



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**MECANISMO DE LA CONTRACCIÓN INDUCIDA POR KCl EN EL MÚSCULO
LISO DE LA VÍA AÉREA DE BOVINO EN MEDIO SIN Ca^{2+}**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JOSE ANTONIO DE ANDA ROMERO



MÉXICO, D.F.

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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: María Eva González Trujano

VOCAL: Profesor: Aliesha Araceli González Arenas

SECRETARIO: Profesor: María Eugenia Betina Sommer Cervantes

1er. SUPLENTE: Profesor: Ruth Ivonne Téllez Ballesteros

2° SUPLENTE: Profesor: María Alejandra Morinelli Astorquizaga

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL, INER Y
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN ASMA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

ASESOR DEL TEMA: DRA. MARÍA EUGENIA BETINA SOMMER CERVANTES

SUPERVISOR TÉCNICO: DR. LUIS MANUEL MONTAÑO RAMÍREZ

SUSTENTANTE: JOSE ANTONIO DE ANDA ROMERO

Agradecimientos

A la Dra. Betina quien siempre estuvo dispuesta a guiarme con muchísimo entusiasmo y paciencia a través de esta gran experiencia. Mi más sincero cariño y admiración.

Al Dr. Montaña que me dio la oportunidad de ser parte de su equipo, me compartió valiosos consejos y me ayudó a conseguir una beca para la realización de la tesis.

A Jaime y Edgar por ofrecerme su opinión respecto a mi tesis

A todos los colaboradores del laboratorio del Asma en la UNAM y el laboratorio de Hiperreactividad Bronquial en el INER, por haberme recibido con tanto aprecio, compartido su amistad y haberme enseñado tantas cosas valiosas. En especial a Edgar, Jorge y Erick.

A mi hermana Diana, que desinteresadamente se ofreció a ayudarme con las bonitas caricaturas de este trabajo.

A mis papás, que han sido verdaderamente ejemplares. Muchas gracias por apoyarme incondicionalmente siempre.

A mis hermanos, que vivieron conmigo durante mis estudios en la facultad, por aguantarse mi mal humor y ayudarme en las dificultades.

A mis amigos de la facultad, que vivieron conmigo este duro camino y gracias a ello quizás me conozcan más de lo que me conozco.

Y sólo porque también hay que agradecer a la suerte...

Siempre quise iniciar la tesis con algo muy mío. Postergué esta parte para el final porque no podía organizar muy bien mis ideas. Hoy todavía no estoy muy seguro de qué escribo, pero me llegó la hora de hacerlo. Así como llega la hora para todo en la vida... El tiempo es tan amigo como enemigo, parece que fue ayer cuando no sabía ni siquiera qué estudiar. Y lo mismo diré ahora que cumpla 60 años (si es que llego). No me duele que pase el tiempo, me duele olvidar las cosas buenas y renunciar a ciertas cosas que siempre miré con admiración. Aun así sigo pensando que cualquier cosa que quieras puede ser tuya.

En general, me quejo de todo y lo hago porque me gusta y porque se convirtió en parte de mi esencia. Pese a eso, no puedo negar que he tenido suerte en la vida y que no llegué hasta acá sin ninguna ayuda, aunque siempre me quiera hacer el mártir. Luego entonces, me parece importante decir que muchos de mis éxitos son gracias a mi familia y mis amigos. Y si hiciera yo el desglose de éstos entonces cabrían ahí otras miles de subclasificaciones que no hace mucho sentido explicar. Todos estos seres queridos han llegado avisados, sin avisar, por compromiso, por azar y de la misma manera se han ido o se han quedado. De cada uno he aprendido mil cosas, no siempre las mejores, pero algo me han enseñado. Siempre tan absorto en mis pensamientos y mis cosas muchas veces nunca me he detenido a decirles sus miles de virtudes, pero les aseguro que tienen muchas. Me disculpo por mi falta de cortesía y espero que al menos mi perspicacia les haya parecido simpática y por eso se han quedado al menos un instante a mi lado. Aunque me niego tanto a los clichés, no me atrevo a decir nombres, ni a clasificarlos bajo ningún título, por seguridad propia. Además no quiero errar, olvidar a alguien, o peor aún, dejar de mencionar a alguien sólo porque hoy cuando escribo ya sólo le guardo buenos recuerdos. Ahora que pase el tiempo, si es que a alguno de ustedes lo dejo de ver, espero que guarden muy en mente que nosotros intercambiamos algo tanpreciado como intangible. Compartimos experiencias, compartimos vida: risas, alegrías, llanto, tristeza, coraje, éxito, abrazos, besos, ideas, inteligencia, cariño, etcétera.

Por último, le agradezco a la suerte por haberme permitido llegar hasta aquí y de permitirme compartir mis éxitos con ustedes, que son pedazo a pedazo mi esencia.

Y dijo: “Goza, sin temor del Hado,
el curso breve de tu edad lozana,
pues no podrá la muerte de mañana,
quitarte lo que hubieres hoy gozado.”

Sor Juana Inés de la Cruz

A mis papás,

Con quienes he logrado mis más grandes éxitos

Índice

	Página
Resumen	11
Abreviaturas	13
Marco teórico	15
La fisiología del músculo liso de las vías aéreas	15
<i>Receptores acoplados a proteínas G y generación de IP₃</i>	15
<i>El Ca²⁺ como segundo mensajero</i>	18
<i>El Ca²⁺ y la contracción del músculo liso</i>	21
La vía de señalización de la RhoA/ROCK	23
Canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje tipo L	24
Planteamiento del problema	26
Objetivo general	26
Objetivos particulares	26
Hipótesis	27
Material y métodos	28
Modelo animal	28
Metodología experimental	28
Fármacos	29
<i>Caféina y ácido ciclopiazónico para favorecer la disminución de la [Ca²⁺] del RS</i>	30

<i>Antagonistas del receptor a IP₃ del RS</i>	31
<i>Desacopladores de las proteínas G triméricas</i>	31
<i>Dihidropiridinas/Bay K8644</i>	32
<i>Inhibidores de la cinasa de Rho (ROCK)</i>	33
Análisis estadístico	34
Resultados	35
Efecto de la disminución de la [Ca²⁺] del retículo sarcoplásmico sobre la contracción a KCl en un medio KH 0 Ca²⁺	35
Participación del receptor a IP₃ en la contracción por KCl en un medio KH 0 Ca²⁺	36
Efecto del desacople farmacológico de las proteínas G triméricas	37
Efecto de la activación o el bloqueo farmacológicos del VDCC_L	38
Efecto de la inhibición de la cinasa de Rho (ROCK) sobre la contracción del MLVA inducida por KCl en un medio KH 0 Ca²⁺	39
Efecto de la adición simultánea de un activador del VDCC_L y un inhibidor de la cinasa de Rho (ROCK)	40
Discusión	41
La contracción en medio KH 0 Ca²⁺ es dependiente del Ca²⁺ del RS	41
El receptor a IP₃ participa en la liberación de Ca²⁺ del RS	42
Las proteínas G triméricas no participan en la activación del IP₃R en el MLVA de bovino	43
Los VDCC_L son capaces de modular la contracción en un medio KH 0 Ca²⁺	44
La depolarización de la membrana favorecida por los VDCC_L en medio KH 0 Ca²⁺ activa a la ROCK	45

Conclusiones	46
Bibliografía	47
Anexo I: Fármacos	56
Anexo II: Trazos representativos	57

Resumen

El proceso de la contracción del músculo liso es dependiente del incremento de las concentraciones de Ca^{2+} intracelulares ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) e involucra la formación de un complejo entre el Ca^{2+} disponible en el citoplasma y la calmodulina (Ca^{2+} -CaM). Este complejo es capaz de activar a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK). La MLCK fosforila a la cadena ligera de la miosina de 20 kDa (MLC_{20}) provocando la contracción. Por el contrario, la relajación del músculo se produce por la desfosforilación de la MLC_{20} catalizada por la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP) y por la regulación del Ca^{2+} disponible en citoplasma gracias a la rápida disminución de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Paradójicamente, la contracción puede sostenerse aun cuando se hayan disminuido las $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Dicho proceso recibe el nombre de sensibilización al Ca^{2+} y es producto de la inactivación de la MLCP. La cinasa de Rho (ROCK), en su estado activado, fosforila a la MLCP en su subunidad de orientación (MYPT1), inactivándola.

El músculo liso de las vías aéreas (MLVA) estimulado *in vitro* con KCl se depolariza, induciendo la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L (VDCC_L) que se abren con este estímulo, aportan la mayor cantidad de Ca^{2+} extracelular que participa en la contracción del MLVA. Por mucho tiempo se consideró que ésta era la única fuente de Ca^{2+} en la contracción del MLVA inducida por KCl. Sin embargo, actualmente se sabe que la depolarización inducida por KCl puede provocar la salida de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS) mediante mecanismos que aún no están muy bien reconocidos.

El principal objetivo del presente proyecto es dilucidar algunos de los mecanismos implicados en la contracción del MLVA de bovino por KCl al eliminar el Ca^{2+} del medio extracelular. Para ello, se realizaron estudios de órgano aislado *in vitro* empleando tiras de MLVA de bovino en un medio Krebs-Henseleit sin Ca^{2+} nominal (KH 0 Ca^{2+}) nominal y con ácido N,N,N',N' tetraacético etilenglicol-bis(2-aminoetiléter) (EGTA) 0.1 mM como quelante de Ca^{2+} y estimulado posteriormente con KCl 60 mM. Los fármacos empleados se incubaron durante 10 min previos a la estimulación. La incubación con cafeína (10 mM) y ácido ciclopiazónico (CPA, 10 μM) corroboró la dependencia de la

contracción transitoria con el Ca^{2+} proveniente del RS. Más aún, se demostró mediante la inhibición del receptor a IP_3 (IP_3R ; con TMB-8, 50 μM), que éste se encuentra involucrado en la salida del Ca^{2+} del RS. Sin embargo, no se reconocieron los mecanismos por los que se activa el IP_3R . Por otro lado, con métodos farmacológicos se evidenció que la depolarización de la membrana es suficiente para activar a la ROCK (Y-27632, 10 μM). Por su parte, la incubación con Bay K8644 (1 μM ; activador de la apertura de los VDCC_L) aumentó significativamente la fuerza de contracción mientras que la incubación con nifedipina (1 μM ; bloqueador de los VDCC_L) la disminuyó significativamente. Finalmente, la activación farmacológica de la apertura de los VDCC_L en combinación con la inhibición de la ROCK muestra la clara dependencia de los mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} y la ΔE_M .

Abreviaturas

[Ca ²⁺]	Concentración de calcio
[Ca ²⁺] _i	Concentraciones de calcio intracelulares
Ca ²⁺ -CaM	Complejo calcio-calmodulina
CPA	Ácido ciclopiazónico
CICR	“Calcium-induced calcium release” por sus siglas en inglés. Ver RyR.
ΔE _M	Diferencia en el potencial de membrana
DAG	Diacilglicerol
IP ₃	Fosfatidil inositol 1,4,5-trisfosfato
IP ₃ R	Receptores de IP ₃
KH	Krebs-Henseleit
MLC ₂₀	Cadena ligera de la miosina de 20 kDa
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de la miosina
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de la miosina
MLV	Músculo liso vascular
MLVA	Músculo liso de las vías aéreas
MP	Membrana citoplasmática
MYPT1	“Myosin phosphatase targeting subunit 1”, por sus siglas en inglés
NCX	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺
PIP ₂	Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato

PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PMCA	ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática
RAPG	Receptores acoplados a proteínas G
ROCK	Cinasa de Rho
RyR	Receptores de Ryanodina
RS	Retículo sarcoplásmico
SERCA	ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico
VDCC _L	Canales de Ca^{2+} dependiente de voltaje tipo L

Marco teórico

La fisiología del músculo liso de las vías aéreas

La función del músculo liso de las vías aéreas (MLVA) es controlar el diámetro de la luz de la tráquea. Se encuentra innervado por el parasimpático, que forma parte del sistema nervioso autónomo, por lo que sus movimientos son involuntarios. El principal neurotransmisor parasimpático es la acetilcolina (ACh; 51) y está fuertemente involucrado en la regulación de la contracción del MLVA; las células del MLVA tienen además diversos receptores, canales, ATPasas e intercambiadores de la membrana citoplasmática (MP) que también están involucrados en la contracción (51).

Receptores acoplados a proteínas G y generación de IP_3

Los receptores muscarínicos M_3 (que son activados por ACh) son los más abundantes en el MLVA y participan en gran medida en su contracción, por esta razón se eligieron como ejemplo para describir a la generalidad de los receptores acoplados a proteínas $G_{\alpha q}$ en el MLVA. La ocupación de los receptores M_3 por ACh activa la cascada de señalización $G_{\alpha q}$ -PLC β - IP_3 , (7) que se discutirá después a mayor profundidad. Por otro lado, el MLVA también es estimulado por hormonas esteroides (28), otros neurotransmisores (sustancia P; 51), autacoides (histamina; 37) y otros eventos fisiológicos.

Del funcionamiento de los receptores, canales, ATPasas e intercambiadores que se encuentran en la MP y en el retículo sarcoplásmico (RS; el principal almacén de Ca^{2+} en el MLVA) dependen las concentraciones de Ca^{2+} intracelulares ($[Ca^{2+}]_i$). Uno de los mecanismos mejor caracterizados entre un receptor de la MP y la liberación de Ca^{2+} del RS es la ocupación del receptor M_3 por ACh y la generación de IP_3 que liberará Ca^{2+} del RS. Es importante mencionar que mientras todas las proteínas responsables de la contracción se encuentran en el interior de las células del MLVA, la

activación de las moléculas que participan en las vías de señalización desencadenadas por la ocupación de los receptores acoplados a proteínas G (RAPG; también llamados metabotrópicos) $G_{\alpha q}$ ocurren a nivel de la MP (50).

El primer modelo estudiado para identificar la estructura de los RAPG fue el de los receptores adrenérgicos β_2 (63; 64; 65). Se sabe que poseen 7 dominios hidrófobos transmembranales y que el dominio NH_2 terminal es extracelular, mientras que la cola $COOH$ terminal es intracitoplasmática (3). Aunque generalmente los RAPG se esquematizan como serpentinas que atraviesan la MP, en realidad, su estructura parece una canasta (32; 54; 62) que forma una bolsa hidrófoba donde ocurre la interacción ligando receptor (13; 27; 36; 38; 64).

Las proteínas G acopladas a dichos receptores son heterotrímeros (tres subunidades: α , β , γ); la subunidad α define la clasificación de la proteína G por ser la subunidad más estudiada. En su estado inactivo, la subunidad α se encuentra asociada a GDP y al dímero $\beta\gamma$. Al activarse, por la ocupación de un agonista en el RAPG, la subunidad α actúa como un factor de intercambio de nucleótidos sustituyendo el GDP por GTP (7). Anteriormente se pensaba que esta activación siempre ocasionaba la disociación de la subunidad α del complejo $\beta\gamma$. Actualmente hay evidencia de que, en algunos casos, el cambio conformacional es suficiente para desenmascarar los sitios activos de las subunidades y así puedan interactuar con sus blancos (2). El tiempo de actividad de la subunidad α queda determinado por su actividad GTPasa que hidroliza un fosfato regresando entonces a su estado inactivo y permitiendo, en su caso, su reasociación con el dímero $\beta\gamma$ (7).

Para la estimulación vía receptores M_3 acoplados a proteínas G_q (Figura 1), la ACh promueve un cambio conformacional en el receptor que desencadena la vía de señalización correspondiente. La subunidad $G_{\alpha q}$ promueve la activación de la fosfolipasa C β (PLC β) que hidroliza al fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP $_2$), presente en pequeñas cantidades en los fosfolípidos de membrana, formando dos importantes mediadores intracelulares: diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP $_3$). El DAG

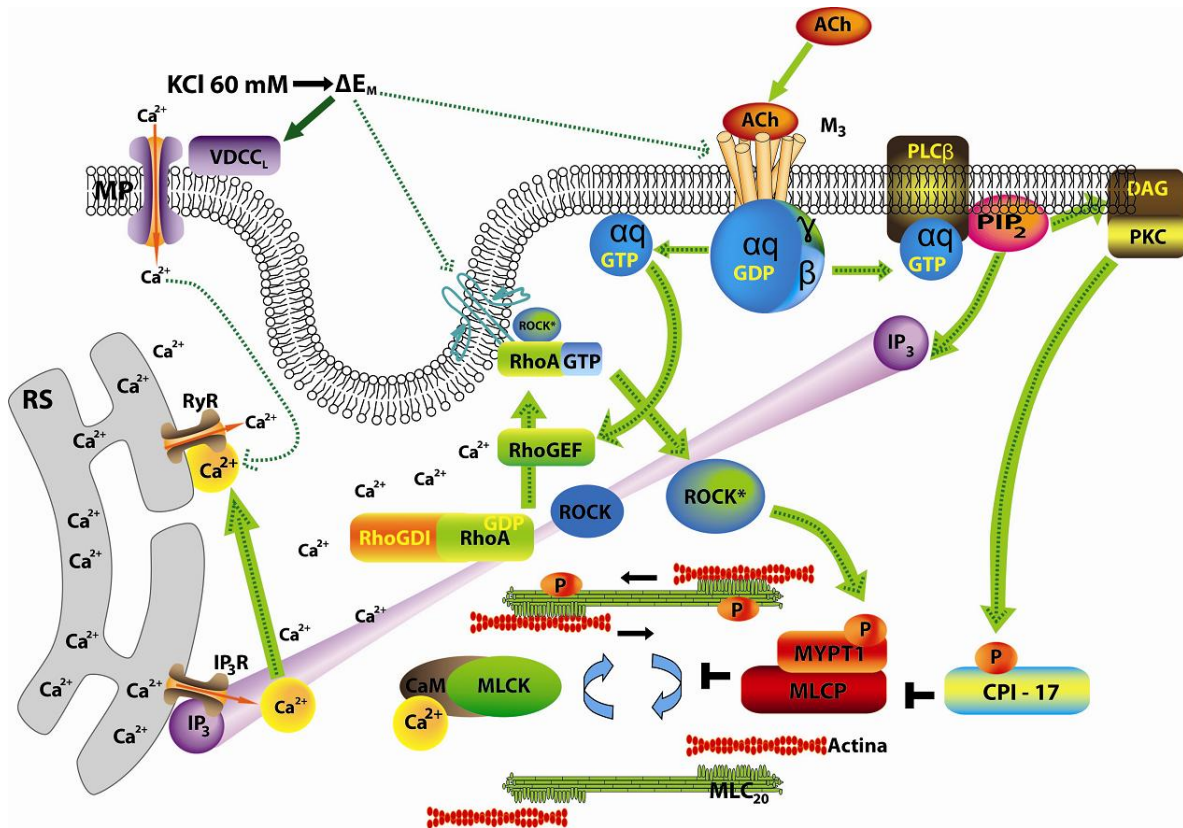


Figura 1. Representación gráfica del modelo general de los mecanismos celulares de una depolarización membranar inducida por KCl (flechas verde oscuro) y la activación de un receptor M_3 por acetilcolina (ACh; flechas verde claro) en la contracción del músculo liso de las vías aéreas. Las flechas sólidas indican un dogma ampliamente conocido y las flechas punteadas indican hipótesis recientemente propuestas (nótese que hay flechas verde claro y punteadas en verde oscuro). Se esquematiza el receptor M_3 como representativo de todos los receptores acoplados $RAPG_{\alpha q}$ del MLVA. La depolarización de la membrana provoca la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje ($VDCC_L$) elevando la $[Ca^{2+}]_i$. El Ca^{2+} libre en el citosol se une a la calmodulina (CaM) formando el complejo Ca^{2+} -CaM capaz de activar a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) para que fosforile a la cadena ligera de la miosina de 20 kDa (MLC_{20}) e inducir la contracción. El cambio del potencial de membrana (ΔE_M) generado por KCl probablemente estimule, en ausencia de ACh, a los receptores M_3 y a la vía de señalización RhoA/cinasa de Rho (ROCK). La ocupación de los receptores M_3 por ACh activa una proteína G trimérica. Al ser activada la subunidad $G_{\alpha q}$ activa a la fosfolipasa C β ($PLC\beta$) que escinde al fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) para generar inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) y diacil glicerol (DAG). El IP_3 se posará sobre los receptores de IP_3 (IP_3R) para liberar Ca^{2+} del RS. Esta liberación de Ca^{2+} estimulará a los receptores de Ryanodina (RyR) a liberar más Ca^{2+} . La estimulación de los receptores M_3 activa también a la proteína cinasa C (PKC) y a ROCK. ROCK fosforila directamente a MYPT1 y PKC fosforila a CPI-17, ambos causando la inhibición de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP). La inhibición de la actividad de la MLCP por la fosforilación de la subunidad de orientación de la MLCP (MYPT1) o por fosforilación de la proteína inhibitoria de la MLCP (CPI-17) produce un incremento en la proporción de MLCK/MLCP independientemente de la $[Ca^{2+}]_i$ para mantener fosforilada a la MLC_{20} y sostener la fuerza de contracción. La activación de los receptores M_3 incrementa el traslado de RhoA, ROCK y PKC a la caveola. RhoA-GDP es transformado a RhoA-GTP a través de factores de intercambio de nucleótidos (RhoGEF; ver detalle en la figura 4); este cambio conformacional le permite liberarse de los inhibidores de la disociación de la guanina (RhoGDI). (Imagen modificada de Ratz P y col., 2005).

permanece embebido en la MP y ejerce diferentes efectos celulares: puede formar ácido araquidónico o bien activar a la proteína cinasa C (PKC; llamada así por su dependencia al Ca^{2+}); ambos procesos activan otras cascadas de señalización (2). Por su parte, el IP_3 , que es una molécula soluble en agua, se asienta en los receptores de IP_3 del RS y promueve la salida de Ca^{2+} (42; 53; 58). Para disminuir las concentraciones citoplasmáticas de IP_3 , éste puede ser desfosforilado a IP_2 o fosforilado a IP_4 (2).

Al aumentar las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ después de ser liberado desde el RS por ocupación de sus receptores a IP_3 (IP_3R), se induce la salida de más Ca^{2+} del RS a través de los receptores de ryanodina (RyR) conocidos también como canales que liberan Ca^{2+} al ser estimulados por Ca^{2+} (“calcium induced calcium release”, CICR por sus siglas en inglés).

El Ca^{2+} como segundo mensajero

Las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se encuentran muy reguladas gracias a la actividad de diversos canales, bombas, compartimentos y amortiguadores intracelulares (52). Los aumentos en las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tienen diversas repercusiones fisiológicas dependiendo de su concentración, región intracitoplasmática y tiempo de permanencia. Las respuestas fisiológicas incluyen la contracción muscular, el inicio de la transcripción génica dependiente de Ca^{2+} , la proliferación celular, la liberación de hormonas y neurotransmisores (19; 69; 71) y la muerte celular programada (apoptosis; 48), entre otros.

La regulación de estos procesos ocurre por una estrecha comunicación entre los RAPG y canales iónicos de membrana y los receptores (IP_3R y RyR) y ATPasas de Ca^{2+} del RS (SERCA), sin la cual sería imposible tener efectos de contracción-relajación. En la regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ intervienen tres mecanismos fundamentales (51; ver Figura 2):

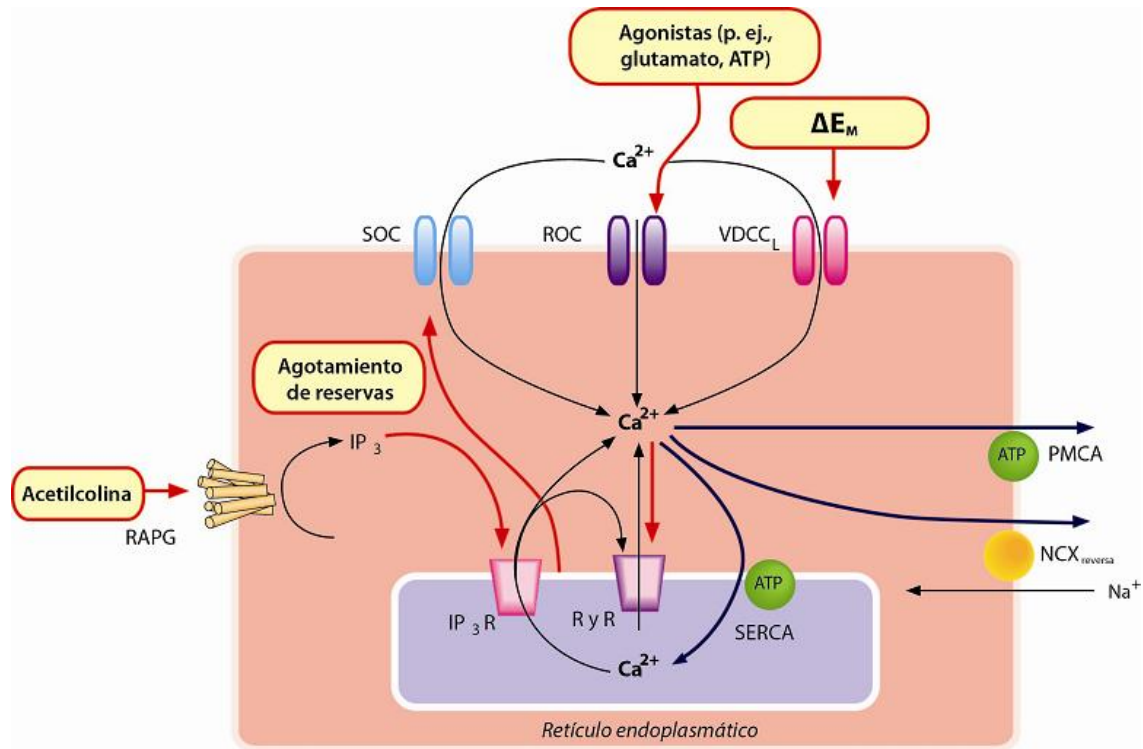


Figura 2. Regulación del calcio intracelular en un modelo de célula excitable. Las flechas negras representan las vías de entrada y salida de calcio del citoplasma, mientras que las flechas azules señalan las vías de salida del calcio del citoplasma. Las flechas rojas representan los mecanismos de regulación. Casi todos los canales y transportadores se han caracterizado a nivel molecular, aunque no se conoce bien el mecanismo que relaciona los canales de calcio regulados por almacén (SOC) con el estado de las reservas intracelulares de este ion. Normalmente la $[Ca^{2+}]_i$ se mantiene en unos 10^{-7} M en una célula en reposo. ROC, canales catiónicos inespecíficos controlados por ligandos; $VDCC_L$, canales de calcio dependientes de voltaje tipo L; RAPG, receptores acoplados a proteínas G; IP_3 , inositol trifosfato; IP_3R , receptor de IP_3 ; $NCX_{reversa}$, intercambiador Na^+/Ca^{2+} en fase reversa; PMCA, ATPasa- Ca^{2+} de membrana plasmática; RyR receptor de ryanodina; SERCA, ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (Imagen tomada de Rang H et al., 2003).

- El control de la entrada de Ca^{2+} al citoplasma desde el espacio extracelular:
 - o Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L ($VDCC_L$; “voltage dependent calcium channels” por sus siglas en inglés).
 - o Canales catiónicos inespecíficos controlados por ligandos (ROC; “receptor operated channels” por sus siglas en inglés).
 - o Canales de Ca^{2+} regulados por almacén. (SOC; “store operated calcium channels”, por sus siglas en inglés)
 - o El intercambiador Na^+/Ca^{2+} en su fase reversa.

- El aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ por Ca^{2+} proveniente del RS
 - o Activación del receptor de IP_3 (IP_3R).
 - o Estimulación del receptor de Ryanodina (RyR).
- El control de la remoción de Ca^{2+} del citoplasma (hacia el espacio extracelular y al interior del RS):
 - o SERCA.
 - o Intercambiador Na^+/Ca^{2+} .
 - o ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA).

Existen también, dentro del citoplasma, varias proteínas que son consideradas amortiguadores de Ca^{2+} y, a su vez, reservorios del mismo que ayudan a mantener las concentraciones basales de este ion. Dentro de éstas se encuentra la familia de las calmodulinas (2).

En el RS, la SERCA se activa cuando aumenta la $[Ca^{2+}]_i$ e introduce Ca^{2+} al RS. Se sabe también que en el RS existen proteínas como la calsecuestrina y la calreticulina capaces de atrapar al Ca^{2+} impidiendo su salida al espacio citoplasmático. También existe un análogo de la SERCA en la membrana plasmática que se llama PMCA y toma el Ca^{2+} intracelular y lo libera al espacio extracelular. La MP emplea también otros mecanismos como los del intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX) para provocar la salida de Ca^{2+} al espacio extracelular (51). El NCX permite la salida de un ión Ca^{2+} y la entrada de tres iones Na^+ sin gasto de ATP. Después de un estímulo por depolarización o por ocupación de un $RAPG_q$, el NCX aumenta la $[Na^+]$ en la región subplasmalema (la región más estrecha entre el RS y la MP) y la actividad del NCX se invierte, permitiendo el aumento circunscrito de la $[Ca^{2+}]_i$ puesto que el transportador actúa en su forma reversa (16). Este aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ al parecer se restringe al subplasmalema y contribuye a rellenar al RS (25). La dirección en la que actúa el NCX es determinada por el gradiente electroquímico del Na^+ y la despolarización de la MP.

El Ca^{2+} y la contracción del músculo liso

La contracción del músculo liso depende de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Cuando la ACh ocupa su receptor M_3 , el IP_3 estimula la liberación Ca^{2+} del RS, donde hay una $[\text{Ca}^{2+}]$ de ~5-10 mM y, sumado al Ca^{2+} extracelular que entra a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L (VDCC_L) y ROCs, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se eleva de ~0.5 μM hasta ~0.7 μM (9). El Ca^{2+} citoplasmático se une a la calmodulina (CaM) (proteína de naturaleza ácida; Figura 1) formando el complejo Ca^{2+} -CaM, la especie activada. La CaM es la proteína más importante relacionada con la señalización del Ca^{2+} y constituye hasta un 1% de la masa proteica total de la célula. Esta proteína consiste en una sola cadena polipeptídica altamente conservada que posee dominios NH_2 y COOH globulares de muy alta afinidad al Ca^{2+} . El complejo Ca^{2+} -CaM es capaz de regular la actividad de muchas enzimas y proteínas transmembranales de transporte relacionadas con el metabolismo del Ca^{2+} . Las más importantes son el caldesmón, la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) y la PMCA. El complejo Ca^{2+} -CaM se une al caldesmón provocando su separación de los sitios activos de la actina donde la miosina tiene interacción (2). Por otro lado, Ca^{2+} -CaM interacciona con la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) a través de la unión de su dominio COOH con la secuencia de unión a calmodulina en el fragmento NH_2 de la MLCK (14; 49; 66). Como consecuencia de esta interacción, el sitio regulador de la MLCK es desplazado del sitio catalítico. MLCK adquiere actividad serina/treonina cinasa y fosforila, a expensas de ATP, la serina 19 en el extremo NH_2 de la cadena ligera de la miosina de 20 kDa (MLC_{20} ; 15). Estos dos procesos en particular permiten la activación del aparato contráctil en el músculo liso. Por otro lado, la activación de las diferentes proteínas reguladoras permite que las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ regresen a sus niveles basales (2).

La miosina II es una proteína hexamérica conformada por dos cadenas pesadas (~ 200 kDa), cada una unida de forma no covalente a un par de cadenas ligeras, la esencial (17 kDa) y la reguladora (20 kDa) (5; 41; 46; figura 3). El extremo NH_2 de las cadenas pesadas de miosina en el músculo liso contiene las regiones de unión al ATP

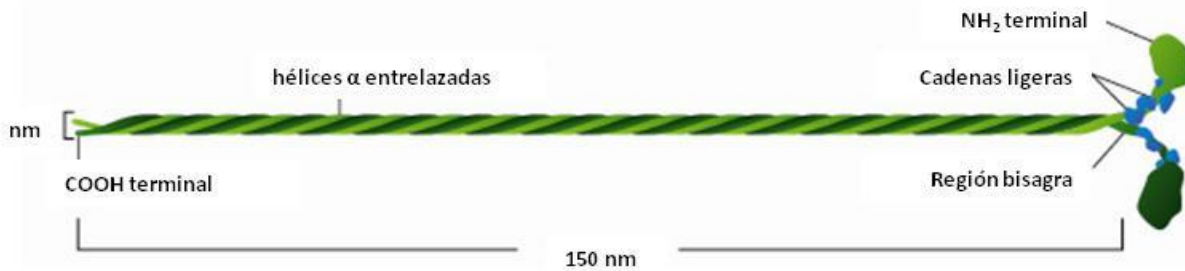


Figura 3. Representación de la proteína miosina II. Está formada por dos cadenas pesadas (cada una de aproximadamente 2000 aminoácidos de largo, [verdes] y cuatro cadenas ligeras [azul]). Las cadenas ligeras son de dos tipos y una copia de cada tipo está en cada una de las dos cabezas. La dimerización ocurre cuando las dos hélices α de las cadenas pesadas se entrelazan entre si, guiadas por la asociación de aminoácidos hidrofóbicos regularmente espaciados. Las hélices α entrelazadas forman la sección de la miosina conocida como cola. (Imagen tomada de Alberts B *et al.*, 2008).

y a la actina, es decir, la maquinaria generadora de fuerza. El extremo COOH de las dos cadenas pesadas consiste en una larga secuencia de aminoácidos que permite la dimerización entre las mismas a través de las hélices α entrelazadas (55). El extremo COOH de una miosina se une con el extremo COOH de otra para formar un filamento grueso bipolar que contiene muchas regiones de unión a la actina (extremo NH₂; cada filamento grueso de miosina contiene alrededor de 200 cabezas motoras) orientadas en direcciones opuestas en ambos extremos del filamento grueso (2). La fosforilación de la serina 19 de la MLC₂₀ es responsable de la activación de la miosina (59). Esta reacción provoca la interacción entre la miosina y la actina a través de la ATPasa de la cadena pesada de la miosina, lo que se traduce en una contracción. Se ha demostrado que no hay contracción sin MLC₂₀ fosforilada (MLC₂₀-P, 47). La contracción del músculo se desarrolla por una fuerza dependiente de ATP generada por el deslizamiento entre un grupo de filamentos de actina y un grupo de filamentos gruesos de miosina.

La regulación de las [Ca²⁺]_i (Figura 2), la apertura de canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ y/o AMPc con la consecuente hiperpolarización de la membrana y, por otro lado, la desfosforilación de la serina 19 de la MLC₂₀-P, permiten que ocurra la relajación (Figura 1). Esta última reacción es catalizada por la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP). La MLCP posee tres subunidades: una subunidad catalítica de 37 kDa, una subunidad variable de 20 kDa y una subunidad de unión a la miosina de 110 a 130 kDa que incluye a la subunidad de orientación (MYPT1, por sus siglas en inglés para “myosin phosphatase targeting subunit 1”). La MLCP contrarresta la actividad de

la MLCK, pues desfosforila a la $MLC_{20}\text{-P}$. En una condición ideal, ambas enzimas deberían trabajar de manera similar. Pero paradójicamente, en la contracción del músculo liso esta actividad no es proporcional. Al bajar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la contracción no disminuye en consecuencia, se mantiene porque la actividad de la MLCP está detenida. Este fenómeno se conoce como sensibilización al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil y ocurre tras la desactivación de la MLCP debido a su fosforilación (60). Es decir, la contracción es dependiente del Ca^{2+} porque la MLCK requiere Ca^{2+} para activarse, pero se sostiene mediante otros mecanismos como la desactivación de la MLCP.

Existen varios mecanismos propuestos para explicar la inhibición de la MLCP (29; 34); la fosforilación de la MYPT1 es la más relevante en el músculo liso de las vías aéreas (61). Esta fosforilación se debe a la acción de la cinasa de Rho (ROCK; 60)

La vía de señalización de la RhoA/ROCK

El mecanismo contráctil en el MLVA es un fenómeno complejo que involucra una diversidad de enzimas. ROCK es una de las enzimas más importantes en la regulación de la contracción y es la principal responsable de la sensibilización al Ca^{2+} ; es una cinasa de serina/treonina y se activa por la interacción directa con un dominio en la porción COOH-terminal de la proteína G monomérica RhoA-GTP. Se sabe muy bien que la activación de la RhoA está regulada por tres proteínas: inhibidores de la disociación de la guanina (RhoGDI), factores de intercambio de nucleótidos de guanina

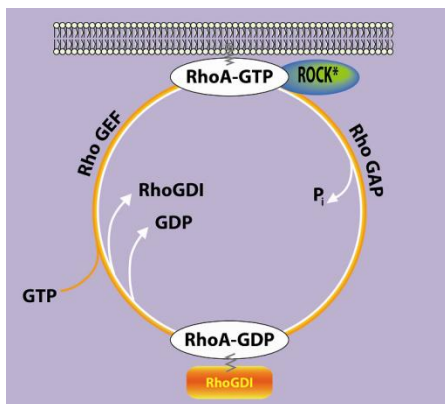


Figura 4. Esquema de la regulación de RhoA. En el estado basal, RhoA-GDP se encuentra en el citosol con su cola hidrofóbica isoprenilada escondida en el inhibidor de la disociación de RhoA-GDP (RhoGDI). La activación de ciertos receptores acoplados a proteínas G (G_{α_q} , $G_{\alpha_{12,13}}$) y el receptor tirosina cinasa conlleva, a través de la actividad de factores de intercambio de nucleótidos (GEFs), al intercambio de GDP por GTP en la RhoA. RhoGDI se disocia y RhoA-GTP se asocia con la membrana donde interacciona con la cinasa de Rho (ROCK) para iniciar las cascadas de señalización. Las proteínas activadoras de la Rho GTPasa (RhoGAPs) catalizan la hidrólisis de GTP unida a RhoA y RhoA-GDP se reasocia con RhoGDI. (Imagen tomada de Somlyo A y Somlyo A, 2003).

(RhoGEFs) y proteínas con actividad de GTPasa (RhoGAPs) (Figura 4; 60). En 2004, Janssen y colaboradores (35) demostraron que, en el MLVA, la depolarización inducida por KCl genera una contracción parcialmente dependiente de ROCK. Además, esta estimulación con KCl se supone independiente de la estimulación de receptores acoplados a proteínas G_q por el agonista, por lo que se postula que la depolarización del MLVA también activa la vía de señalización RhoA/ROCK. Se presume que esta activación involucra al calcio y no se ha confirmado la participación de RhoGEFs. En la vía de activación de RhoA/ROCK por ocupación de $RAPG_{\alpha q}$ por su agonista respectivo (Figura 1), la proteína G monomérica RhoA está en su forma inactiva y unida a RhoGDI y GDP en el citoplasma. $G_{\alpha q}$ se encargará de activar a los RhoGEFs que, a su vez, activarán a RhoA al promover el intercambio de GDP por GTP; mientras que las RhoGAPs inducirán lo contrario. Cuando está unida a GTP, RhoA se traslada a la membrana, donde activa a ROCK (Figura 4); entonces ROCK participa en la inhibición de la MLCP, originando el fenómeno muscular de sensibilización al Ca^{2+} (60).

Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L

La participación de los $VDCC_L$ en la contracción del MLVA inducida por depolarización ha sido reconocida por la comunidad científica que estudia el MLVA (31). Hasta ahora, se conocen múltiples subtipos de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (69; 68). Éstos se han clasificado de acuerdo a su umbral de activación en los que se activan por voltaje bajo y los que se activan por voltaje alto (10; 11). En MLVA interesa sobre todo el subtipo L (“long lasting”) que pertenece al grupo de los que se activan por voltaje alto. Los canales pertenecientes a este grupo se caracterizan por ser bloqueados por las dihidropiridinas, como la nifedipina (73).

Los canales de Ca^{2+} son proteínas pentaméricas, de las cuales la subunidad $\alpha 1$ es la más importante y determina el subtipo. Esta subunidad cuenta con dominios homólogos y regiones amino y carboxilo terminales intracitoplasmáticas (10; 11). Cada dominio homólogo contiene seis hélices transmembranales (S1 a S6) y un rizo en

forma de “p” entre S5 y S6 que forma la región selectiva del catión. Por su parte, las hélices S4 tienen aminoácidos con carga positiva en cada tercera posición, lo que permite sensar la depolarización membranal y abrir el poro (12). Los canales de Ca^{2+} tipo L motivo del presente estudio, se encuentran en el plasmalema del MLVA y pertenecen a un grupo de canales conocidos como $\text{Ca}_v1.2$ (20).

La MP del MLVA tiene una diferencia de potencial de reposo de entre -70 y -30 mV (31) y el cambio en esta diferencia de potencial promovido por el movimiento de iones (principalmente K^+) a través de la misma provocan la depolarización o, en su defecto, la hiperpolarización. Estas variaciones del potencial (ΔE_M) provocan en las proteínas de membrana pertenecientes a los canales iónicos dependientes de voltaje, diversos cambios conformacionales que causan un transporte dinámico entre los diferentes iones del medio, donde destacan el Na^+ , el K^+ , el Cl^- y el Ca^{2+} . Al ocurrir una depolarización de la membrana del MLVA se promueve la entrada de Ca^{2+} a través de los canales VDCC_L y la concomitante contracción. El aumento en la concentración de KCl en el medio extracelular cambia el potencial de membrana de aproximadamente -60 mV a -20 mV (39), depolarización suficiente para abrir los VDCC_L .

Planteamiento del problema

Se sabe que el KCl depolariza el MLVA abriendo los VDCC_L permitiendo así la entrada de Ca²⁺ en medio KH con Ca²⁺. Por otro lado, se ha demostrado que la presencia de KCl puede provocar la salida de Ca²⁺ reticular a través de mecanismos no descritos. Por lo anterior, con herramientas farmacológicas, se propone determinar la participación de la ROCK, del receptor de IP₃ del RS, del VDCC_L y del Ca²⁺ reticular en la contracción del MLVA de bovino inducida por KCl en medio KH 0 Ca²⁺. Además se estudiará la relación entre el VDCC_L y la activación de la ROCK.

Objetivo general

- ❖ Definir la participación de algunos mediadores de las vías de señalización de RhoA/ROCK e IP₃ implicados en la contracción del MLVA inducida por depolarización con KCl.

Objetivos particulares

- ❖ Demostrar que la contracción inducida por KCl 60 mM en un medio KH 0 Ca²⁺ depende del Ca²⁺ almacenado en el retículo sarcoplásmico.
- ❖ Definir si el Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico que participa en la contracción inducida por KCl 60 mM en un medio KH 0 Ca²⁺ se libera por la estimulación de receptores a IP₃.
- ❖ Determinar si ROCK interviene en la contracción inducida por KCl 60 mM en un medio KH 0 Ca²⁺.
- ❖ Caracterizar la participación del VDCC_L en la contracción inducida por KCl 60 mM en un medio KH 0 Ca²⁺.

- ❖ Estudiar si las probabilidades de apertura del VDCC_L determinan la activación de ROCK en la contracción inducida por KCl 60 mM en un medio KH 0 Ca²⁺.

Hipótesis

Cuando se depolariza la membrana del MLVA de tráquea de bovino, parte de la contracción ocurre a expensas del Ca²⁺ del RS que involucra a los receptores de IP₃, donde el Ca²⁺ participa en la vía RhoA/ROCK.

Material y métodos

Modelo animal

Bovinos macho de alrededor de 4 años de edad, de 600 Kg de peso, del rastro de Temamatla, Estado de México, se utilizaron para la obtención de tráqueas de aproximadamente 15cm de largo. Para su transporte al laboratorio se sumergieron en solución de Krebs fría en un contenedor hermético.

Metodología experimental

De la tráquea se obtuvo el MLVA, separándolo del epitelio y del tejido conectivo. Se obtuvieron tiras de músculo liso de aproximadamente 2 mm de ancho por 2 cm de largo. A un extremo se anudó un hilo de seda quirúrgico 4 ceros formando una jareta



Figura 5. Fotografía representativa del montaje experimental.

firme por donde se enganchó la preparación a un soporte plástico.

El otro extremo de la tira de músculo se anudó a un cabo largo del mismo hilo y se sujetó firmemente a un transductor de tensión.

Cada una de estas preparaciones se colocó en una cámara de órgano aislado de 10 mL de capacidad que contenía solución de Krebs que consistió en (mM): 118 NaCl, 25 NaHCO₃, 4.6 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 11 glucosa, y 2 CaCl₂. Las preparaciones se mantuvieron a 37° C y se burbujearon continuamente con 5% CO₂ y 95% O₂ a un pH de 7.4 (Figura 5).

Las tiras de músculo se sujetaron a un transductor de fuerza isométrica (modelo FT03; Grass Instruments, West Warwick, RI, USA) conectado a un sistema amplificador de la señal (CyberAmp 380, Axon Instruments, Foster City, CA, USA) y a una interfaz análogo-digital (Digidata 1200A; Axon). Los registros se almacenaron en una computadora y se analizaron con un paquete computacional para adquisición y análisis de datos (AxoScope version 9.0; Axon). Las preparaciones se equilibraron en los vasos de órgano aislado durante 30 min con una tensión inicial de 2 g. Los tejidos se

estimularon después 3 veces consecutivas con KCl 60 mM, para obtener respuestas máximas estables. Cada contracción inducida por KCl 60 mM duró 20 min, periodo después del cual se lavaron las preparaciones 2 veces con solución de Krebs; el tercer lavado se realizó con solución de Krebs 0 Ca²⁺, adicionada con EGTA 0.1 mM.

Inmediatamente después del lavado con solución de Krebs 0 Ca²⁺, alguno de los siguientes fármacos se añadió a una única concentración: TMB-8 (bloqueador de los receptores de IP₃ del RS, 50 μM), ácido ciclopiazónico (CPA; inhibidor de la ATPasa del RS, 10 μM) + cafeína (agonista de los receptores de ryanodina, 10 mM), n-etilmaleimida (NEM; desacoplador de las proteínas G triméricas, 100 μM), Y-27632 (inhibidor de ROCK, 10 μM), nifedipina (bloqueador de los VDCC_L, 1 μM) o Bay K8644 (activador de los VDCC_L 1 μM). En un grupo de experimentos se usaron Y-27632 y Bay K8644 de forma simultánea y en las mismas concentraciones ya señaladas. Los fármacos presentes en la solución de Krebs 0 Ca²⁺ fueron incubados durante 10 min. Después se realizó una estimulación con KCl 60 mM y se esperó a que se observara una respuesta de contracción transitoria.

Fármacos

8-(Dietilamino)octil-3,4,5-trimetoxibenzoato (TMB-8), ácido ciclopiazónico (CPA), cafeína, n-etilmaleimida (NEM), (R)-(+)-trans-4-(1-aminoetil)-N-(4-piridil)ciclohexanocarboxamida (Y-27632), nifedipina y metil-1,4-dihidro-2,6-dimetil-3-nitro-4-(2-trifluorometilfenil)-piridina-5-carboxilato (Bay K8644) fueron comprados a Sigma (St. Louis, MO, USA). Todos los reactivos se disolvieron en agua desionizada, excepto la nifedipina y el Bay K8644 que fueron disueltos en DMSO y luego en agua desionizada de manera que la concentración de DMSO fuera menor al 0.1%.

Cafeína y ácido ciclopiazónico para favorecer la disminución de la $[Ca^{2+}]$ del RS

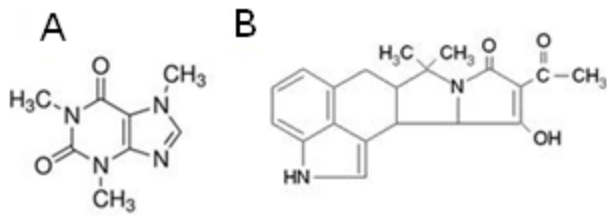


Figura 6A y 6B.. Estructura química de la (A) cafeína y del (B) CPA.

La eliminación del Ca^{2+} del medio extracelular conlleva a que las únicas fuentes de Ca^{2+} para la contracción sean el RS y las mitocondrias. En este abordaje se prescinde del efecto de las mitocondrias por considerar que, en el músculo liso, el RS es un almacén de Ca^{2+} rápidamente disponible y mucho más significativo. Al usar cafeína (Figura 6A) y CPA (figura 6B) se promueve una disminución importante del contenido de Ca^{2+} del RS (4), de tal manera que la contracción se ve claramente mermada al estimular al MLVA después de la incubación con estos fármacos.

La cafeína es capaz de activar directamente el mecanismo de salida de Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} a través de la activación de los receptores de ryanodina (RyR) en el RS. En experimentos anteriores realizados en nuestro laboratorio se demostró que la cafeína a una concentración de 10 mM es capaz de liberar Ca^{2+} de RS en tráquea de bovino, así como de acelerar la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ en medio KH 0 Ca^{2+} (4).

Los inhibidores de la SERCA, como el CPA, son capaces de evitar la recaptura del Ca^{2+} del citosol al RS. En células de músculo liso de diferentes especies, la inhibición de la SERCA provoca una elevación continua y constante de las $[Ca^{2+}]_i$; sin embargo, existen evidencias de que en bovino esto no ocurre (21). En la investigación se utilizan con frecuencia el CPA (reversible) y la tapsigargina (irreversible) como inhibidores de la SERCA. Se sabe que el CPA puede utilizarse a una concentración de 5 μ M y podría ser irreversible si se utiliza a 10 μ M en miocitos aislados de tráquea de bovino (21). En MLVA de bovino en órgano aislado, el CPA a una concentración de 10 μ M presenta resultados significativos (39).

Antagonistas del receptor a IP_3 del RS

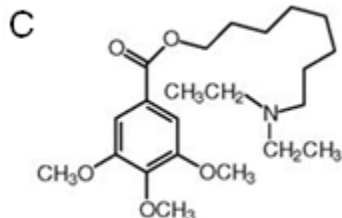


Figura 6C. Estructura química del TMB-8.

Los antagonistas del receptor a IP_3 (IP_3R) en el RS se utilizan experimentalmente con frecuencia para demostrar la liberación de Ca^{2+} del RS dependiente de la activación de este receptor. Los antagonistas del IP_3R presentan baja permeabilidad, en la bibliografía se reportan algunas herramientas farmacológicas que permiten inhibir a este receptor:

el 2-aminoetoxidifenilborato (2-APB; 40), la heparina (74), el 8-(N,N-diethylamino)-octil-3,4,5-trimetoxibenzoato (TMB-8; 72) y la xestospongina C (1). Todos ellos presentan cierto grado de especificidad y sus mecanismos de acción no están del todo dilucidados. De hecho, Liu Q y colaboradores (40) utilizaron 2-APB, heparina y xestospongina C en células aisladas de MLVA de ratón y observaron efectos fisiológicos diferentes.

Nuestro grupo ya ha demostrado la eficacia del TMB-8 en MLVA de cobayo (26). El TMB-8 (Figura 6C) inhibe preferentemente la liberación de Ca^{2+} del RS mediada por IP_3 (30). Se ha demostrado que en presencia de TMB-8 50 μM se inhibe efectivamente la liberación de Ca^{2+} inducida por carbacol (agonista de receptores M_3 ; 72).

Desacopladores de las proteínas G triméricas

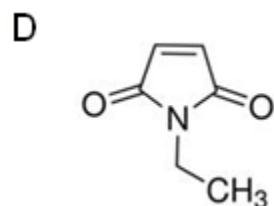


Figura 6D.. Estructura química del NEM.

Los desacopladores de las proteínas G triméricas inhiben la activación de dichas proteínas. En el presente trabajo, se utilizó NEM (Figura 6D). En experimentos anteriores realizados en nuestro laboratorio se demostró que a una concentración de 30 μM de NEM es posible desacoplar las proteínas G del MLVA

de cobayo (45). Para corroborar la efectividad del NEM en el MLVA de bovino se realizaron curvas dosis-respuesta a carbacol con preparaciones *in vitro* incubadas con 100 μM de NEM; estos experimentos, realizados con una n pequeña, sugieren que, en

este tejido y a esa concentración, NEM disminuye en ~35% la contracción inducida por carbacol (datos no mostrados).

Dihidropiridinas/Bay K8644

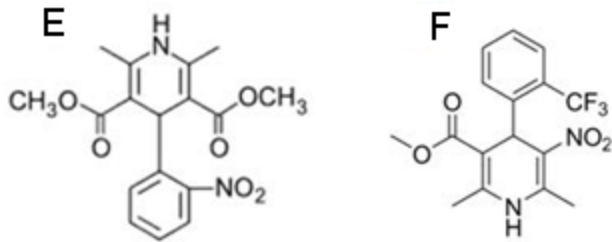


Figura 6E y 6F. Estructura química de la (E) nifedipina y del (F) Bay K8644 .

La apertura y cierre de los diferentes canales iónicos dependientes de voltaje en la membrana plasmática son el resultado de la modificación del potencial de membrana de una célula (ΔE_M). El potencial de membrana en reposo (E_M) en el MLVA fluctúa entre -70 y -30 mV (31). Cuando ese valor se desplaza a valores más electropositivos, la MP se depolariza. Los diversos canales iónicos dependientes de voltaje tienen umbrales determinados, es decir, se abren o cierran en un rango de voltaje específico. Los VDCC_L se activan en un rango de -45 a -25 mV y alcanzan su máxima actividad entre 0 y +20 mV. Cuando la MP del MLVA ha alcanzado ~10 mV se comienzan a abrir los canales de K⁺ dependientes de voltaje, permitiendo la salida de este catión e hiperpolarizando la MP (31). Los fármacos que abren canales de Ca²⁺ son denominados activadores y los que cierran canales de Ca²⁺ bloqueadores (67). Los bloqueadores de los canales de Ca²⁺ son grupos heterogéneos desde el punto de vista químico, farmacológico y terapéutico. Los VDCC_L son bloqueados por dihidropiridinas (nifedipina, nicardipina y nitrendipina) o por fenilalquilaminas (verapamil y D-600/hidrocloruro de metoxiverapamil). Estos bloqueadores tienen selectividad por los diferentes subtipos de canales de Ca²⁺ y ésta está definida por la subunidad α_1 y la subunidad β (6; 8; 17; 70).

La nifedipina (Figura 6E) es una 1,4-dihidropiridina que bloquea los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje tipo L (VDCC_L) evitando el paso del Ca²⁺ a través de ellos (67); recientemente se reportó que, aparentemente, también evitan la actividad del

sensor de voltaje de los VDCC_L, interfiriendo con la vía de señalización de la RhoA/ROCK (22). Se ha determinado que a una concentración de 1 μM la nifedipina actúa efectivamente sobre el VDCC_L del MLVA *in vitro* (31; 35; 39).

Por su parte, Bay K8644 (Figura 6F) es un activador de los VDCC_L que incrementa la probabilidad de apertura de los mismos. En experimentos previos se determinó en el laboratorio la efectividad del Bay K8644 en el MLVA a una concentración de 1 μM (44).

Inhibidores de la cinasa de Rho (ROCK)

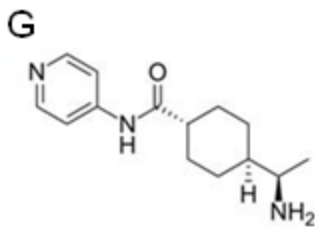


Figura 6G. Estructura química del Y-27632.

Los inhibidores de la cinasa de Rho (ROCK) disminuyen la contracción al aumentar la actividad de la MLCP. Gracias al reciente desarrollo de inhibidores altamente selectivos de ROCK como el Y-27632 y el HA-1077, se ha facilitado ampliamente el estudio de la vía de señalización de RhoA/ROCK (57).

El Y-27632 (Figura 6G) es un derivado permeable de la piridina. Bloquea la actividad de la ROCK al competir con su sitio de unión al ATP, es el fármaco más utilizado para la inhibición de ROCK en investigación y se utiliza a concentraciones no mayores de 10 μM para asegurar su selectividad (23; 35; 39; 43). Tiene una K_i para ROCK de 0.22 μM y se considera selectiva para ROCK (33). La concentración utilizada es menor que la K_i para la proteína cinasa A (25 μM), proteína cinasa C (PKC; 73 μM) y MLCK (250 μM). Se sabe que en músculo liso vascular podría tener inespecificidad con la PKC a la concentración utilizada; sin embargo, se ha comprobado que en músculo liso de vía aérea esto no ocurre (43). Se han desarrollado otros análogos del Y-27632 con constantes inhibitorias para ROCK y propiedades relajantes similares; sin embargo, no son los de elección por ser menos selectivos (57). Por otro lado, aunque hay evidencias de que la eficacia puede variar dependiendo de la especie y el tipo de tejido,

se sabe que el Y-27632 es efectivo para inhibir la contracción inducida por KCl en la mayoría de los tejidos, excepto músculo liso de molleja de pollo (52).

La 1-(5-isoquinolinesulfonil)-homo-piperazina (HA-1077) tiene una afinidad similar al Y-27632 por la ROCK (56); aunque su selectividad comparada con la del Y-27632 es pobre. Existen otros derivados del HA-1077 como el H-1152P que tienen inclusive una mejor selectividad que el Y-27632 (57).

Análisis estadístico

Los resultados se expresan en porcentaje de contracción con respecto a la tercera estimulación con KCl 60 mM en medio KH con Ca^{2+} . Se utilizó la prueba de *t* de Student no pareada con 2 colas. En la comparación de más de dos grupos, se aplicó un análisis de varianza seguida por una prueba de Dunnett. Se grafican promedio \pm EE. La significancia se estableció en $p \leq 0.05$, bimarginal. En todos los estudios la $n \geq 6$ corresponde a animales diferentes.

Resultados

Efecto de la disminución de la $[Ca^{2+}]$ del retículo sarcoplásmico sobre la contracción a KCl en un medio KH 0 Ca^{2+}

La cafeína permite la salida de Ca^{2+} del RS al estimular los RyR. El CPA inhibe a la SERCA lo que inhibe la recaptura de Ca^{2+} del citoplasma al RS. Esta intervención farmacológica permite disminuir la concentración de Ca^{2+} en el RS. La respuesta de contracción del MLVA en medio KH 0 Ca^{2+} estimulado con KCl 60 mM (grupo control) comparada con el grupo sujeto a CPA y cafeína fue significativamente diferente ($p < 0.01$, figura 7A, 7B), corroborando así que la contracción depende del Ca^{2+} del RS. La relación entre la contracción y la $[Ca^{2+}]$ del RS, se confirmó prolongando la incubación con CPA y cafeína a 20 min; al añadir KCl no se observó ninguna respuesta (datos no mostrados); estos experimentos permitieron el completo vaciado del RS y demuestran la participación del Ca^{2+} reticular en la contracción transitoria.

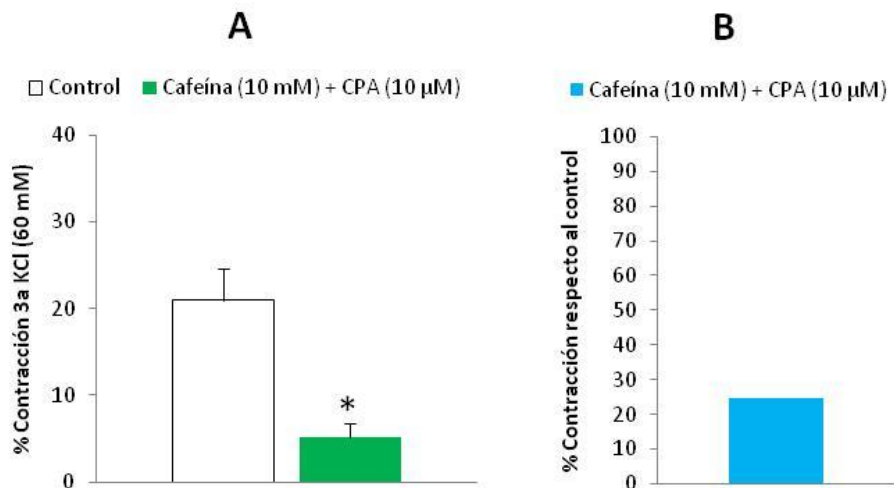


Figura 7. Efecto de la cafeína (10 mM) y ácido ciclopiazónico (CPA; 10 µM) sobre la contracción inducida por KCl en un medio 0 Ca^{2+} . (A) Este tratamiento disminuye significativamente la contracción por KCl. (B) Remanente porcentual de contracción con respecto al control (referido al 100%) después del tratamiento. Las barras en (A) representan promedio \pm EE. * $p < 0.01$, n=9.

Participación del receptor a IP_3 en la contracción por KCl en un medio KH 0 Ca^{2+}

Una vez determinada la participación del Ca^{2+} reticular, se buscó reconocer alguno de los mecanismos de su salida desde el RS. Para estudiar si esta salida es favorecida por el IP_3R , se usó un antagonista de este receptor, el TMB-8. En la figura 8A y 8B se muestra que el TMB-8 (50 μ M) abate significativamente la respuesta de contracción ($p < 0.01$). Estos resultados evidencian que el receptor de IP_3 del RS participa en la contracción en medio KH 0 Ca^{2+} .

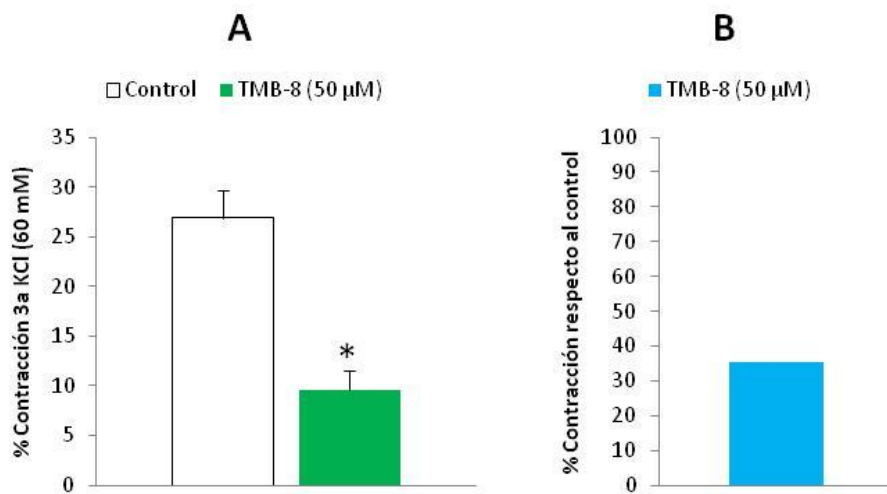


Figura 8. Efecto de la inhibición farmacológica del receptor de IP_3 del RS sobre la contracción por KCl en un medio 0 Ca^{2+} . (A) La incubación con TMB-8 (50 μ M) redujo significativamente la contracción por KCl en un medio 0 Ca^{2+} . (B) Remanente porcentual con respecto al control (referido al 100%) de la contracción inducida por KCl en el grupo experimental. Las barras en (A) representan promedio \pm EE. * $p < 0.01$, $n=6$

Efecto del desacople farmacológico de las proteínas G triméricas

Al reconocer que ocurría la activación de los IP_3R , pensamos que la vía de G_q -PLC- IP_3 podría estar involucrada. En experimentos realizados en nuestro laboratorio se demostró que el NEM es un desacoplador de proteínas G para el cobayo, puesto que a una concentración de 30 μM disminuye la relajación inducida por los receptores $P2Y_2$ y $P2Y_4$ (45). En estudios preliminares de esta tesis demostramos que, en el MLVA del bovino, NEM a una concentración de 100 μM reduce las contracciones a carbacol ~ 35%, demostrando así su eficacia en este tejido. La incubación con NEM 100 μM en un medio KH 0 Ca^{2+} no produjo una disminución significativa en la contracción inducida por KCl (Fig 9A y 9B). Estos resultados sugieren que no hay participación de las proteínas G triméricas en la contracción del MLVA.

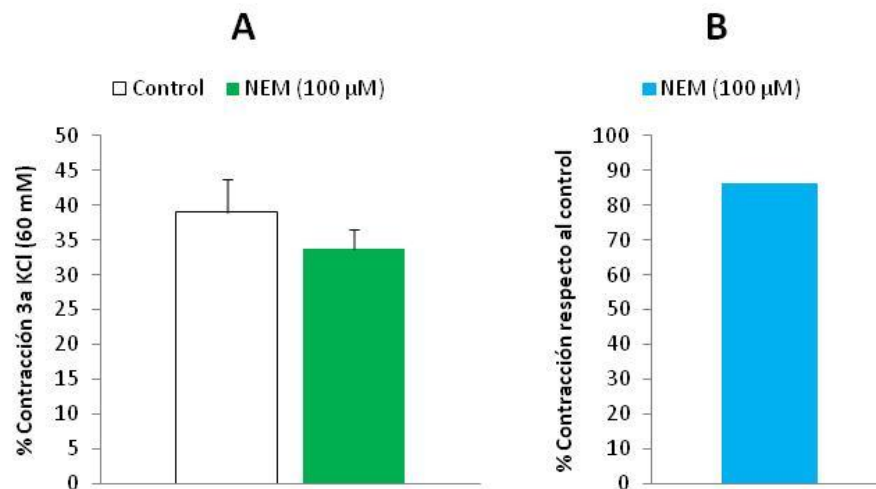


Figura 9. Efecto del desacople farmacológico de las proteínas G triméricas sobre la contracción inducida por KCl en medio 0 Ca^{2+} . (A) El grupo experimental incubado con NEM (100 μM , barra verde) no mostró diferencias con relación al control. (B) Remanente porcentual con respecto al control (referido al 100%) de la contracción inducida por KCl en el grupo experimental. Las barras en (A) representan promedio \pm EE; n=7.

Efecto de la activación o el bloqueo farmacológicos del VDCC_L

Para evaluar la participación de los VDCC usamos nifedipina y Bay K8644. La nifedipina disminuye significativamente la contracción en medio KH 0 Ca²⁺ y con EGTA 0.1 mM con respecto al control (Fig 10A, 10B). Por su parte, el Bay K8644 aumenta significativamente la respuesta a un estímulo con KCl 60mM en medio KH 0 Ca²⁺ y con EGTA 0.1 mM (Fig 10C). Estos resultados evidencian la participación del VDCC_L en la contracción del MLVA bajo estas condiciones.

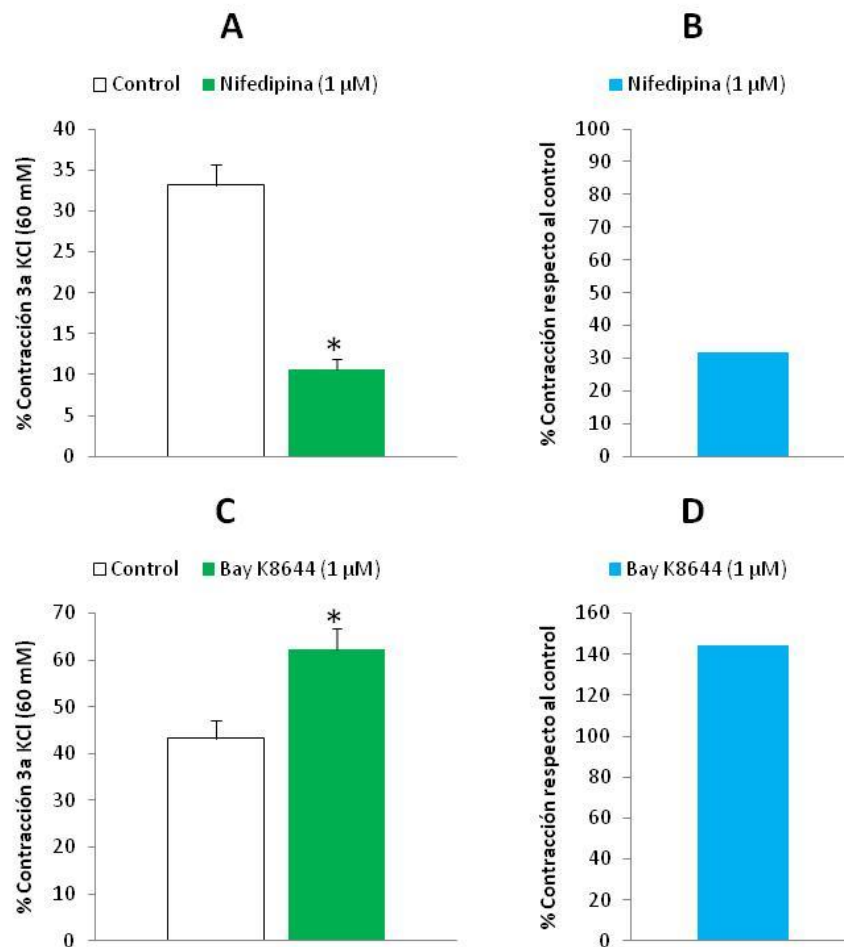


Figura 10. Efecto de la activación o el bloqueo farmacológico del VDCC_L sobre la contracción inducida por KCl en un medio 0 Ca²⁺. (A) Efecto del bloqueo del VDCC_L con nifedipina (1 μM). La respuesta a KCl después de este tratamiento disminuyó significativamente (*p<0.01, n=9). (B) Remanente porcentual con respecto al control (referido al 100%) de la contracción inducida por KCl en el grupo experimental con nifedipina. (C) Efecto de la activación del VDCC_L con Bay K8644 (1 μM). Este fármaco incrementó significativamente la contracción inducida por KCl (*p<0.01, n=8). (D) Remanente porcentual con respecto al control (referido al 100%) de la contracción inducida por KCl en el grupo preincubado con Bay K8644. En (A) y (C) se grafican promedios ± EE.

Efecto de la inhibición de la cinasa de Rho (ROCK) sobre la contracción del MLVA inducida por KCl en un medio KH 0 Ca²⁺

De igual forma, se quería conocer si esta contracción también era dependiente de la vía de la RhoA/ROCK. El Y-27632 a estas concentraciones inhibe selectivamente a la ROCK. En la figura 11A y 11B se observa que la incubación del tejido en un medio KH 0 Ca²⁺ y con Y-27632 10 µM disminuye significativamente la contracción del tejido inducida por KCl. Estos resultados evidencian que la vía de la RhoA/ROCK es activada tras una depolarización con KCl 60 mM.

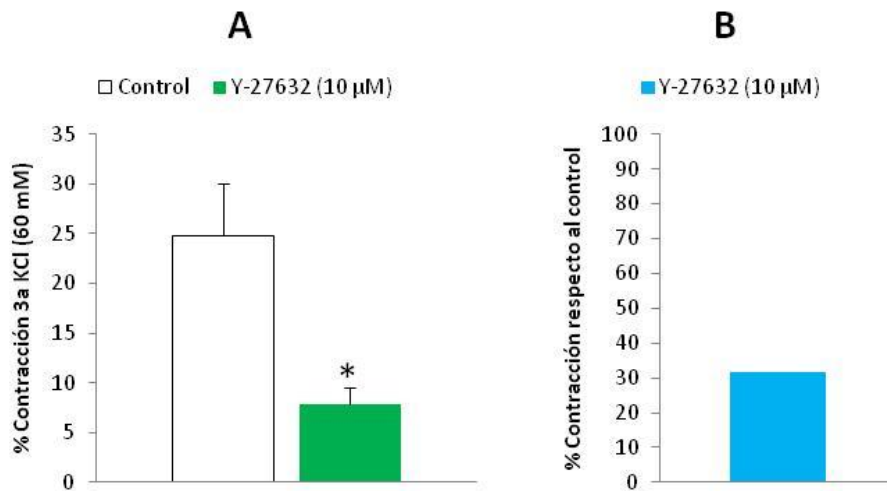


Figura 11. Efecto de la inhibición farmacológica de la cinasa de Rho (ROCK) sobre la contracción inducida por KCl en un medio 0 Ca²⁺. (A) La adición de Y-27632 (10 µM) disminuyó la contracción del MLVA inducida por KCl en medio 0 Ca²⁺ (*p<0.01, n=8). (B) Remanente porcentual con respecto al control (referido al 100%) de la contracción inducida por KCl en el grupo experimental. En (A) se grafican promedios ± EE.

Efecto de la adición simultánea de un activador del VDCC_L y un inhibidor de la cinasa de Rho (ROCK)

Finalmente, para evaluar la relación entre la actividad de ROCK y la de los VDCC_L, se decidió utilizar Y-27632 en conjunto con Bay K8644. La sola adición del inhibidor farmacológico de ROCK disminuyó significativamente la contracción por KCl en medio KH 0 Ca²⁺ ($p < 0.05$), mientras que la presencia de Bay K8644 la aumentó significativamente ($p < 0.01$). La combinación de ambos fármacos no dio diferencia con respecto al control (Figura 12). Estos resultados demuestran que la activación de los VDCC_L se relaciona con la actividad de ROCK; a mayor actividad de los VDCC_L (por efecto del Bay K8644) menor es la eficacia del Y-27632.

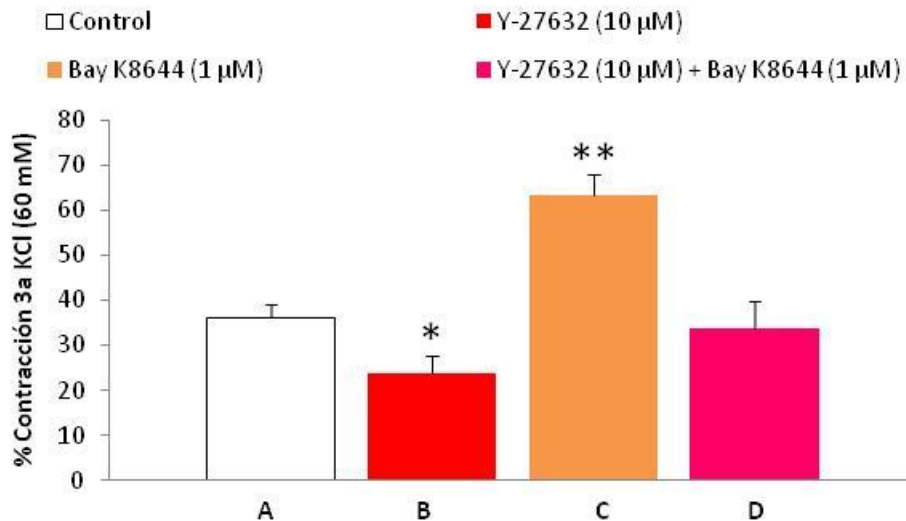


Figura 12. Efecto de la adición simultánea de un activador de VDCC_L y un inhibidor de la cinasa de Rho (ROCK) sobre la contracción por KCl en un medio 0 Ca²⁺. (A) Control (B) Efecto de la inhibición de la cinasa de Rho mediante la incubación de Y-27632 (10 μM). Este fármaco disminuyó significativamente la contracción inducida por KCl (* $p < 0.05$, $n=6$). (C) Efecto de la activación del VDCC_L con Bay K8644 (1 μM). Este fármaco incrementó significativamente la contracción inducida por KCl (** $p < 0.01$, $n=6$). (D) Efecto de la activación del VDCC_L con Bay K8644 (1 μM) en conjunto con la inhibición de la ROCK mediante Y-27632 (10 μM). La combinación de ambos fármacos no tiene diferencia con respecto al control ($n=6$). Se grafican promedios \pm EE.

Discusión

La contracción inducida por la depolarización de la membrana en MLVA se entendía como un proceso mediado únicamente por la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L (VDCC_L) y la concomitante entrada de Ca^{2+} extracelular. En la actualidad se sabe que, bajo el mismo estímulo, ocurren otros procesos capaces de producir contracción (35; 39; 43; 52). Estos procesos involucran cascadas de señalización que permiten el aumento de las concentraciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a expensas del RS, el principal reservorio de Ca^{2+} de la célula.

La contracción en medio KH 0 Ca^{2+} es dependiente del Ca^{2+} del RS

La disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]$ del RS, consistente en la adición simultánea de CPA y cafeína, fue eficaz. Se observa una significativa disminución en la contracción inducida por KCl 60 mM en medio KH 0 Ca^{2+} con respecto al grupo control. El Ca^{2+} que induce la contracción en esta condición experimental debe provenir principalmente del RS dado que no es posible obtenerlo del medio extracelular. Por otro lado, conocemos que, aun sin la intervención farmacológica, el RS disminuye muy importantemente su concentración de Ca^{2+} al paso del tiempo en medio KH 0 Ca^{2+} (4). Por esta razón, el tiempo de permanencia del tejido en un medio KH 0 Ca^{2+} determina su capacidad de contracción. Puesto que el tiempo de permanencia del MLVA de bovino en medio KH 0 Ca^{2+} fue estandarizado a 10 minutos en todos los protocolos experimentales, se confirma que la contracción es dependiente de al menos uno de los reservorios de Ca^{2+} de la célula.

Cabría esperar que toda liberación de Ca^{2+} del RS originara una contracción. Como sabemos, la concentración de Ca^{2+} en distintas regiones de la célula es muy ordenada y regulada, debido a la amplia variedad de actividades fisiológicas en que participa este ion (50). Puesto que la sola adición de CPA y cafeína no generó ninguna contracción medible mediante órgano aislado en el tiempo de incubación, sugerimos que el Ca^{2+} reticular que se concentró en el citoplasma durante ese periodo fue

rápidamente extruido de la célula por alguno de los mecanismos de regulación (principalmente la PMCA). De esta forma, se puede pensar que, en condiciones 0 Ca^{2+} extracitoplasmático, la depolarización química de la membrana es la única responsable de generar una salida ordenada y suficiente de Ca^{2+} reticular tal que se permita la contracción transitoria del músculo.

El receptor a IP_3 participa en la liberación de Ca^{2+} del RS

Habiendo definido el origen del Ca^{2+} que participa en la contracción transitoria, se generó la inquietud respecto a los mecanismos por los que el RS permite la salida del Ca^{2+} durante la depolarización con KCl. Enseguida se pensó en los dos mecanismos principales que liberan Ca^{2+} del RS: los receptores de ryanodina (RyR) y los receptores de IP_3 (IP_3R). Se sabe que en el músculo esquelético, el VDCC_L está acoplado físicamente al RyR e induce la salida masiva de Ca^{2+} del RS al sensar un cambio en la polaridad de la MP sin el flujo de Ca^{2+} extracelular al interior de la célula. Cuando esto ocurre, se dice que los RyR presentan una liberación de Ca^{2+} inducida por voltaje (VICR, 40). Sin embargo, en el MLVA no se ha demostrado que los RyR estén acoplados físicamente a los VDCC_L ni tampoco existen evidencias del fenómeno VICR pero sí del fenómeno de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR). Para activar la CICR, se requiere de cierta concentración de Ca^{2+} en la región cercana al RyR, *i. e.* la depolarización en este músculo liso *per se* no ocasiona la liberación del Ca^{2+} del RS a través de los RyR. En cambio, se sabe que la salida de Ca^{2+} del RS a través de los receptores de IP_3 induce a su vez la salida de Ca^{2+} a través de los RyR en un proceso denominado CICR (24; 40). Por esta razón se descartaron los RyR como el origen del estímulo para la liberación de Ca^{2+} del RS en nuestras condiciones experimentales y se consideraron los IP_3R .

La inhibición farmacológica del IP_3R disminuyó significativamente la contracción inducida por KCl 60 mM en medio KH 0 Ca^{2+} . Estos resultados indican la clara participación de este receptor-canal en la liberación de Ca^{2+} bajo estas condiciones

experimentales. Más aún, nuestros hallazgos coinciden con los obtenidos para el MLVA de ratón en medio KH (40). Como se mencionó con anterioridad, no existe evidencia de la activación de los RyR al depolarizar la membrana; por lo tanto, en primera instancia, el Ca^{2+} del RS debe provenir del IP_3R .

Las proteínas G triméricas no participan en la activación del IP_3R en el MLVA de bovino

En el músculo liso vascular, el VDCC_L está directamente implicado en la activación de las proteínas G triméricas (18; 22). Recientemente, Fernández-Tenorio y col., (23) demostraron que durante la depolarización sostenida en el músculo liso vascular, el canal presenta cambios conformacionales necesarios para activar la vía de señalización proteína G_q -PLC- IP_3 - IP_3R y, además, aporta el Ca^{2+} extracitoplasmático necesario para rellenar al RS y mantener la activación de RhoA/ROCK.

En cuanto al MLVA, las proteínas $\text{G}_{\alpha q}$ pueden ser activadas cuando un agonista adecuado ocupa el receptor muscarínico M_3 o bien por el VDCC_L cuando se depolariza la MP (40). Al ser activadas permiten la activación de la $\text{PLC}\beta$ que, como todas las PLC, escinde el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato para formar DAG e IP_3 . Con el fin de dilucidar si en MLVA de bovino, la depolarización de la MP genera IP_3 por la activación de proteínas triméricas $\text{G}_{\alpha q}$ como lo reportaron Liu Q y col., para las vías aéreas del ratón (39), se propuso desacoplar farmacológicamente dichas proteínas. En experimentos preliminares se demostró que la contracción promovida por la activación de los receptores M_3 a través de carbacol es inhibida en ~35% por NEM 100 μM (desacoplador de las proteínas G), demostrando así que NEM es efectivo desacoplador de proteínas G triméricas en MLVA de bovino. Sin embargo, nuestros resultados demostraron que la contracción inducida por KCl 60 mM en un medio KH 0 Ca^{2+} incubado con NEM 100 μM es igual a la del control, sugiriendo que las proteínas G no están implicadas en la liberación del Ca^{2+} proveniente del RS. La relación entre el VDCC_L , la depolarización de la MP y el eje de señalización proteína G_q -PLC- IP_3 - IP_3R

parece estar determinado por el tejido y la especie animal. Por esta razón, es necesario hacer investigación más exhaustiva con el fin de conocer los mecanismos que provocan la activación de los IP₃R en MLVA de bovino y la concomitante liberación de Ca²⁺.

Los VDCC_L son capaces de modular la contracción en un medio KH 0 Ca²⁺

Fernández-Tenorio y col. (23) demostraron que, en músculo liso vascular, los VDCC_L están directamente involucrados en la liberación de Ca²⁺ reticular cuando se depolariza la MP. Para evaluar la participación de estos canales catiónicos en la contracción transitoria del MLVA en medio KH 0 Ca²⁺, se bloquearon con nifedipina o bien, se activaron con Bay K8644. Este es uno de los resultados más sorprendentes de este trabajo puesto que se esperaba que dichos canales no tuvieran ninguna participación. Los VDCC_L se encuentran en la MP y se abren al sentir cambios en el potencial de membrana permitiendo la entrada de Ca²⁺ del medio extracelular hacia el citoplasma, es más, son considerados altamente específicos en su selectividad catiónica al Ca²⁺. Al no haber Ca²⁺ extracelular, se pensó que los VDCC_L simplemente no participarían y que los resultados del control serían iguales a los de los tejidos incubados con nifedipina o Bay K8644. No obstante, la incubación con nifedipina 1 μM disminuyó significativamente la contracción inducida por KCl 60 mM en medio KH 0 Ca²⁺, a la vez que la incubación con Bay K8644 1 μM aumentó la contracción bajo las mismas condiciones con respecto al control. Los resultados demuestran que el canal está implicado en la contracción transitoria del MLVA en medio KH 0 Ca²⁺, lo anterior concuerda con lo reportado en músculo liso vascular (18; 23). La similitud entre ambos tipos de músculos, podría también sugerir que la manipulación del VDCC_L en medio KH 0 Ca²⁺ provoca que el canal se vuelva inespecífico al Ca²⁺, como señalan Fernández-Tenorio y col., para el MLV (22). De ahí que se proponga que esta contracción transitoria del MLVA: a) involucra al VDCC_L, que parece estar participando en la depolarización de la MP, regulando así la salida de Ca²⁺ del RS. b) el VDCC_L modifica su especificidad catiónica cuando se depolariza al MLVA en un medio KH 0 Ca²⁺.

Postulamos que los VDCC_L se vuelven permeables a Na⁺, ya que es el catión más abundante y de radio iónico similar al del Ca²⁺. La entrada de Na⁺ sería entonces la responsable de modificar el potencial de membrana.

La depolarización de la membrana favorecida por los VDCC_L en medio KH 0 Ca²⁺ activa a la ROCK

Al comprobarse en experimentos por separado, que el grado de apertura de los VDCC_L y ROCK tenían ambas implicaciones en el mecanismo de contracción en medio KH 0 Ca²⁺, se decidió probar si la apertura de dichos canales (y consecuentemente la ΔE_M generado por KCl) se relaciona con la activación de la ROCK bajo las mismas condiciones experimentales. En 2005, Liu y col., (39) descartaron que la activación de la ROCK por un estímulo del MLVA con KCl, involucrara a la calcio-calmodulin cinasa, la PKC o la PKA, pero establecieron que la activación de dicha cinasa depende de: a) la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$; y b) probablemente de la depolarización de la membrana *per se*. Mediante el uso de Y-27632 combinado con Bay K8644 se corroboró que la sola depolarización de la membrana en un medio KH 0 Ca²⁺ es suficiente para activar a la ROCK en MLVA de bovino. Este resultado (Figura 11) no deja duda de que la ΔE_M genera la activación de la cinasa; la activación del VDCC_L con Bay K8644 es capaz de anular el efecto del Y-27632, puesto que el grupo experimental es igual al grupo control, poniendo de manifiesto que a mayor ΔE_M , mayor activación de ROCK; es decir, la cascada que activa a la ROCK está relacionada de alguna manera con el VDCC_L. También en este sentido, el MLVA de bovino presenta similitudes con el músculo liso vascular de ratón, en el que se ha demostrado que la activación de la RhoA/ROCK depende del grado de depolarización promovido por los VDCC_L (23).

Es necesario realizar más experimentos para dilucidar si ΔE_M está también relacionada con la liberación de Ca²⁺ del RS en este modelo experimental.

Conclusiones

- La depolarización del MLVA de bovino inducida por KCl 60 mM en medio KH 0 Ca^{2+} induce una contracción transitoria dependiente del Ca^{2+} proveniente del RS y liberado a través de la estimulación de los receptores de IP_3 .
- La generación de IP_3 no está relacionada con la activación de una proteína G trimérica.
- La magnitud de la contracción transitoria del MLVA de bovino depende de la concentración de Ca^{2+} en el RS.
- La ROCK participa en la contracción transitoria de MLVA de bovino y su actividad, bajo estas condiciones (ausencia de Ca^{2+} extracelular), depende de la dinámica del VDCC_L .
- El estado del VDCC_L (sea bloqueado por nifedipina o activado por Bay K8644) tiene influencia directa sobre la magnitud de la contracción transitoria, bajo estas condiciones experimentales.

Bibliografía

1. Ahn Ta T, Feng W, Molinski T y Pessah I, 2006. Hydroxylated xetospongins block inositol-1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release and sensitize Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mediated by ryanodine receptors. *Mol Pharmacol.* 69 (2), 532-538.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, Wilson J y Hunt T. *Molecular Biology of the Cell*, 2008. 5a edición. Garland Science: New York. Pp. 904-920, 1010-1052.
3. Bahouth SW, Wang HY y Malbon CC, 1991. Immunological approaches for probing receptor structure and function. *Trends Pharmacol Sci.* 12 (9), 338-343.
4. Bazán-Perkins B, Sánchez-Guerrero E, Carbajal V, Barajas-López C y Montaña LM, 2000. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} depletion by caffeine and changes of $[Ca^{2+}]_i$ during refilling in bovine airway smooth muscle cells. *Arch Med Res.* 31 (6), 558-563.
5. Berg JS, Powell BC y Cheney RE, 2001. A millennial myosin census. *Mol Biol Cell.* 12 (4), 780–794.
6. Birnbaumer L, Campbell KP, Catterall WA, Harpold MM, Hofmann F, Horne WA, Mori Y, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, et al., 1994. The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* 13 (3), 505-506.
7. Bourne HR, Landis CA y Masters SB, 1989. Hydrolysis of GTP by the α -chain of Gs and other GTP binding proteins. *Proteins.* 6 (3), 222–230.
8. Cai D, Mulle J y Yue D, 1997. Inhibition of recombinant Ca^{2+} channels by benzothiazepines and phenylalkylamines: class-specific pharmacology and underlying molecular determinants. *Mol Pharmacol.* 51 (5), 872-881.
9. Carbajal V, Vargas MH, Flores-Soto E, Martínez-Cordero E, Bazán-Perkins B y Montaña LM, 2005. LTD4 induces hyperresponsiveness to histamine in bovine

airway smooth muscle: role of SR-ATPase Ca²⁺ pump and tyrosine kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 288 (1), L84-92.

10. Catterall WA, 1993. Structure and modulation of Na⁺ and Ca²⁺ channels. *Ann NY Acad Sci.* 707, 1–19.
11. Catterall WA, 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16, 521–555.
12. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP y Striessnig J, 2005. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev.* 57 (4), 411–425.
13. Cheung AH, Huang RR y Strader CD, 1992. Involvement of specific hydrophobic, but not hydrophilic, amino acids in the third intracellular loop of the β -adrenergic receptor in the activation of Gs. *Mol. Pharmacol.* 41 (6), 1061–1065.
14. Chin D, Schreiber JL y Means AR, 1999. Calmodulin kinase II chimeras used to investigate the structural requirements for smooth muscle myosin light chain kinase autoinhibition and calmodulin-dependent activation. *Biochemistry.* 38 (46), 15061-15069.
15. Clinton W, 2003. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ.* 27, 201-206.
16. Cobar L, Montañó LM, Cruz JE, Flores E, 2010. Importancia del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ en la regulación del Ca²⁺ intracelular en el músculo liso de las vías aéreas. *Neumol Cir Torax.* 69 (1), 39-45.
17. De Waard M, Scott VE, Pragnell M, Campbell KP, 1996. Identification of critical amino acids involved in α 1- β interaction in voltage dependent Ca²⁺ channels. *FEBS Lett.* 380 (3), 272-276.

18. Del Valle-Rodríguez A, López-Barneo J y Ureño J, 2003. Ca²⁺ channel-sarcoplasmic reticulum coupling: a mechanism of arterial myocyte contraction without Ca²⁺ influx. *Embo J.* 22 (17), 4337-4345.
19. Dolmetsch RE, Pajvani U, Fife K, Spotts JM y Greenberg ME, 2001. Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science.* 294 (5541), 333–339.
20. Du W, McMahon T, Zhang Z, Stiber J, Meissner G y Eu J, 2006. Excitation-contraction coupling in airway smooth muscle. *J Biol Chem.* 281 (40), 30143-30151.
21. Ethier MF, Yamaguchi H y Madison J, 2001. Effects of cyclopiazonic acid on cytosolic calcium in bovine airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 281 (1), L126-L133.
22. Fernández-Tenorio M, González-Rodríguez P, Porrás C, Castellano A, Moosmang S, Hofmann F, Ureña J y López-Barneo J, 2010. Short communication: genetic ablation of L-type Ca²⁺ channels abolishes depolarization-induced Ca²⁺ release in arterial smooth muscle. *Circ Res.* 106 (7), 1285-1289.
23. Fernández-Tenorio M, Porrás-González C, Castellano A, Del Valle-Rodríguez A, López Barneo J y Ureña J, 2011. Metabotropic Regulation of RhoA/Rho-Associated Kinase by L-type Ca²⁺ Channels, New Mecanism for Depolarization-Evoked Mammalian Arterial Contraction. *Circ Res.* 108 (11), 1348-1357.
24. Fill M y Copello JA, 2002. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev.* 82 (4), 893-922.
25. Flores-Soto E, Carbajal V, Reyes-García J, García-Hernández LM, Figueroa A, Checa M, Barajas-López C y Montañó LM, 2011. In airway ATP refills sarcoplasmic reticulum via P2X smooth muscle receptors and induces contraction through P2Y epithelial receptors. *Pflugers Arch.* 461 (2), 261-275.

26. Flores-Soto E, Reyes-García J, Sommer B, Chavez J, Barajas-López C y Montaña LM, 2012. PPADS, a P2X receptor antagonist, as a novel inhibitor of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in guinea pig airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 674 (2-3), 439-444.
27. Fong TM y Strader CD, 1994. Functional mapping of the ligand binding sites of G-protein coupled receptors. *Med. Res. Rev.* 14 (4), 387–399.
28. Haggerty C, Ness R, Kelsey S y Waterer G, 2003. The impact of estrogen and progesterone on asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 90 (3), 284-291.
29. Hartshorne DJ, Ito M y Erdödi F, 1998. Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil.* 19 (4), 325-341.
30. Haughey N, Holden C, Nath A y Geiger J, 1999. Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate- regulated stores of intracellular calcium in calcium dysregulation and neuron cell death caused by HIV-1 protein tat. *J Neurochem.* 73 (4), 1363-1374.
31. Hirota S, Helli P y Janssen LJ, 2007. Ionic mechanisms and Ca²⁺ handling in airway smooth muscle. *Eur Respir J.* 30(1), 114-133.
32. Hockerman G, Girvin M, Malbon CC y Ruoho AE, 1996. Antagonist conformations within the β 2-adrenergic receptor ligand binding pocket. *Mol. Pharmacol.* 49 (6), 1021–1032.
33. Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M y Narumiya S, 2000. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of Rho-associated kinases. *Mol Pharmacol.* 57 (5), 976-983.
34. Ito M, Nakano T, Erdödi F y Hartshorne DJ, 2004. Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem.* 259 (1-2), 197-209.

35. Janssen L, Tazzeo T, Zuo J, Pertens E y Keshavjee S, 2004. KCl evokes contraction of airway smooth muscle via activation of RhoA and Rho-kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 287 (4), L852-L858.
36. Kobilka B y Gether U, 1998. Examination of ligand-induced conformational changes in the β 2-adrenergic receptor by fluorescence spectroscopy. *Adv. Pharmacol.* 42 (17-18), 470–473.
37. Kotlikoff M, Murray R y Reynolds E, 1987. Histamine-induced calcium release and phorbol antagonism in cultured airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 243 (4), C561-C566.
38. Lin S, Gether U y Kobilka B, 1998. Ligand stabilization of the β 2 adrenergic receptor: effect of DTT on receptor conformation monitored by circular dichroism and fluorescence spectroscopy. *Biochemistry.* 35 (46), 14445–14451.
39. Liu C, Zuo J, Pertens E, Helli P y Janssen L, 2005. Regulation of Rho/ROCK signaling in airway smooth muscle by membrane potential and $[Ca^{2+}]_i$. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 289 (4), L574-L582.
40. Liu Q, Zheng Y, Korde A, Yadav V, Rathore R, Wess J y Wang Y, 2009. Membrane depolarization causes a direct activation of G protein-coupled receptors leading to local Ca^{2+} release in smooth muscle. *PNAS.* 106 (27), 11418-11423.
41. Loukianov E, Loukianova T y Periasamy M, 1997. Myosin heavy chain isoforms in smooth muscle. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 117 (1), 13–18.
42. Majerus PW, Connolly TM, Deckmyn H, Ross TS, Bross TE, Ishii H, Bansal VS y Wilson DB, 1986. The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. *Science.* 234 (4783), 1519-1526.

43. Mbikou P, Fajmut A, Brumen M y Roux E, 2010. Contribution of Rho kinase to the early phase of the calcium-contraction coupling in airway smooth muscle. *Exp Physiol.* 96(2), 240-258.
44. Montaña LM, Barajas-López C y Daniel EE, 1996. Canine bronchial sustained contraction in Ca²⁺-free medium: role of intracellular Ca²⁺. *Can J Physiol Pharmacol.* 74 (11), 1236-1248.
45. Montaña LM, Cruz-Valderrama JE, Figueroa A, Flores-Soto E, García-Hernández LM, Carbajal V, Segura P, Méndez C, Díaz V y Barajas-López C, 2011. Characterization of P2Y receptors mediating ATP induced relaxation in guinea pig airway smooth muscle: involvement of prostaglandins and K⁺ channels. *Pflugers Arch.* 462 (4), 573-585.
46. Morano I, 2003. Tuning smooth muscle contraction by molecular motors. *J Mol Med.* 81 (8), 481–487.
47. Okagaki T, Higashi-Fujime S, Ishikawa R, Takano-Ohmuro H y Kohama K, 1991. In vitro movement of actin filaments on gizzard smooth muscle myosin: Requirement of phosphorylation of myosin light chain and effects of tropomyosin and caldesmon. *J Biochem.* 109 (6), 858–866.
48. Orrenius S, Zhivotovsky B y Nicotera P, 2003. Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(7), 552-565.
49. Persechini A, Yano K y Stemmer PM, 2000. Ca²⁺ binding and energy coupling in the calmodulin-myosin light chain kinase complex. *J Biol Chem.* 275 (6), 4199-4204.
50. Poburko D, Kuo K, Dai J, Lee C y Van Breemen C, 2004. Organellar junctions promote targeted Ca²⁺ signaling in smooth muscle: why two membranes are better than one. *Trends Pharmacol Sci.* 25 (1), 8-15.

51. Rang H, Dale M, Ritter J y Flower R. *Farmacología*, 2008. 6a edición. Barcelona: Elsevier. Pp. 134.
52. Ratz P, Berg K, Urban N y Miner A, 2005. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288 (4), C769-C783.
53. Rhee SG, 2001. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 281-312.
54. Rohrer DK y Kobilka BK, 1998. G protein-coupled receptors: functional and mechanistic insights through altered gene expression. *Physiol Rev.* 78 (1), 35-52.
55. Rovner AS, Fagnant PM, Lowey S y Trybus KM, 2002. The carboxyl-terminal isoforms of smooth muscle myosin heavy chain determine thick filament assembly properties. *J Cell Biol.* 156 (1), 113–123.
56. Sasaki Y, Suzuki M y Hidaka H, 2002. The novel and specific Rho kinase inhibitor (S)-(+)-2-methyl-1-[(4-methyl-5-isoquinoline)sulfonyl]-homopiperazine as a probing molecule for Rho-kinase-involved pathway. *Pharmacol Ther.* 93 (2-3), 225-232.
57. Schaafsma D, Gosens R, Zaagsma J, Halayko A y Meurs H, 2008. Rho kinase inhibitors: A novel therapeutical intervention in asthma? *European J Pharmacol.* 585 (2-3), 398-406.
58. Singer WD, Brown HA y Sternweis PC, 1997. Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 475-509.
59. Sobieszek A, 1977. Ca-linked phosphorylation of a light chain of vertebrate smooth-muscle myosin. *Eur J Biochem.* 73 (2), 477–483.

60. Somlyo A y Somlyo A, 2003. Ca²⁺ Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases and Myosin Phosphatase. *Physiol Rev.* 83 (4), 1325-1358.
61. Sommer B, Montaña LM, Carbajal V, Flores-Soto E, Ortega A, Ramírez-Oseguera R, Irlles C, El-Yazbi AF, Cho WJ y Daniel EE, 2009. Extraction of membrane cholesterol disrupts caveolae and impairs serotonergic (5-HT_{2A}) and histaminergic (H₁) responses in bovine airway smooth muscle: role of Rho-kinase. *Can J Physiol Pharmacol.* 87 (3), 180-195.
62. Strader CD, Fong TM, Graziano MP, Tota MR, 1995. The family of G protein-coupled receptors. *FASEB J.* 9 (9), 745-754.
63. Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RA, 1994. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem.* 63, 101-132.
64. Strader CD, Sigal IS, Dixon RA, 1989. Genetic approaches to the determination of structure-function relationships of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci.* Dec Suppl, 26-30.
65. Strosberg AD, 1991. Structure/function relationship of proteins belonging to the family of receptors coupled to GTP-binding proteins. *Eur J Biochem.* 196 (1), 1-10.
66. Stull JT, Lin PJ, Krueger JK, Trewhella J y Zhi G, 1998. Myosin light chain kinase: functional domains and structural motifs. *Acta Physiol Scand.* 164 (4), 471-482.
67. Triggle D, 1999. The pharmacology of ion channels: with particular reference to voltage-gated Ca²⁺ channels. *European J Pharmacol.* 375 (1-3), 311-325.
68. Tsien RW, Ellinor PT y Horne WA, 1991. Molecular diversity of voltage dependent Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci.* 12 (9), 349-354.

69. Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV, Bley KR y Fox AP, 1988. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.* 11 (10), 431-438.
70. Walker D y De Waard M, 1998. Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca²⁺ channels: role in channel function. *Trends Neurosci.* 21(4), 148-154.
71. Wheeler DB, Randall A y Tsien RW, 1994. Roles of N-type and Q-type Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science.* 264 (5155), 107-111.
72. Wu C, Sui G y Fry H, 2002. The role of the L-type Ca²⁺ channel in refilling functional intracellular Ca²⁺ stores in guinea-pig detrusor smooth muscle. *J Physiol.* 538 (2), 357-369.
73. Xu W y Lipscombe D, 2001. Neuronal Ca_v1.3 α 1 L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci.* 21 (16), 5944–5951.
74. Yamamoto H, Kanaide H y Nakamura M, 1990. Heparin specifically inhibits the inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release from skinned rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 341 (4), 273-278.

Anexo I: Fármacos

Bay K8644 Activador de los VDCC_L.

Metil-1,4-dihidro-2,6-dimetil-3-nitro-4-(2-trifluorometilfenil)-piridina-5-carboxilato

Cafeína Activador de los RyR.

CPA Inhibidor de la SERCA.

Ácido ciclopiazónico

NEM Desacoplador de proteínas G.

N-etilmaleimida

Nifedipina Bloqueador de los VDCC_L.

TMB-8 Antagonista del IP₃R.

8-(Dietilamino) octil-3,4,5-trimetoxibenzoato

Y-27632 Inhibidor de la ROCK.

(R)-(+)-trans-4-(1-aminoetil)-N-(4-piridil) ciclohexanocarboxamida

Anexo II: Trazos Representativos

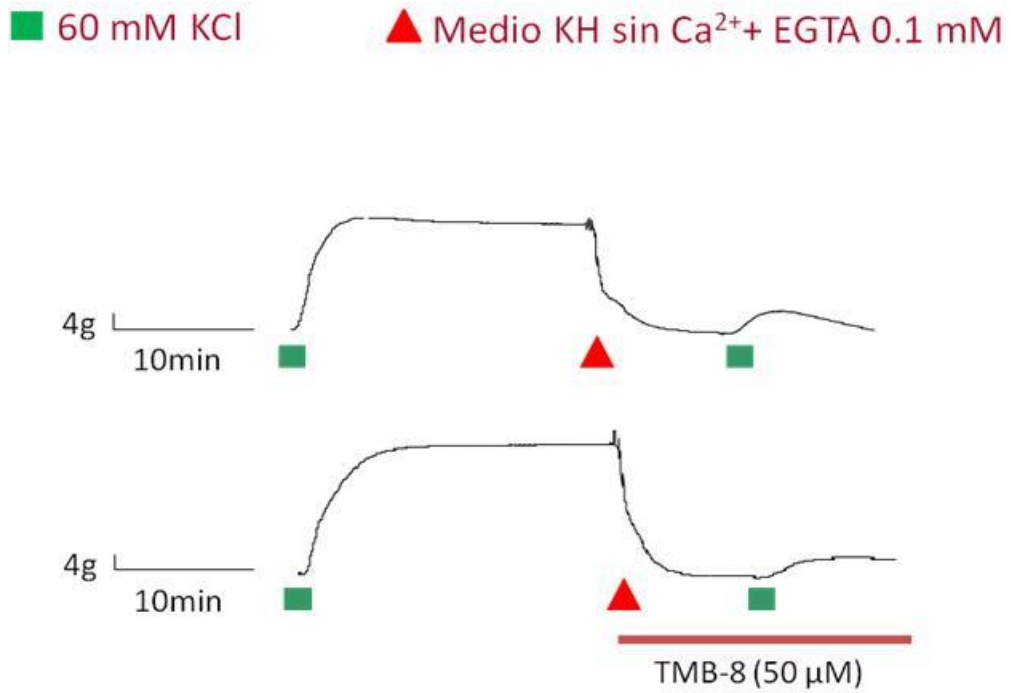


Figura 13. Trazo representativo de los experimentos para bloquear el receptor de IP_3 con TMB-8 (50 μM).

■ 60 mM KCl ▲ Medio KH sin Ca^{2+} + EGTA 0.1 mM

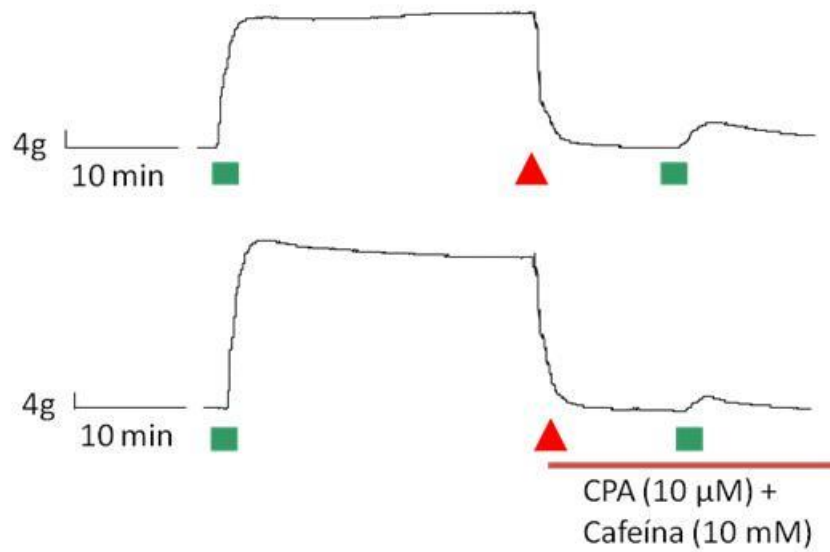


Figura 14. Trazo representativo de los experimentos para disminuir las concentraciones de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico con CPA (10 μM) y cafeína (10 mM).

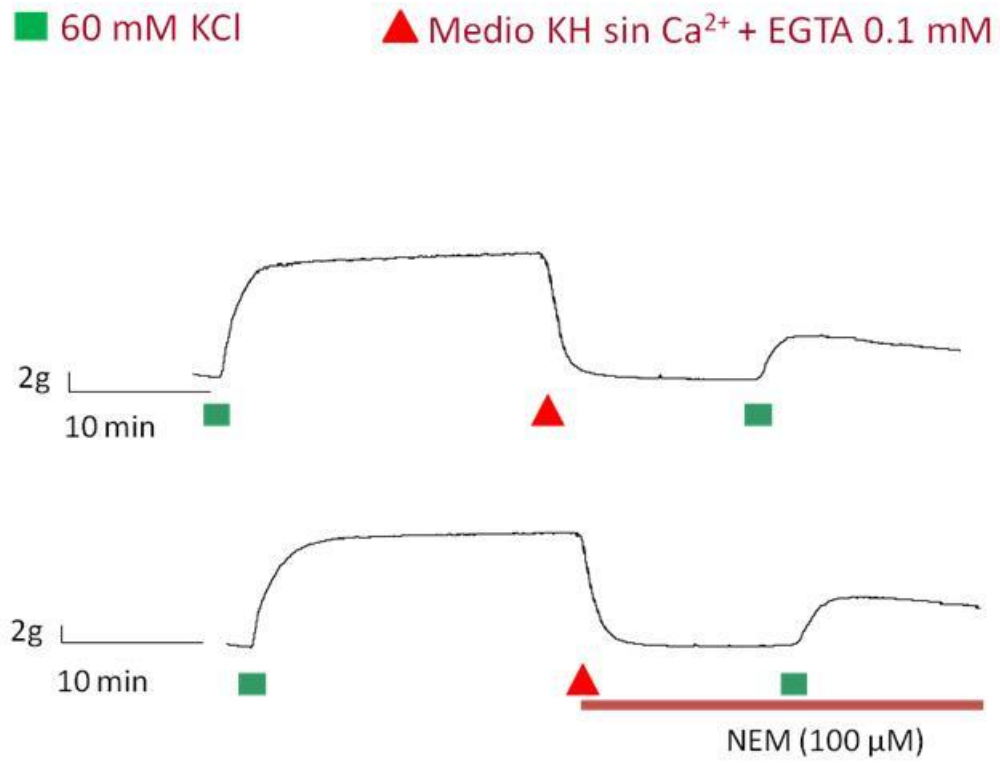


Figura 15. Trazo representativo de los experimentos para desacoplar las proteínas G con NEM (100 μM).

■ 60 mM KCl

▲ Medio KH sin Ca^{2+} + EGTA 0.1 mM

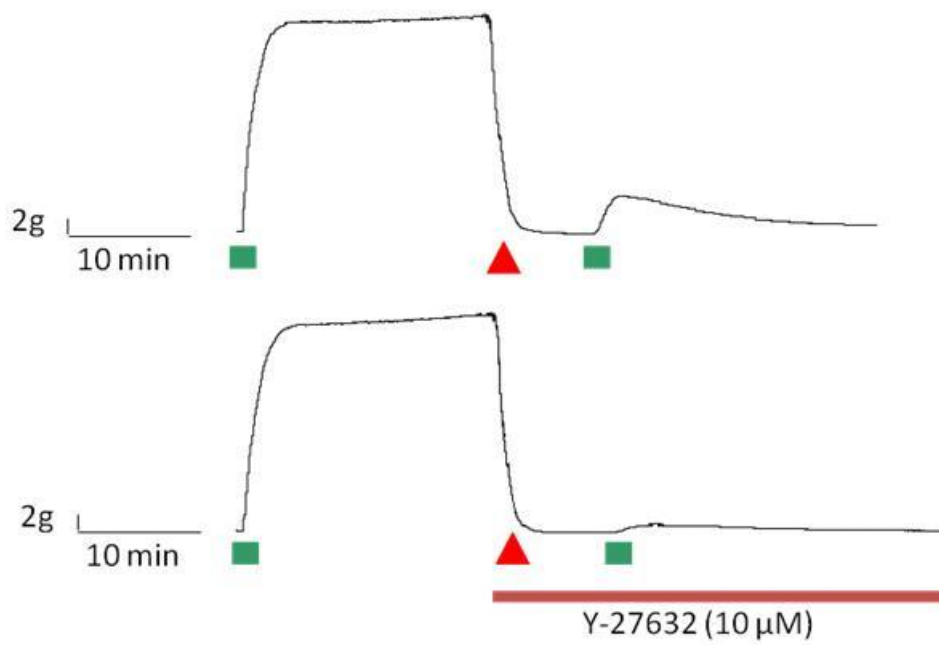


Figura 16. Trazo representativo de los experimentos para inhibir a la ROCK con Y-27632 (10 μM).

■ 60 mM KCl ▲ Medio KH sin Ca²⁺+ EGTA 0.1 mM

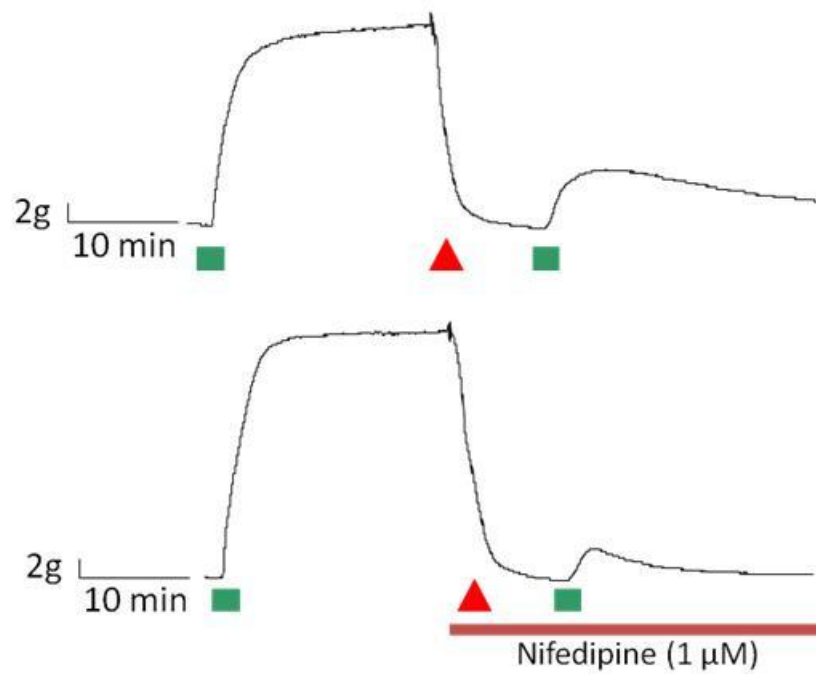


Figura 17. Trazo representativo de los experimentos para bloquear al VDCC_L con nifedipina (1 μM).

■ 60 mM KCl

▲ Medio KH sin Ca^{2+} + EGTA 0.1 mM

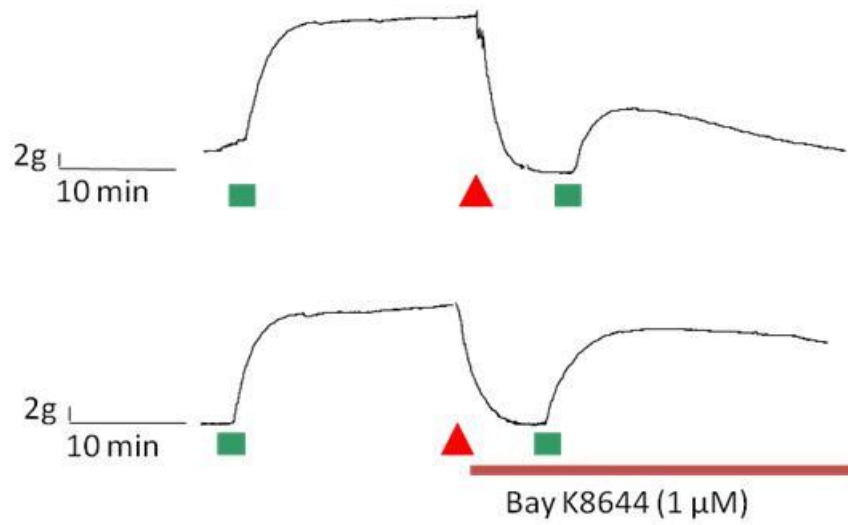


Figura 18. Trazo representativo de los experimentos para activar el VDCC_L con Bay K8644 (1 μM).

■ 60 mM KCl

▲ Medio KH sin Ca^{2+} + EGTA 0.1 mM

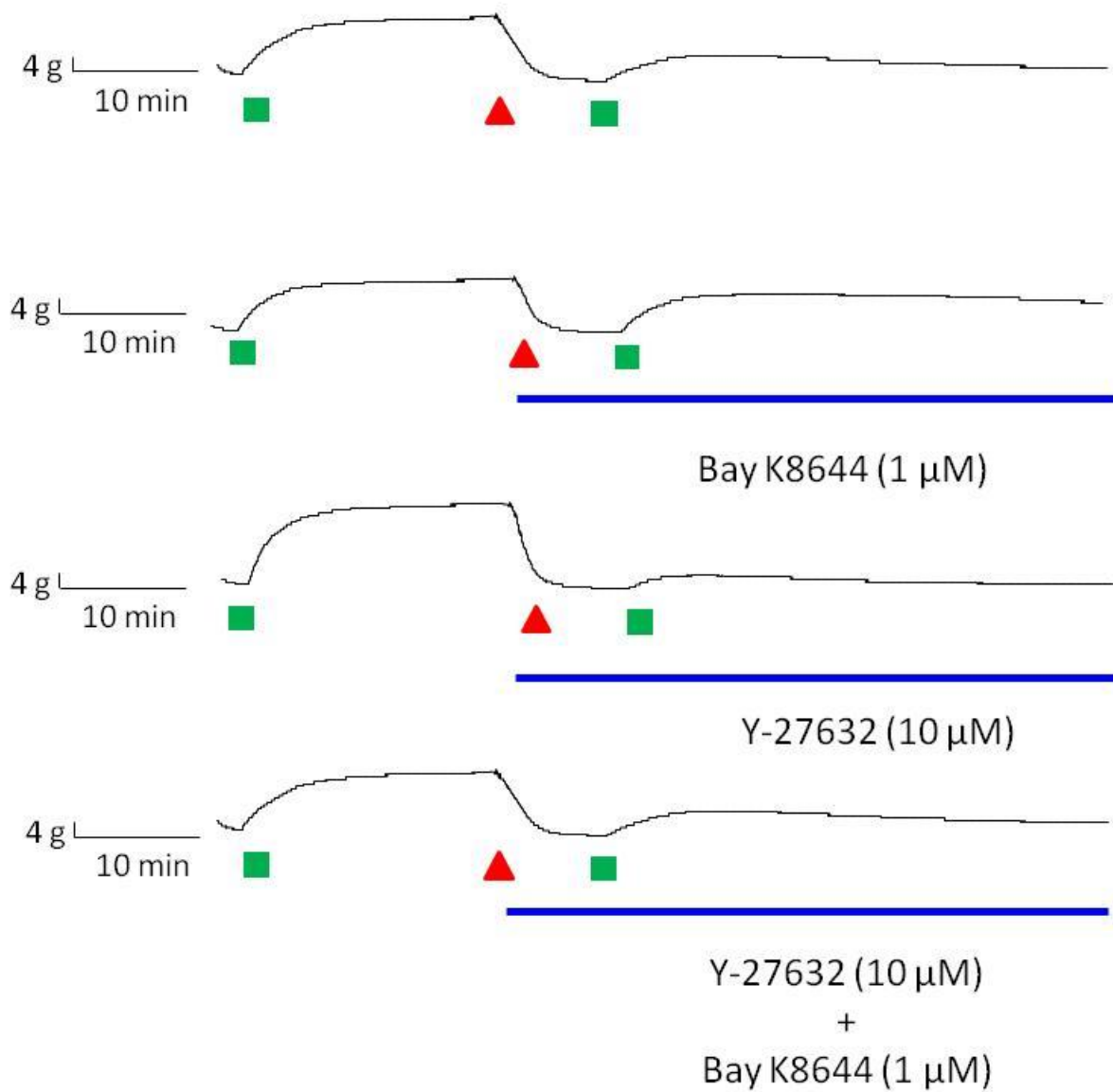


Figura 19. Trazos representativos del efecto de la activación del VDCCL con Bay K8644 (1 μM) en conjunto con la inhibición de la ROCK con Y-27632 (10 μM).