfocito	Citocinas como: IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6	Regulación inmunológica
Neutrófilo	LTD <sub>4</sub> , PGD <sub>2</sub>	Hiperreactividad Bronquial
	PAF, PGD <sub>2</sub>	Quimiotaxis, hipersecreción de moco
	IL-8	Inhibe proceso inflamatorio alérgico
Macrófago	LTC <sub>4</sub> , LTB <sub>4</sub> , TXA <sub>2</sub> , PGD <sub>2</sub>	Hiperreactividad Bronquial
	PAF, IL-8	Quimiotaxis
	IL-8	Inhibe proceso inflamatorio alérgico
Epiteliales	ATP	broncoconstricción

La forma para evaluar la hiperreactividad de las vías aéreas en sujetos asmáticos es mediante espirometría forzada. Esta técnica de manera general consiste en medir el volumen y la tasa de flujo de aire que respira una persona. Los parámetros que se toman en cuenta son la capacidad vital forzada (CVF, volumen total que expulsa el paciente desde la inspiración máxima hasta la espiración máxima. Su valor normal es mayor del 80% del valor teórico) y el volumen espiratorio forzado al primer segundo (FEV<sub>1</sub>, es el volumen que se expulsa en el primer segundo de una espiración forzada. Su valor normal es mayor del 80% del valor teórico). Los pacientes sanos espiran aproximadamente el 80% de todo el aire de sus pulmones en el primer segundo durante la maniobra de CVF. Un paciente con una obstrucción de las vías respiratorias superiores tiene un VEF1% disminuido. En el caso de sujetos asmáticos la forma de realizar la espirometría es a través de la inhalación de diferentes dosis conocidas de metacolina que son previamente nebulizadas. Inicialmente se inhala solución salina nebulizada, y se mide FEV<sub>1</sub>, después de que pasaron 5 min se inhala la dosis más baja de metacolina nebulizada; las siguientes dosis de metacolina nebulizada se dan con un intervalo de 5 min entre cada una de ellas (cada dosis se duplica con respecto a la anterior). Las inhalaciones son descontinuadas cuando el FEV<sub>1</sub> ha caído el 20% (concentración provocativa 20% [PC<sub>20</sub>])) ó más, por debajo del FEV<sub>1</sub> post-salino más bajo. Por lo regular, en los pacientes asmáticos la PC<sub>20</sub> es < 8 mg/mL, mientras que en los sujetos sanos es > 16 mg/mL (Figura 1; Juniper y col., 1981; O'Byrne y Mark., 2003; Siersted y col., 2000; Cockcroft, 2010).



**Figura 1.** Cambio del FEV<sub>1</sub> inducido por diferentes dosis de metacolina inhalada en pacientes con asma con respecto a individuos sanos. El valor de PC<sub>20</sub> está calculado por interpolación de la caída en un 20% del FEV<sub>1</sub> con respecto a la curva dosis-respuesta de metacolina. La PC<sub>20</sub> en los sujetos asmáticos es mucho menor en comparación con los individuos sanos, indicando un incremento en la reactividad en las vías aéreas de los asmáticos (O'Byrne y Mark., 2003).

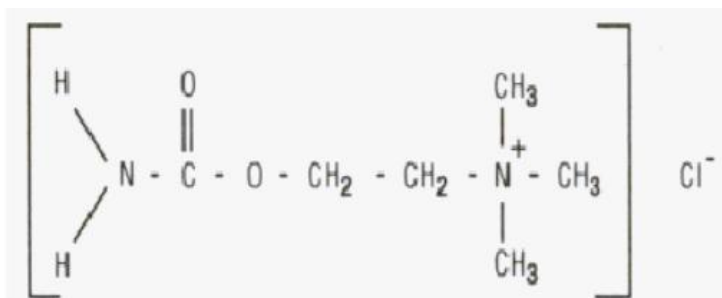
Existen numerosos trabajos relacionados con el efecto del ATP sobre el músculo liso de las vías aéreas, sin embargo, existen pocos estudios donde se evalúa el papel del ATP en el asma. En 1996, Pellegrino y col., estudiaron la función pulmonar de 8 sujetos asmáticos y 8 sanos, quienes se sometieron a una prueba de reto bronquial, bajo la inhalación de metacolina, His y ATP. De acuerdo con sus resultados, las vías aéreas de los sujetos asmáticos fueron 6400 veces más sensibles a la inhalación de ATP que los sujetos sanos (evaluado por la disminución del 15% del FEV<sub>1</sub> que provoca el reto). Además, entre los sujetos asmáticos que inhalaban ATP, este fue 51 veces más potente que la metacolina y 87 veces más potente que la His para producir la disminución de un 15% del FEV<sub>1</sub>. En el 2007, Idzko y col., observaron que durante el reto antigénico en sujetos asmáticos y en ratones con asma experimental se presentaba un incremento en las concentraciones de ATP en los lavados broncoalveolares. Asimismo, estos autores encontraron que la eosinofilia, la inflamación de las vías aéreas y la hiperreactividad bronquial desaparecían cuando se hidrolizaba al ATP con la enzima apirasa o cuando los ratones eran tratados con suramina, un antagonista no selectivo de los receptores P2. En este mismo sentido, en un

trabajo reciente del 2007 se encontró que el ATP inducía un aumento relativamente pequeño (20%) de la contracción producida por la metacolina en el músculo liso traqueal de cobayo, es decir, el ATP inducía hiperreactividad a la metacolina (Oguma y col., 2007).

## FÁRMACOS

Cloruro de carbamilcolina (carbacol), dihidrocloruro de histamina (Histamina), Hidrocloruro de serotonina (Serotonina), Sal disódica de Adenosina 5'-trifosfato (trifosfato de adenosina, ATP), reactivo azul 2 (RB2) y Sal sódica de suramina (suramina) fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, Missouri, E.U.A.).

## CARBACOL



**Figura 2.** Estructura química del cloruro de carbamil colina.

El carbacol es un carbamil ester de colina que fue sintetizado a principios de 1930. El nombre oficial del carbacol (carbamilcolina clorhidrato) es cloruro de 2-[(aminocarbonil) oxy]-N,N,N- trimethyl. El carbacol no es destruido por la colinesterasa; por esto, su acción no es aumentada por el uso de fármacos que inhiben la acción de la acetil colinesterasa (Netland, 2007). Se une a los receptores colinérgicos muscarínicos de los que se han caracterizado cinco subtipos moleculares (M<sub>1</sub> – M<sub>5</sub>). (Delgado, 2003; Rang y col., 2008).

## HISTAMINA

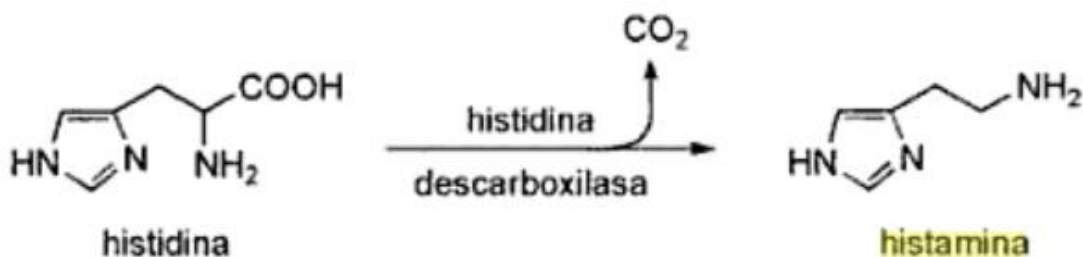


Figura 3. Biosíntesis de la histamina

La histamina es una amina básica producto de la descarboxilación del aminoácido histidina por la enzima histidina descarboxilasa. Es un constituyente natural de los tejidos, pero está presente en concentraciones elevadas en el pulmón, la piel y principalmente en el aparato digestivo. A nivel celular se encuentra en grandes cantidades en los mastocitos (aproximadamente 0.1 – 0.2 pmol/célula) y los basófilos (0.01 pmol/célula), y la histamina no procedente de los mastocitos se produce en los “histaminocitos” del estómago y las neuronas histaminérgicas del cerebro. La histamina actúa sobre los receptores H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> y H<sub>3</sub> (Rang y col., 2008; Delgado, 2003).

## SEROTONINA

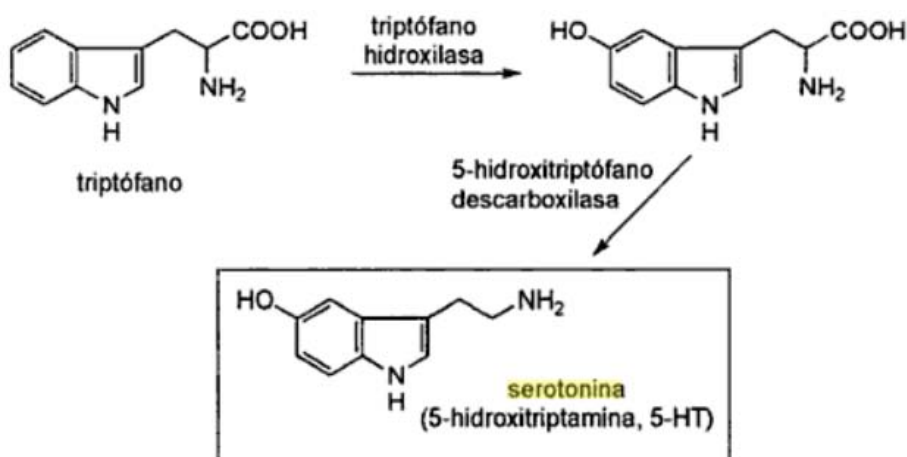
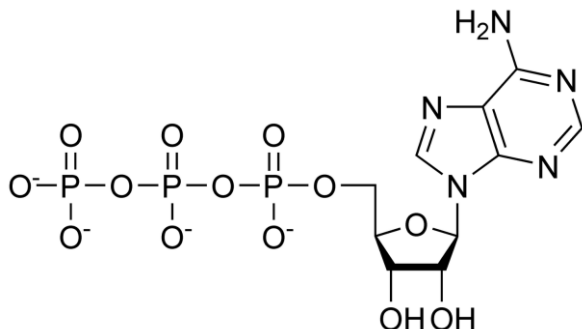


Figura 4. Biosíntesis de la 5-hidroxitriptamina

La serotonina es un neurotransmisor de amplia distribución en el organismo. Biosintéticamente proviene por hidroxilación y posterior descarboxilación del triptófano de la dieta. La serotonina se almacena en vesículas presinápticas de neuronas especializadas (serotoninérgicas), extensamente distribuidas en el sistema nervioso central. La serotonina se identificó químicamente como 5- hidroxitriptamina (5-HT) en 1948 y se demostró que se origina en las plaquetas. En el músculo liso del ser humano produce su contracción (Rang y col., 2008; Delgado, 2003). Actualmente se conocen 15 tipos de receptores que se dividen en siete clases (5-HT<sub>1-7</sub>), una de las cuales (5-HT<sub>3</sub>) es un canal iónico controlado por ligandos y el resto de ellos son receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Los efectos de 5-HT sobre el músculo liso y las plaquetas, que son conocidos desde hace muchos años, están mediados por el receptor 5-HT<sub>2A</sub>, estos receptores se acoplan a la fosfolipasa C $\beta$  y por consiguiente estimulan la formación de IP<sub>3</sub> y el aumento de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Rang y col., 2008; Delgado, 2003).

### TRIFOSFATO DE ADENOSINA



**Figura 5.** Estructura química del trifosfato de adenosina

La estructura del ATP está formada por una base nitrogenada (adenina), un monosacárido de cinco átomos de carbono (ribosa) y tres grupos fosfato. El desprendimiento por hidrólisis del fosfato terminal da lugar al ADP. (López y col., 2006).

## REACTIVO AZUL 2

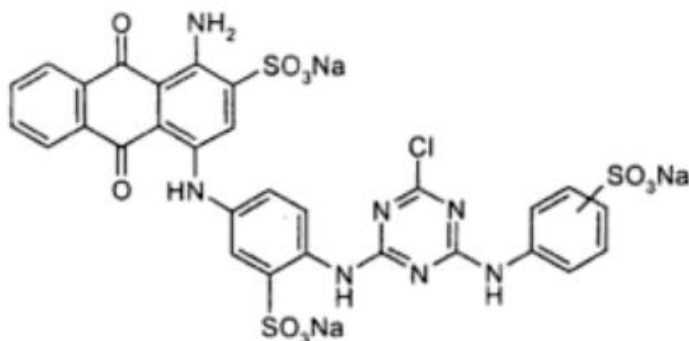


Figura 6. Estructura química del reactivo azul 2 (RB2).

El reactivo azul 2 (RB2), no es químicamente una sustancia pura, sino una mezcla isomérica de Azul Cibacron y Azul basilen, cada uno de los cuales contiene tres aros sulfonatados. RB2 es un antagonista competitivo de los purinoceptores P2Y<sub>1,4,6,11,12,13</sub> (Abbracchio y col., 2001).

## SURAMINA

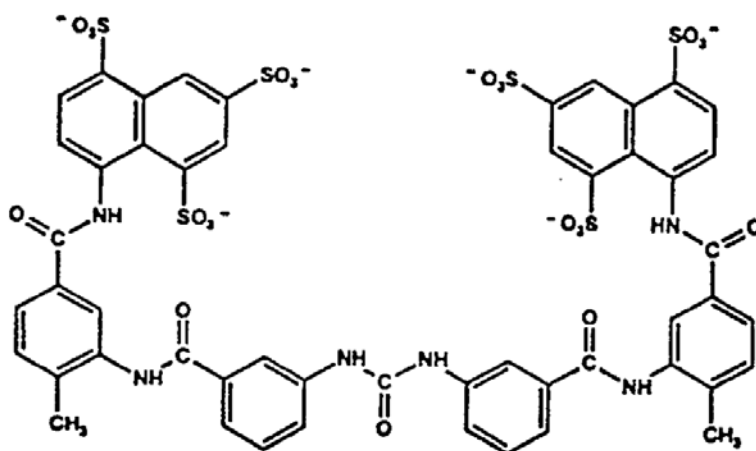


Figura 7. Estructura química de la suramina

La suramina (8-(3-benzamido-4-metilbenzamido)-naftaleno-1,3,5-ácido trisulfónico) que es un antagonista inespecífico para los receptores P2 no discrimina entre los receptores P2X y P2Y<sub>1,2,6,11,12,13</sub> (Ralevic y col., 1998). Su antagonismo es competitivo (Leff y col, 1990; Dunn y Blakeley, 1988) y además débil o inactivo con

los receptores P2Y<sub>4</sub> de humanos. Por su naturaleza altamente polar, la suramina no cruza fácilmente las membranas celulares (Ralevic y col., 1998).



## JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

En un estudio realizado en tráqueas de cobayo por Oguma y col., se observó que cuando se utilizó metacolina (1  $\mu\text{M}$ ) antes y después de la exposición a ATP (0.1, 1 y 10  $\mu\text{M}$ ), sólo las concentraciones de ATP de 1 y 10  $\mu\text{M}$  indujeron hiperreactividad a este agonista. En experimentos previos en nuestro laboratorio, reproducimos estos experimentos utilizando el mismo procedimiento que Oguma con ATP 1  $\mu\text{M}$ , y en lugar de metacolina utilizamos un análogo a este, el carbacol. La concentración que se utilizó de Cch (0.032  $\mu\text{M}$ ) fue menor a la utilizada por Oguma ya que queríamos ver si a una concentración menor, se reproducía el incremento en la respuesta de contracción de este agonista, después de la exposición de ATP 1  $\mu\text{M}$ . Posteriormente, se dio un segundo estímulo de ATP (1  $\mu\text{M}$ ) después de la segunda respuesta de Cch 0.032  $\mu\text{M}$ , con la finalidad de ver que la respuesta de contracción de ATP se conservaba. Entonces se observó que la segunda respuesta de contracción de ATP se incrementaba con respecto a la primera respuesta de ATP después de la exposición de Cch 0.032  $\mu\text{M}$ . Esto nos llevo a preguntarnos los mecanismos por los cuales el Cch induce un incremento en la respuesta de contracción generada por ATP.

Por otro lado, poco se sabe si mediadores químicos liberados por las células inflamatorias tales como la histamina y la serotonina (los cuales participan en la contracción de las vías aéreas) puedan inducir un incremento en la respuesta de contracción generada por el ATP. En este contexto se decidió también utilizar histamina (0.32  $\mu\text{M}$ ) y 5-HT (0.1  $\mu\text{M}$ ) a bajas concentraciones, al igual que el Cch, para corroborar si a estas concentraciones se induce un incremento en la respuesta de contracción del ATP.

## **HIPÓTESIS**

El carbacol, la histamina y la serotonina aumentan la respuesta de contracción al ATP vía los receptores purinérgicos P2Y.

## **OBJETIVO**

Evaluar si el carbacol, la histamina o la serotonina inducen hiperreactividad al ATP en el tejido traqueal de cobayo.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

### ***1. ESTUDIOS FUNCIONALES EN ÓRGANOS AISLADOS***

- 1.1** Evaluar la participación de los receptores a ATP en el tejido traqueal de cobayo.
- 1.2** Evaluar si el Cch, la His o la 5-HT producen un incremento en la respuesta de contracción al ATP en el tejido traqueal de cobayo.
- 1.3** Determinar si el Cch, la His o la 5-HT inducen hiperreactividad entre ellos mismos.
- 1.4** Determinar la participación de los receptores P2 en el fenómeno de hiperreactividad inducido por los diferentes agonistas al ATP mediante la combinación del RB2 (antagonista de los receptores P2Y<sub>1, 4, 6, 11, 12,13</sub>) y Suramina (antagonista de los receptores P2X<sub>1, 2, 3, 5, 7</sub> y P2Y<sub>1, 2, 6, 11, 12, 13</sub>).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### ANIMALES

Se utilizaron cobayos machos de la cepa Hartley con un peso corporal inicial de 200 g y 400 g, los cuales se mantuvieron en condiciones controladas en el bioterio: aire acondicionado filtrado, temperatura de 21°C, 50-70% de humedad y con libre acceso a alimento y agua. El protocolo fue aprobado por el Comité Científico y de Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”.

### SENSIBILIZACIÓN DE ANIMALES

Los animales que tenían un peso corporal inicial de 200 g fueron sensibilizados de la siguiente manera:

**DÍA 1.** A cada animal se le inyectó 0.5 mL por vía intraperitoneal (i.p.) y 0.5 mL por vía subcutánea, de una solución salina (0.9 % NaCl) que contiene ovoalbúmina (60 mg/mL) más  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (1 mg/mL).

**DÍA 8.** A los animales se les nebulizó con ovoalbúmina (3mg/mL) durante 5 min. Se utilizó un nebulizador ultrasónico (modelo US-1 Puritan Bennett, Carlsbad, CA.).

**DÍA 15.** A los animales se les nebulizó con ovoalbúmina (1mg/mL) durante 10 seg.

**DÍA 21.** En este día se usaron los animales para iniciar los experimentos en órganos aislados.

La sensibilización de los cobayos se confirmó cuando los animales presentaron broncoespasmo, posterior al reto antigénico. Este método de sensibilización ha sido validado en nuestro laboratorio (Campos-Bedolla y col., 2008; Segura P y col., 2010).

## ÓRGANOS AISLADOS.

Los animales no sensibilizados y sensibilizados se sacrificaron por una sobredosis de pentobarbital sódico y fueron exanguinados. Se obtuvo la tráquea de cada animal que fue finamente disecada y limpiada del exceso de tejido conjuntivo y tejido adiposo con un microscopio estereoscópico. De cada tráquea se obtuvieron 9 segmentos de 4 anillos traqueales.

Cada uno de los segmentos obtenidos se colocó en una cámara de órganos aislados conteniendo 5 ml de solución de Krebs bicarbonatada de la siguiente composición (mM): NaCl 118, NaHCO<sub>3</sub> 25, KCl 4.6, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 2 y glucosa 11. Se mantuvieron a una temperatura de 37 °C con un burbujeo constante de una mezcla de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> a un pH 7.4. Los tejidos fueron atados a un transductor de tensión isométrica (modelo FT03, Grass Instruments, Rhode Island, E.U.A.) conectado a un amplificador-condicionador programable de señales (CyberAmp 380, Axon Instruments, California, E.U.A.), que a su vez estaba conectado a un convertidor analógico digital (Digidata 1200<sup>a</sup>, Axon Instruments). La tensión isométrica fue registrada, almacenada y analizada en una microcomputadora y los datos procesados mediante un programa de Axoscope v. 7.0 (Axon, California, E.U.A.).

Las preparaciones se mantuvieron en reposo durante 30 min a una tensión de 1 g antes de iniciar los experimentos. Con el propósito de normalizar las respuestas de los tejidos, se estimularon tres veces con KCl (60 mM) durante 20 min hasta alcanzar la respuesta máxima. Posteriormente, los tejidos fueron estimulados con 1 mM de ATP, para solo utilizar aquellas preparaciones que respondían a ATP. Una vez que los tejidos respondieron a ATP 1mM, se construyeron curvas acumulativas concentración-respuesta añadiendo a la cámara de órganos aislados concentraciones crecientes de ATP (1 a 320 μM). Otro grupo de tejidos se incubaron con el RB2 (antagonista del receptor P2Y<sub>1,4,6,11,12,13</sub>; 100 μM; Abbracchio y col., 2001) durante 60 min y con Suramina (antagonista del receptor P2X<sub>1,2,3,5,7</sub> y P2Y<sub>1,2,6,11,12,13</sub>; 100 μM; Ralevic y col., 1998) durante 15 min, así como la combinación RB2 (100 μM) y Suramina (100 μM) antes de la curva acumulativa concentración-respuesta a ATP.

Para los siguientes experimentos se seleccionó la concentración de ATP (1 $\mu$ M) que produjera una respuesta de contracción mínima (25.22  $\pm$  7.72 % de KCl 60 mM), en estos experimentos se utilizaron tráqueas de animales no sensibilizados y sensibilizados a las que se les administró un primer estímulo de ATP 1  $\mu$ M después de 60 min se estimuló una segunda vez con ATP 1  $\mu$ M (grupo control); en los grupos experimentales se estimuló previamente con el Cch (0.032  $\mu$ M), la His (0.32  $\mu$ M) o la 5-HT (0.1  $\mu$ M) antes del segundo estímulo a ATP (1  $\mu$ M). Para descartar que el Cch, la His o la 5-HT produjeran hiperreactividad entre ellos mismos, a los anillos traqueales de animales sensibilizados se les dio un primer estímulo de Cch (0.032  $\mu$ M), de His (0.32  $\mu$ M) o de 5-HT (0.1  $\mu$ M) y después de 60 min se les administró un segundo estímulo de Cch (0.032  $\mu$ M), de His (0.32  $\mu$ M) o de 5-HT (0.1  $\mu$ M) como controles. Las concentraciones utilizadas fueron aquellas que nos aseguraron una respuesta visible (contracción) de que se estaban activando las vías de señalización respectivas de los agonistas. Los grupos experimentales se estimularon de acuerdo a la siguiente tabla:

**TABLA III.** Diseño experimental para evaluar si el Cch, la His o la 5-HT inducen hiperreactividad entre ellos.

	1er estímulo	60 min	2do estímulo
control	Cch		Cch
	Cch	His	Cch
	Cch	5-HT	Cch
control	His		His
	His	Cch	His
	His	5-HT	His
control	5-HT		5-HT
	5-HT	Cch	5-HT
	5-HT	His	5-HT

Las respuestas de contracción al ATP, el Cch, la His y a la 5-HT fueron expresadas como porcentaje de respuesta al tercer estímulo de KCl (60 mM).

Para determinar la participación de los receptores P2 en este fenómeno de hiperreactividad, se utilizaron tráqueas de animales sensibilizados únicamente, ya que los resultados obtenidos previamente nos indicaban que no había diferencias significativas si utilizábamos animales no sensibilizados o sensibilizados. A los grupos control se les dio un primer estímulo con ATP 1  $\mu$ M, después de 20 min se les estimuló con el Cch (0.032  $\mu$ M), la His (0.32  $\mu$ M) o la 5-HT (0.1  $\mu$ M) y posteriormente se les administró un segundo estímulo a ATP (1  $\mu$ M). Siguiendo el protocolo anterior, los grupos experimentales se incubaron con la combinación de RB2 (100  $\mu$ M) y suramina (100  $\mu$ M) después del primer estímulo con ATP (1  $\mu$ M). Las respuestas de contracción del ATP se expresaron como porcentaje de la primera respuesta de ATP 1  $\mu$ M.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos se evaluaron mediante la prueba t de Student pareada. También se utilizó análisis de varianza y la prueba de Dunnett. Los valores  $p < 0.05$  bimarginal fueron considerados estadísticamente significativos. Los valores de "n" representan el número de cobayos en cada experimento. Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  error estándar.

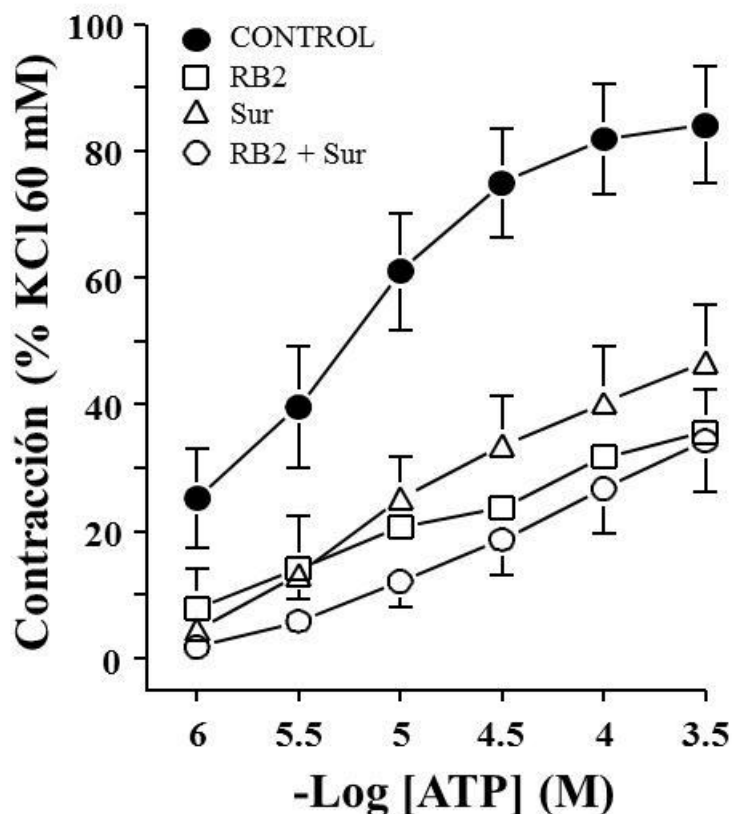
## RESULTADOS

### 1. ESTUDIOS EN ÓRGANOS AISLADOS

#### Evaluación farmacológica de los receptores de ATP en la tráquea de cobayo.

En estos experimentos se obtuvieron 8 ó 9 segmentos de 4 anillos traqueales de cobayo y se realizaron curvas concentración-respuesta acumulativas para el ATP (1 a 320  $\mu$ M). Encontramos que la administración de ATP (1 a 320  $\mu$ M; n=8) produjo una respuesta de contracción que fue dependiente de la concentración (Figura 8).

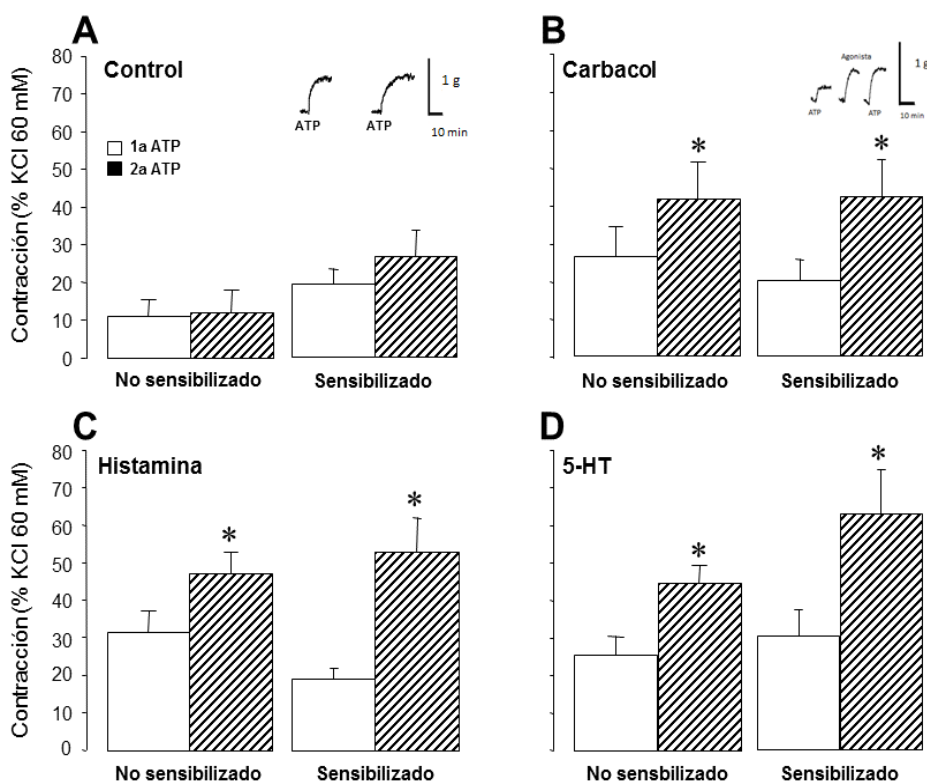
De esta curva se seleccionó la concentración de ATP (1 $\mu$ M) que produjo una respuesta mínima de contracción ( $25.22 \pm 7.72$  % de KCl 60 mM) para la realización de los siguientes experimentos.



**Figura 8.** Curva concentración-respuesta acumulativa al ATP en anillos de tráquea de cobayo (n=8). Efecto de RB2 (antagonista de los receptores P2Y<sub>1,4,6,11,12,13</sub>, 100  $\mu$ M; n=6), suramina (Sur, antagonista de los receptores P2Y<sub>1,2,6,11,12,13</sub>, 100  $\mu$ M; n=8) y la combinación de RB2 (100  $\mu$ M) + Sur (100  $\mu$ M, n=8) sobre la respuesta de contracción al ATP. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  error estándar.

### Efecto del Cch, la His o la 5-HT sobre la respuesta de contracción del ATP en el tejido traqueal de cobayos no sensibilizados y sensibilizados

En estos experimentos encontramos que el ATP ( $1\mu\text{M}$ ) por sí solo no induce un incremento en la contracción en segundo estímulo de ATP ( $1\mu\text{M}$ , Figura 9A). Sin embargo, cuando los tejidos fueron estimulados previamente con el Cch ( $0.032\mu\text{M}$ ), la His ( $0.32\mu\text{M}$ ) o la 5-HT ( $0.1\mu\text{M}$ ), observamos que estos agonistas inducen un incremento en la segunda respuesta de ATP ( $1\mu\text{M}$ ) que fue estadísticamente significativa comparado con el grupo control ( $*p < 0.05$ , Figura 9B, 9C y 9D). En los animales sensibilizados la segunda respuesta de contracción al ATP fue de 211%, 279% y 245% en base a la primera respuesta de ATP, respectivamente para el Cch, la His y la 5-HT; mientras que en los no sensibilizados la segunda respuesta de contracción a ATP fue de 158%, 150% y 176%. Como se ve, este incremento en la respuesta de contracción al ATP fue similar para los animales no sensibilizados ( $n=4-8$ ) como para los sensibilizados ( $n=13-14$ ).

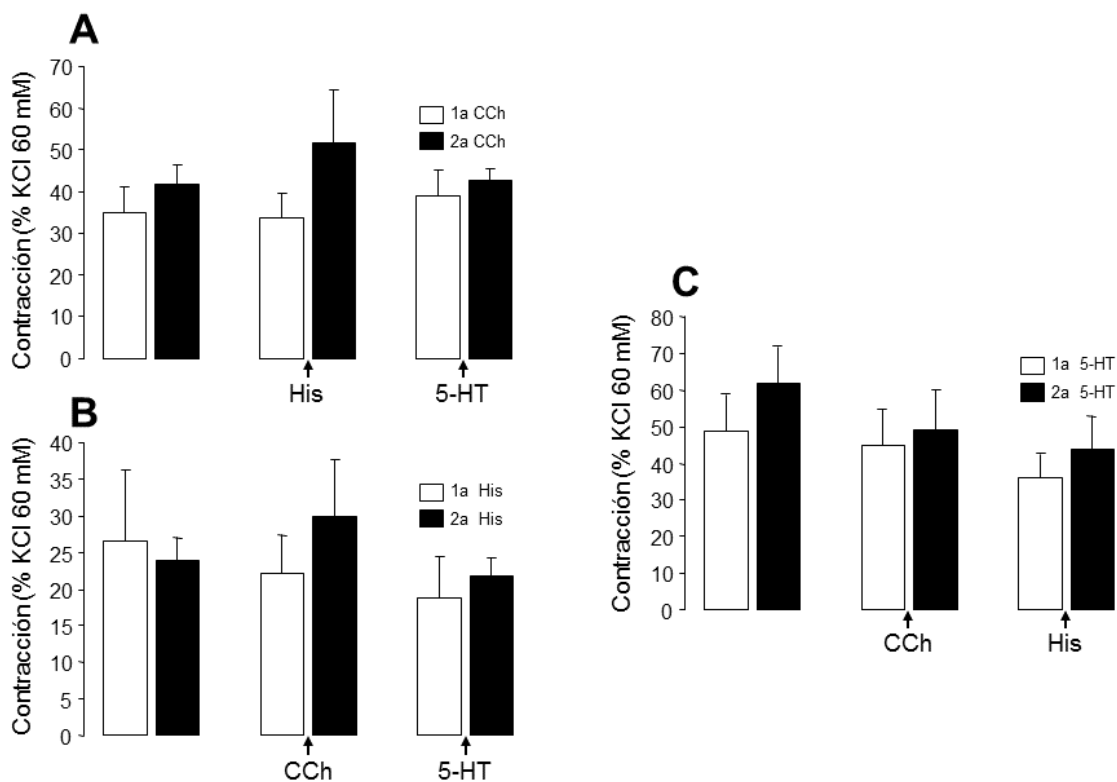


**Figura 9.** Diferentes agonistas inducen hiperreactividad en la respuesta de contracción al ATP. A) ATP ( $1\mu\text{M}$ , control), B) efecto del Cch ( $0.032\mu\text{M}$ ), C) efecto de la His ( $0.32\mu\text{M}$ ) y D) efecto de la 5-HT ( $0.1\mu\text{M}$ ) sobre la segunda respuesta de contracción al ATP ( $1\mu\text{M}$ ), en el tejido traqueal de cobayos no sensibilizados ( $n=4-8$ ) y sensibilizados ( $n=13-14$ ). Se utilizó una t de Student pareada con una  $*p < 0.05$ . Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar.



## El Cch, la His y la 5-HT no inducen hiperreactividad sobre ellos mismos en animales sensibilizados.

Por otro lado, se realizaron experimentos para descartar que el Cch, la His o la 5-HT produjeran hiperreactividad entre ellos mismos.



**Figura 10.** A) Efecto de la His ( $0.32 \mu\text{M}$ ,  $n=7$ ) y la 5-HT ( $0.1 \mu\text{M}$ ,  $n=7$ ) sobre la contracción inducida por el Cch ( $0.032 \mu\text{M}$ ,  $n=6$ ). B) Efecto del Cch ( $0.032 \mu\text{M}$ ,  $n=7$ ) y de la 5-HT ( $0.1 \mu\text{M}$ ,  $n=7$ ) sobre la contracción inducida por la His ( $0.32 \mu\text{M}$ ,  $n=6$ ). C) Efecto del Cch ( $0.032 \mu\text{M}$ ,  $n=7$ ) y la His ( $0.32 \mu\text{M}$ ,  $n=7$ ) sobre la contracción inducida por la 5-HT ( $0.1 \mu\text{M}$ ,  $n=6$ ), en el tejido traqueal de cobayos sensibilizados. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar.

Encontramos que cuando se utilizó el Cch ( $0.032 \mu\text{M}$ ,  $n=6$ ), la segunda respuesta de contracción generada por el Cch fue similar a la primera respuesta de este agonista (control). Cuando se estimuló previamente con la His ( $0.32 \mu\text{M}$ ,  $n=7$ ) o la 5-HT ( $0.1 \mu\text{M}$ ,  $n=7$ ), la segunda respuesta de contracción al Cch no fue significativamente diferente al primer estímulo (Figura 10A). También observamos

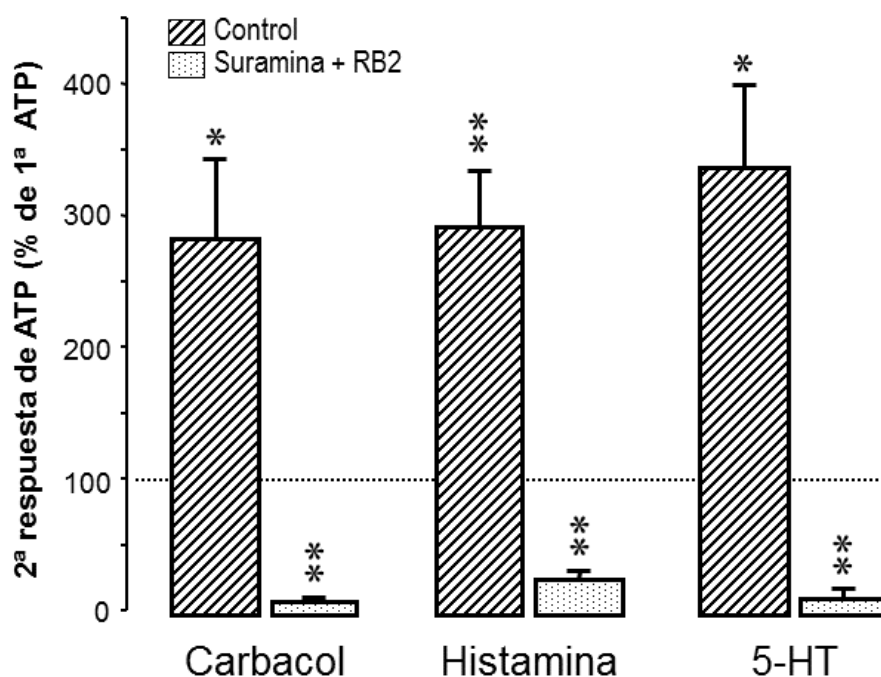
que cuando se administró a los anillos traqueales la His (0.32  $\mu\text{M}$ , n=6), el segundo estímulo de este agonista fue similar a la primera respuesta de contracción (control). Cuando se estimuló a los tejidos previamente con el Cch (0.032  $\mu\text{M}$ , n=7) o la 5-HT (0.1  $\mu\text{M}$ , n=7), tampoco hubo diferencias entre la primera y segunda respuesta contráctil generada por la His (0.32  $\mu\text{M}$ , Figura 10B). En cuanto a la 5-HT (0.1  $\mu\text{M}$ , n=6), se observó que la primera y la segunda respuesta de contracción con este agonista fueron similares (control). Cuando se estimuló al tejido traqueal previamente con el Cch (0.032  $\mu\text{M}$ , n=7) o la His (0.32  $\mu\text{M}$ , n=7), estos agonistas no modificaron la segunda respuesta de contracción al 5-HT (Figura 10C). Estos resultados sugieren que ninguno de estos agonistas (el Cch, la His o la 5-HT) induce hiperreactividad entre ellos mismos.

#### **Participación de los receptores P2Y en el fenómeno de hiperreactividad inducido por el Cch, la His o la 5-HT en el tejido traqueal de cobayos sensibilizados.**

Evaluamos farmacológicamente la presencia del receptor P2 en este tejido mediante el uso de dos antagonistas de estos receptores, el RB2 (antagonista del receptor P2Y<sub>1,4,6,11,12,13</sub>; 100  $\mu\text{M}$ , n=6) y la Suramina (antagonista del receptor P2Y<sub>1,2,6,11,12,13</sub>; 100  $\mu\text{M}$ , n=8), así como la combinación de ambos antagonistas (RB2 100  $\mu\text{M}$  y suramina 100  $\mu\text{M}$ , n=8), sobre la curva concentración-respuesta acumulativa al ATP (1 - 320  $\mu\text{M}$ ). Como se puede observar en la Figura 8, ni el RB2 ni la suramina disminuyen al 100% la respuesta de contracción al ATP a una concentración 1  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, la combinación RB2 (100  $\mu\text{M}$ ) y suramina (100  $\mu\text{M}$ ) abatió completamente la respuesta de contracción del ATP a 1  $\mu\text{M}$ . Estos hallazgos nos sugieren la presencia del receptor P2Y en el tejido traqueal.

De acuerdo a estos resultados, se decidió utilizar la combinación RB2 (100  $\mu\text{M}$ ) y suramina (100  $\mu\text{M}$ ), en el fenómeno de hiperreactividad inducido por el Cch (0.032  $\mu\text{M}$ , n=5), la His (0.32  $\mu\text{M}$ , n=7) o la 5-HT (0.1  $\mu\text{M}$ , n=6) sobre el segundo estímulo de ATP (1  $\mu\text{M}$ ). Encontramos que la combinación de suramina (100  $\mu\text{M}$ ) y RB2 (100  $\mu\text{M}$ ) anuló casi por completo la hiperreactividad inducida por el Cch

(n=4), la His (n=6) o la 5-HT (n=6) sobre la segunda respuesta de contracción del ATP (Figura 11), corroborando que este fenómeno es mediado por los receptores P2Y. La respuesta de contracción en estos experimentos se expresó como porcentaje de la primera respuesta de ATP obtenida.



**Figura 11.** El receptor P2Y participa en el incremento de la segunda respuesta contráctil del ATP ( $1\mu\text{M}$ ) inducida por el el Cch ( $0.032\mu\text{M}$ ,  $n=5$ ), la histamina ( $0.32\mu\text{M}$ ,  $n=7$ ) y el 5-HT ( $1\mu\text{M}$ ,  $n=6$ ) y el 5-HT ( $1\mu\text{M}$ ,  $n=6$ ). Efecto de la combinación de los antagonistas RB2 ( $100\mu\text{M}$ ) y suramina ( $100\mu\text{M}$ ), para el Cch ( $0.032\mu\text{M}$ ,  $n=4$ ), la histamina ( $0.32\mu\text{M}$ ,  $n=5$ ) y la 5-HT ( $1\mu\text{M}$ ,  $n=6$ ). Se utilizó la prueba de Dunnett con una  $*p<0.05$  y  $**p<0.01$ . Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar

## DISCUSIÓN

Desde hace muchos años, ha sido bien documentado en diferentes especies, incluyendo humanos, que el ATP induce contracción del músculo liso de las vías aéreas e incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Bergner y Sanderson, 2002; Fedan y col., 1994; Kamikawa y col., 1976; Michoud y col., 1999; Mounkaïla y col., 2005). Muchos autores han asociado el efecto contráctil del ATP a un incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ ; sin embargo, la contracción inducida por ATP en la tráquea de cobayo se ha reportado estar relacionada con la producción de  $TXA_2$  mediada por purinoceptores sobre el epitelio de las vías aéreas (Adriaensen y col., 2004; Gerthoffer y col., 1977; Flores-Soto y col., 2011). Govindaraju y col., (2005) y Mounkaïla y col., (2005), encontraron en células de músculo liso y bronquio de humano así como en anillos traqueales de rata, que la contracción inducida por ATP es dependiente de la concentración utilizada. Recientemente Flores-Soto y col., (2011) utilizando anillos traqueales de cobayo obtuvieron resultados similares. En este contexto, nosotros también encontramos que la contracción del músculo liso traqueal de cobayos era dependiente de la concentración de ATP, los cuales fueron similares a los obtenidos por estos autores (Figura 8). Además estos autores, demostraron que el ATP no solo induce contracción del músculo liso de la vía aérea sino también un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ . Sus experimentos sugieren que la contracción es mediada por la liberación de  $TXA_2$  por la activación de los receptores P2Y en el epitelio de la vía aérea, ya que cuando usaron tráqueas de cobayo sin epitelio o con indometacina se bloqueó la contracción por ATP; y que el incremento en las  $[Ca^{2+}]_i$  se debe a la activación de los receptores P2X y P2Y en el músculo liso.

También encontramos que esta contracción es principalmente mediada por los receptores P2Y, ya que cuando utilizamos la combinación RB2 (antagonista del receptor P2Y<sub>1,4,6,11,12,13</sub>; 100  $\mu$ M) y Suramina (antagonista del receptor P2X y P2Y<sub>1,2,6,11,12,13</sub>; 100  $\mu$ M), disminuyó notablemente la contracción inducida por ATP, en comparación de cuando se utilizó únicamente RB2 o Suramina (Figura 8).

En trabajos recientes en nuestro laboratorio, utilizando microscopia confocal se encontró que en tráqueas de cobayos sensibilizados hay una mayor fluorescencia de los receptores P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>6</sub> en el epitelio de la vía aérea, esto fue corroborado con la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), donde se encontró el incremento en la expresión de estos dos receptores (no reportado).

Los mecanismos inducidos por el ATP para producir contracción han sido ampliamente estudiados. Sin embargo, hasta la fecha todos los trabajos de investigación se han enfocado en explorar si el ATP induce hiperreactividad de las vías aéreas a otros agonistas.

En 1996, Pellegrino y col. al estudiar la función pulmonar de sujetos asmáticos mediante la prueba de reto bronquial encontraron que estos pacientes eran más sensibles a la inhalación de ATP > metacolina > His, que en los pacientes sanos (evaluado por la disminución del 15% del FEV<sub>1</sub> que provoca el reto al ATP). Por otro lado, Idzko y col. (2007) encontraron que en los lavado broncoalveolares de sujetos asmáticos y ratones sensibilizados hay un incremento en la concentración de ATP y que el proceso de inflamación, la eosinofilia y la hiperreactividad bronquial desaparecían cuando se hidrolizaba al ATP.

Nosotros encontramos que el Cch, la His y la 5-HT producen un incremento en la segunda respuesta de contracción inducida por una concentración de ATP (1 μM, Figura 9), es decir, inducen hiperreactividad a esta purina. Este hallazgo es novedoso ya que no existen reportes previos relacionados a este fenómeno. En los cobayos sensibilizados se observó una mayor hiperreactividad que en los no sensibilizados, una posible explicación a esto es que durante el estímulo al ATP o a los agonista, los animales sensibilizados liberan sustancias o mediadores químicos que inducen la hiperreactividad per-se como el LTD<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>, TXA<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, TNF-α, los cuales estarían aumentando la contracción del MLVA generada indirectamente por el ATP.

El hecho de que estos agonistas indujeran un incremento en la contracción inducida por ATP (1μM), nos llevó a pensar si estos son capaces de inducir

hiperreactividad entre ellos mismos. Encontramos que ninguno de estos agonistas (el Cch, la His o la 5-HT) inducen este fenómeno entre ellos mismos (Figura 10).

Por otro lado, pensamos que la hiperreactividad inducida por estos agonistas en la respuesta de contracción de ATP esta, probablemente, mediada por los receptores P2Y del epitelio, P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>6</sub> como antes habíamos comentado, ya que la combinación de RB2 y Suramina disminuyeron significativamente esta respuesta (Figura 11). Los receptores P2Y del músculo liso no parecen tener un papel importante en el fenómeno de contracción ya que se ha demostrado que son los responsables de la relajación del músculo liso (Montaño y col., 2011), mientras que los P2X del músculo liso tienen el papel de rellenar con Ca<sup>2+</sup> el retículo sarcoplásmico (Flores-Soto y col., 2011), por lo tanto, los receptores P2X y P2Y del músculo liso no parecen participar en la hiperreactividad inducida por los agonistas al ATP.

El mecanismo por el cual el ATP induce la contracción del MLVA es porque el ATP activa los receptores P2Y, acoplados a proteínas G<sub>q</sub>, de epitelio de la vía aérea, produciendo segundos mensajeros como IP<sub>3</sub> y DG que aumentan la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, activando a la fosfolipasa A (dependiente de Ca<sup>2+</sup>), logrando que esta libere ácido araquidónico. Posteriormente, la ciclooxigenasa 1 (COX-1, constitutiva) producirá endoperóxidos cíclicos, que son metabolizados por la tromboxano sintasa en TXA<sub>2</sub> (Boeynaems y Pearson, 1990); este será liberado al exterior celular provocando la contracción en el músculo liso de la vía aérea mediante su receptor específico.

Se ha reportado que algunas sustancias como el 17 β-estradiol inducen la producción de TXA<sub>2</sub> por un aumento en la expresión de la COX-2 en el músculo liso vascular de la rata (Li y col., 2008). En vista de que la respuesta de contracción inducida por ATP es indirecta, mediante la producción de TXA<sub>2</sub> en el epitelio, es probable que los agonistas vía sus receptores en epitelio del MLVA, produzcan la sobreexpresión de la COX-2 (inducible), ocasionando que en el segundo estímulo con ATP exista una mayor cantidad de enzima para generar los endoperóxidos cíclicos y a su vez TXA<sub>2</sub>, provocando una mayor respuesta de contracción que la primera.

El concepto de que agonistas broncoconstrictores inducen hiperreactividad al ATP es nuevo y podría ser relevante en la fisiopatología del asma así como para obtener mejores alternativas terapéuticas contra esta enfermedad.

## CONCLUSIONES

- Corroboramos que el ATP induce contracción del músculo liso traqueal de cobayo vía receptores purinérgicos P2Y.
- El Cch, la His y la 5-HT aumentan la respuesta de contracción producida por el ATP.
- Cch, His y 5-HT no inducen hiperreactividad entre ellos mismos.
- El aumento en la respuesta de contracción al ATP (generada por el Cch, la His o la 5-HT) se lleva a cabo vía los receptores purinérgicos P2Y.

## REFERENCIAS

Abbracchio MP, Williams M. Purinergic and pyrimidinergic signalling I Molecular, Nervous and Urogenitary System Function. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001 p.157

Abela A, Daniel EE. Neural and myogenic effects of leukotrienes C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, and E<sub>4</sub> on canine bronchial smooth muscle. *Am J Physiol* 266 (10): L414-L425, 1994.

Adriaensen D, Timmermans JP. Purinergic signalling in the lung: important in asthma and COPD? *Curr Opin Pharmacol* 4:207-14, 2004.

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

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

Baron CB, Cunningham M, III Straus JF, Coburn RF. Pharmacomechanical coupling in smooth muscle may involve phosphatidylinositol metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6899-6903, 1984.

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

Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory mediators and asthma. *Pharmacol Rev* 40: 49-83, 1988.

Barnes PJ. Histamine and serotonin. *Pulm Pharmacol Ther* 14:329-339, 2001.

Bazán-Perkins B, Carbajal V, Sommer B, Macías-Silva M, Gonzalez-Martinez M, Valenzuela F, Daniel EE, Montaña LM. 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* 358:567-73, 1998.

Bergner A, Sanderson MJ. ATP stimulates Ca<sup>2+</sup> oscillations and contraction in airway smooth muscle cells of mouse lung slices. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L1271–L1279, 2002.

Bittleman DB, Casale TB. Allergic Models and Cytokines. *Am J Respir Crit Care Med* 150: S72-6, 1994.

Boeynaems J, Pearson JD. P2 purinoceptors on vascular endothelial cells: physiological significance and transduction mechanisms. *TiPS* 11: 34-37, 1990.



Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*, 24: 509-81, 1972.

Burnstock G. Purinergic signalling. *British Journal of Pharmacology*, 147: S172-S181, 2006.

Campos-Bedolla P, Vargas MH, Segura P, Carbajal V, Calixto E, Figueroa A, Flores-Soto E, Barajas-López C, Mendoza-Patiño N, Montañó LM. Airway smooth muscle relaxation induced by 5-HT<sub>2A</sub> receptors: Role of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Life Sciences* 83: 438-446, 2008.

Charlotte KB, Raymond BP. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respir Res* 4 (2), 2003.

Cockcroft DW. Direct challenge test: Airway hiperresponsiveness in asthma: Its measurement and clinical significance. *Chest* (138): 18S-24S, 2010.

Delgado A, Minguillón C, Joglar J. Introducción a la química terapéutica. 2<sup>o</sup> Edición, ilustrada. España: Ediciones Díaz de Santos, 2003 p.338

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

Dunn PM, Blakeley AGH. Suramin: a reversible P<sub>2</sub>-prunoceptor antagonist in the mouse vas deferens. *Br J Pharmacol* 93: 243-245, 1988.

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

Fedan JS, Stem JL, Day B. Contraction of the guinea pig isolated, perfused trachea to purine and pyrimidine agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 268(3):1321-7, 1994.

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

Flores-Soto Edgar. (2011). En el músculo liso de las vías aéreas el ATP favorece la entrada de Ca<sup>2+</sup> al retículo sarcoplásmico vía receptores P2X e induce contracción a través de receptores P2Y epiteliales. (Tesis de Doctorado – UNAM)

Flores-Soto E, Carbajal V, Reyes-García J, García-Hernández LM, Figueroa A, Checa M, Barajas-López C, Montañó L. In airways ATP refills sarcoplasmic reticulum via P2X smooth muscle receptors and induces contraction through P2Y epithelial receptors. *Eur J of Physiol* 461:261- 275 , 2011

Gerthoffer WT, Yamboliev IA, Pohl J, Haynes R, Dang S, McHugh J. Activation of MAP kinases in airway smooth muscle. *Am J Physiol* 272: L244-52, 1977.

Govindaraju V, Martin J G, Maghni K, Ferraro P, Michoud M. The effects of extracellular purines and pyrimidines on human airway smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 315(2): 941-8, 2005.

Hargreave FE, Dolovich J, O'byrne PM, Ramsdale H, Daniel EE. The origin of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 78 : 825-832, 1986.

Hargreave FE, Ryan G, Thomson NC, O'byrne PM, Latimer K, Juniper EF, Dolovich H. Bronchial responsiveness to histamine or methacoline in asthma: measurement and clinical significance. *Eur J Respir Dis Suppl* 121:79-88, 1981.

Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, Kool M, Willart MA, Muskens F, Hoogsteden HC, Luttmann W, Ferrari D, Di Virgilio F, Virchow JC Jr, Lambrecht BN. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat Med* 13:913-9, 2007.

Janssen LJ. Acetylcholine and caffeine activate  $Cl^-$  and suppress  $K^+$  conductance in human bronchial smooth muscle. *Am J Physiol* 270: L772-L781, 1996.

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

Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson F, Collins JV, Kay AB. Bronchial biopsies in asthma. An ultra structural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 140: 1745-1753, 1989.

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

Juniper EF, Frith PA, Hargreave FE. Airway responsiveness to histamine and methacholine: relationship to minimum treatment to control symptoms of asthma. *Torax* 36: 575-579, 1981.

Kaiser RA, Oxhorn BC, Andrews G, Buxton ILO. Functional compartmentation of endothelial P2Y receptor signaling. *Circulation Research* 91: 292-9, 2002.

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

Kamikawa Y, Shimo Y. Mediation of prostaglandin E2 in the biphasic response to ATP of the isolated tracheal muscle of guinea-pigs. *J Pharm Pharmacol* 28:294-297, 1976.

Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Seguela P, Voigt M, Humphrey PP. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 53:107-18, 2001.

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

Laitinen LA, Heino M, Laitinen A, Kava T, Haahtela T. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 131:599-606, 1985.

Leff P, Wood BE, O'Connor SE. Suramin is a slowly-equilibrating but competitive antagonist at P2x-receptors in the rabbit isolated ear artery. *Br J Pharmacol* 101(3):645-649, 1990.

Li M, Kuo L, Stallone JN. Estrogen potentiates constrictor prostanoid function in female rat aorta by upregulation of ciclooxigenase-2 and thromboxane pathway expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H2444-H2455, 2008.

López CJ, Fernández VA. *Fisiología del ejercicio*. 3º Edición. Editorial médica panamericana, 2006 p.989

Michoud MC, Tao FC, Pradhan AA, Martin JG. Mechanisms of the potentiation by adenosine of adenosine triphosphate-induced calcium release in tracheal smooth-muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21:30–36, 1999.

Mills DC, Robb IA, Roberts GC. The release of nucleotides, 5-hydroxytryptamine and enzymes from human blood platelets during aggregation. *J Physiol* 195:715-29, 1968.

Montaño LM, Barajas-Lopez C, Daniel EE. Canine bronchial sustained contraction in  $Ca^{2+}$ -free medium: role of intracellular  $Ca^{2+}$ . *Can J Physiol Pharmacol* 74:1236-48, 1996.

Montaño LM, Carbajal V, Arreola JL, Barajas-Lopez C, Flores-Soto E, Vargas MH. Acetylcholine and tachykinins involvement in the caffeine-induced biphasic change in intracellular  $Ca^{2+}$  in bovine airway smooth muscle. *Br J Pharmacol* 139:1203-11, 2003.

Montaño LM, Cruz-Valderrama JE, Figueroa A, Flores-Soto E, García-Hernández LM, Carbajal V, Méndez C, Días V, Barajas-López C. Characterization of P2Y receptors mediating ATP induces relaxation in guinea pig airway smooth muscle: involvement of prostaglandins and K channels. *Eur J Physiol*, 462(4):573-85, 2011.

Mounkaïla B, Marthan R, Roux E. Biphasic effect of extracellular ATP on human and rat airways is due to multiple P2 purinoceptor activation. *Respir Res* 6: 143, 2005.

North RA, Surprenant A. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:563-80, 2000.

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

Netland PA. Glaucoma medical therapy: principles and management. 2<sup>o</sup> Edición, ilustrada. Editorial Oxford University Press, 2007 p.116

Oguma T, Ito S, Kondo M, Makino Y, Shimokata K, Honjo H, Kamiya K, Kume H. Roles of P2X receptors and Ca<sup>2+</sup> sensitization in extracellular adenosine triphosphate-induced hyperresponsiveness in airway smooth muscle. *Clin Exp Allergy* 37:893-900, 2007.

Osipchuk Y, Cahalan M. Cell-to-cell spread of calcium signals mediated by ATP receptors in mast cells. *Nature* 359:241-4, 1992.

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

O'Byrne PM, Mark DI. Airway Hyperresponsiveness. *Chest*. 123: 411S-416S, 2003.

Pellegrino R, Wilson O, Jenouri G, Rodarte JR. Lung mechanics during induced bronchoconstriction. *J Appl Physiol* 81:964-75, 1996.

Penn RB, Benovic JL. Regulation of heterotrimeric G protein signaling in airway smooth muscle. *Proc Am Thorac Soc* 5: 47.57, 2008.

Pennings HJ, Kramer K, Bast A, Buurman WA and Wouters EFM. Tumour necrosis factor- $\alpha$  induces hyperreactivity in tracheal smooth muscle of guinea-pig in vitro. *Eur Respir J* 12: 45-49, 1998.

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

Pype JL, Verleden GM, Demedts MG. 5-HT modulates noncholinergic contraction in guinea pig airways in vitro by prejunctional 5-HT<sub>1</sub>-like receptors. *J Appl Physiol* 77(3): 1135-1141, 1994.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. Rang and Dale's *Farmacology*. 6<sup>o</sup> Edición. España : Elsevier España S.L., 2008 p.829

Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50: 413-92, 1998.

Segura P, Vargas MH, Córdoba-Rodríguez G, Chávez J, Arreola JL, Campos-Bedolla P, Ruiz V, García-Hernández LM, Méndez C, Montaña LM. 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* 40 (2) :327-38, 2010.

Schulman ES, Glaum MC, Post T, Wang Y, Raible DG, Mohanty J, Butterfield JH, Pelleg A. ATP Modulates Anti-IgE-Induced Release of Histamine from Human Lung Mast Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 530-7, 1999.

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

Siersted HC, Walker CM, O'Shaughnessy, Willan AR, Wiecek EM, Sears MR. *Eur Respir J* 15:181-184, 2000.

Stryer L. Metabolism: basic concepts and design. In Stryer L, Ed. *Biochemistry*. New York: Freeman 1998: 443-62

Somlyo AP, Kitazawa T, Himpens B, Matthijs G, Horiuti K, Kobayashi S, Goldman YE and Somlyo AV. Modulation of Ca<sup>2+</sup>-sensitivity and of the time course of contraction in smooth muscle: a major role of protein phosphatases? *Advances in Protein Phosphatases*. 5: 181-195, 1989.

Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372(6503):231-6, 1994.

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

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

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

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

Vargaftig BB, Braquet PG. PAF-acether today- Relevance for acute experimental anaphylaxis. *Br Med Bull* 43(2): 312-335, 1987.

Yang CM, Yo Y-L, Wang Y-Y. Intracellular calcium in canine cultured tracheal smooth muscle cells is regulated by M<sub>3</sub> muscarinic receptors. *Br. J. Pharmacol* 110:983-88, 1993.