



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**LA FOSFORILACIÓN DE LAS MAP CINASAS ERK1 Y
ERK2 PARTICIPA EN EL EFECTO DEL SALBUTAMOL
SOBRE LA RESPUESTA DE CONTRACCIÓN INDUCIDA
POR KCl EN EL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS DE
COBAYO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

P R E S E N T A:

ROSA SANDOVAL ROLDAN



DIRECTOR DE TESIS:

DRA. VERÓNICA ESTELA CARBAJAL SALINAS

Ciudad Universitaria CDMX., 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Sandoval
Roldan
Rosa
(55) 1817- 6712
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308236723

2. Datos de tutor

Dra.
Verónica Estela
Carbajal
Salinas

3. Datos del sinodal 1

Dra.
María Eugenia Betina
Sommer
Cervantes

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Jaime
Chávez
Alderete

5. Datos del sinodal 3

Dr.
José Luis
Arreola
Ramírez

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Patricia
Segura
Medina

7. Datos del trabajo escrito

La fosforilación de las MAP cinasas ERK1 y ERK2 participa en el efecto del salbutamol sobre la respuesta de contracción inducida por KCl en el músculo liso de las vías aéreas de cobayo
63p.
2019

DEDICATORIA

Este logro se lo dedico con todo mi amor y cariño a mis padres quienes con sacrificios y esfuerzo me dieron la oportunidad de llegar hasta aquí. A mi mamá Sabina Roldan Romero por cada uno de los consejos dados, por ser mi maestra y mi guía, por sus palabras de aliento y regaños, que me han formado como la mujer que soy. A mi papá Agustín Sandoval Elguera por estar conmigo en el proceso que no ha sido fácil, por apoyarme y por todos sus consejos que me da día con día, los cuales me hacen ser mejor persona, por su cariño y amor incondicional.

A mi pequeña Dayanna Vázquez Sandoval quien con su llegada cambio mi vida y que con su sonrisa me motivaba a seguir adelante cada día, te amo.

A mis hermosas gemelas Valeria Martínez Sandoval y Guadalupe Martínez Sandoval, a quienes amo y agradezco cada momento que comparten conmigo.

A mis hermanas Marisol Sandoval Roldan y Juana Patricia Sandoval Roldan, por las experiencias y risas compartidas, por su apoyo brindado y sus consejos dados.

A mis abuelas queridas que siempre las estarán en mi corazón: Rosa Elguera Rojas y María Isabel Romero †.

A mi tío Gerónimo Francisco Sandoval Elguera por su gran ayuda que me brindo cuando lo necesitaba.

A la Dra. Verónica Estela Carbajal Salinas, por todo el cariño y apoyo que ha brindado, por su amistad y que sin ella este sueño no hubiera sido posible, por su paciencia, por los consejos, por las palabras de aliento que siempre me da para poder continuar con esta tesis.

A mi gran amiga Ilian Serrano Aguilar por todos aquellos días en los que reímos y lloramos juntas.

A José Luis, por ser un buen amigo y por el apoyo que me ha dado.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco inmensamente a la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)** por abrirme las puertas, en especial a la **Facultad de Ciencias** y a la **Escuela Nacional Preparatoria N°5** por siempre mantener un ambiente agradable para mi desarrollo personal y profesional.

Al **Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER)** perteneciente a la Secretaría de Salud, en especial al **Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial** por brindarme la oportunidad de realizar esta labor, comparto este agradecimiento con el **laboratorio de Biología Celular** que me permitió la utilización de sus equipos, así como al **Bioterio** por proporcionarme los animales para este proyecto.

Este trabajo de Investigación forma parte del proyecto “Participación de las MAP cinasas (ERK1/2) en la relajación inducida por salbutamol sobre la respuesta de contracción de KCl en las vías aéreas de cobayos sensibilizados” registrado por el Comité de Investigación y el Comité de Bioética del INER con código asignado por el Comité: **B12-15**.

A mis padres Sabina y Agustín que me impulsaron cada momento a salir adelante los amo y son mi gran tesoro, gracias infinitas.

A la Dra. Verónica Carbajal, directora de esta tesis, por todo su conocimiento y enseñanzas que me ha brindado, estoy muy agradecida por la confianza y la oportunidad que me dio al trabajar con ella, la admiro y la quiero mucho. Por su amistad y apoyo en todos los aspectos siempre estaré eternamente agradecida. Mil gracias Dra. Carbajal.

A la Dra. Betina Sommer, por sus importantes sugerencias y aportaciones para esta tesis y otros trabajos realizados.

Al Dr. Jaime Chávez, por la revisión de esta tesis, por las sugerencias dadas y por permitirme trabajar en su proyecto de investigación, muchas gracias!

Al Dr. José Luis Arreola, por su amistad, sus consejos y por todo su apoyo que me ha brindado para mi crecimiento académico y personal.

A la Dra. Patricia Segura, por su apoyo y calidez que me ha dado durante mi estancia en el laboratorio, gracias también por permitirme trabajar en su proyecto de investigación.

Al Dr. Erasmo, por haberme dado la oportunidad de en el INER.

A la Toñita por su linda amistad que me brindo, por esas pláticas y consejos que han ayudado para salir adelante... muchas gracias por todo el apoyo dado.

A mis compañeros de laboratorio, por hacer un ambiente agradable para trabajar en especial a Jesús Zúñiga y Jesús Alquiciara por el apoyo.

Y te doy gracias infinitas Padre por todo tu amor y bondad, que me permites sonreír ante todos mis logros, los cuales son el resultado de tu ayuda y cuando caigo estas tu ahí para que me levante.

Gracias te doy por estar en mi vida y darme de la oportunidad de haberme dado una hermosa familia y por haber conocido a personas tan maravillosas que me ayudan a ser mejor persona

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS	8
ABREVIATURAS	10
RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	14
Sistema adrenérgico en el músculo liso de las vías aéreas (MLVA)	14
Distribución de receptores β adrenérgicos (β - AR)	17
Estructura del β_2 - AR	17
Mecanismo de contracción del MLVA.....	19
Mecanismo de relajación mediado por los β_2 - AR en el MLVA.....	23
Agonistas β_2 - AR	25
Salbutamol	28
Antagonistas adrenérgicos	29
Las MAP cinasas (MAPK).....	31
Interacción de los β_2 -AR con la vía de las MAPK	32
JUSTIFICACIÓN	34
HIPOTESIS	35
OBJETIVOS	35
Objetivo general.....	35
Objetivos particulares	35
DISEÑO EXPERIMENTAL	36
Animales.....	36
Sistema de órganos aislados.....	37

Western blot	39
Análisis estadístico	40
FÁRMACOS	41
RESULTADOS	44
Evaluación de la relajación inducida por salbutamol sobre la respuesta de contracción de 60 mM y 20 mM de KCl en la tráquea de cobayo.....	44
Participación de ERK1 y ERK2 en la relajación inducida por salbutamol.....	46
Efecto del PD 98059 o U0126 sobre la relajación inducida por salbutamol en el MLVA pre-contráido con 20 mM de KCl	48
Efecto del PD 98059 sobre la fosforilación de ERK1 y ERK2 en la relajación inducida por salbutamol en el MLVA pre-contráido con 20 mM de KCl.....	51
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	55
PERSPECTIVAS	56
BIBLIOGRAFÍA	57

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Imagen de la cadena de aminoácidos del receptor β_2 -adrenérgico de humano	18
2	Mecanismo de contracción farmacomecánico en el músculo liso de las vías aéreas (MLVA) inducido por Acetil colina (ACh)	20
3	Mecanismo de contracción electromecánico en el MLVA	21
4	Mecanismo de relajación del músculo liso, inducido por salbutamol un agonista β_2 adrenérgico	24
5	Estructura y composición química del salbutamol	28
6	Mecanismos de señalización de las MAP cinasas (MAPK)	32
7	Aislamiento de la tráquea de cobayo	36
8	Sistema de órganos aislados	37
9	Estructura química del KCl	41
10	Estructura química del salbutamol	41
11	Estructura química del PD 98059	42
12	Estructura química del U0126	43
13	Estructura química del U0124	43
14	Curva Acumulativa concentración respuesta a salbutamol (SB: 1 nM – 10 μ M) en segmentos de tráquea de cobayo pre-contraídos con KCl	45
15	Efecto del salbutamol (SB 10 μ M) sobre el músculo liso de la tráquea de cobayo pre-contraído con 20 mM de KCl o 60 mM de KCl	47

16	Efecto del inhibidor de la MEK: PD 98059, sobre la respuesta de relajación inducida por Salbutamol (SB) en anillos de tráquea de cobayo pre-contraídos con 20 mM de KCl	49
17	Efecto del U0126 sobre la respuesta de relajación inducida por salbutamol en el MLVA de tráquea de cobayo pre-contraídos con 20 mM de KCl	50
18	PD 98059 inhibe la fosforilación de ERK1/2 inducida por salbutamol en el MLVA pre-contraído con 20 mM de KCl	52
19	Posible mecanismo de interacción de los β_2 -AR con la vía de las MAPK	55

CUADRO	TÍTULO	PÁGINA
---------------	---------------	---------------

1	Clasificación de receptores adrenérgicos y mecanismos de transducción	16
2	Clasificación de los agonistas β_2 usualmente usados en la clínica	27
3	Selectividad de los antagonistas adrenérgicos por adrenoreceptores	30

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO EN INGLÉS	SIGNIFICADO EN ESPAÑOL
AC	adenylate cyclase	adenilato ciclasa
AMPc	Adenosine 3'5' - cyclic monophosphate	adenosín monofosfato-3',5' cíclico
BK_{Ca²⁺}	Big Potassium ion channel	canales de K ⁺ dependientes de Ca ²⁺
β-AR	β-adrenergic receptors	receptor β adrenérgico
β₁-AR	β ₁ -adrenergic receptors	receptor β ₁ adrenérgico
β₂-AR	β ₂ -adrenergic receptors	receptor β ₂ adrenérgico
β₃-AR	β ₃ -adrenergic receptors	receptor β ₃ adrenérgico
Ca²⁺	Calcium ions	ión calcio
[Ca²⁺]_i	Intracellular free calcium level	concentración de calcio intracelular
DG	Diacylglycerol	diacilglicerol
EPOC		Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
ERK1	extracellular signal-regulated protein kinase 1	cinasa regulada extracelularmente de 44 KDa
ERK2	extracellular signal-regulated protein kinase 2	cinasa regulada extracelularmente de 42KDa
ERK5	extracellular signal-regulated protein kinase 5	cinasa regulada extracelularmente 98KDa
GMPc	Guanosine 3'5' - cyclic monophosphate	guanosín monofosfato-3',5' cíclico
GPCRs	G protein-coupled receptors	receptores acoplados proteína de G

GTP	guanosine 5' triphosphate	guanosina 5' - trifosfato
IP₃	inositol 1,4,5-trisphosphate	1,4,5 trifosfato de inositol
IP₃R	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor	receptor de 1,4,5 de trifosfato de inositol
IUPHAR	International Union of Basic and Clinical Pharmacology	La Unión Internacional de Farmacología
JNK	c-Jun N-terminal kinase	cinasa c-Jun N-terminal
K⁺	potassium ions	ión potasio
KCl	Chloride potassium	cloruro de potasio
kDa	kilodalton	Kilodaltones
LABAs	long-acting beta-agonists	agonista β_2 - adrenérgico de larga acción
MAPK	mitogen activated protein kinase	cinasa de proteína activada por mitógenos
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase	Cinasa, cinasa de proteína activada por mitógenos
MLVA		músculo liso de las vías aéreas
MLCK	myosin light-chain kinase	quinasas de la cadena ligera de miosina
MLCP	myosin light chain phosphatase	fosfatasa de la cadena ligera de miosina
mM		milimolar
PD98059	MEK inhibitor	inhibidor de MEK
p38		proteína p38 (MAPcinasa)
PDE	phosphodiesterase	fosfodiesterasa
PKA	protein kinase A	proteína cinasa A

PKC	protein kinase C	proteína cinasa C
PLC	Phospholipase C	fosfolipasa C
PMCA	Plasma Membrane calcium ATPase	ATPasa de Ca ²⁺ de la membrana plasmática
RS	Sarcoplasmic reticulum	retículo sarcoplásmico
SABAS	short-acting beta-agonists	agonista β ₂ - adrenérgico de corta acción
SERCA	sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ - ATPase	ATPasa de Ca ²⁺ del retículo sarcoplásmico
SB		salbutamol
TEA	tetraethylammonium	tetraetilamonio
Ultra-LABAS	ultra-long-acting beta-agonists	agonista β ₂ - adrenérgico de ultra larga acción
U0124		análogo inactivo de U0126(control negativo)
U0126		inhibidor selectivo de ERK1 y ERK2

RESUMEN

El salbutamol es un agonista β_2 -adrenérgico, comúnmente utilizado para el tratamiento agudo de broncoespasmo y enfermedades pulmonares (Barnes PJ, 1993., Wang *et al.*, 2009). En el músculo liso de las vías aéreas (MLVA) la relajación por agonistas β_2 -adrenérgicos actúa a través de un incremento del 3',5'- adenosin monofosfato cíclico (AMPC), mediante la activación de la adenilato ciclasa (AC) y posteriormente la activación de la proteína cinasa A (PKA), además de la apertura de los canales de potasio dependientes de calcio ($BK_{Ca^{2+}}$) para inducir hiperpolarización. Se ha propuesto que el salbutamol, un agonista β_2 -adrenérgico estimula la vía de la MAP cinasa (MAPK) a través de las proteínas Gi activando a ERK1 y ERK2. **El objetivo** de este trabajo fue investigar si ERK1 y ERK2 participan en el efecto de relajación inducido por salbutamol sobre el MLVA de cobayos pre-contraídos con KCl. **Método:** Anillos de tráquea de cobayo fueron pre-contraídos con 20 o 60 mM de KCl. Posteriormente se administró una curva concentración-respuesta a salbutamol (1 nM a 10 μ M, n=12). Algunos de estos tejidos se preincubaron 30 min con una concentración única de PD98059 (inhibidor de la MEK; 1, 10, 32 o 50 μ M, n=5) y con U0126 (inhibidor específico de la ERK1 y ERK2; 5 μ M, n=3) y U0124 (análogo inactivo del U0126; 5 μ M, n=3). Los tejidos obtenidos al término del protocolo experimental fueron homogenizados y se realizaron western blots para evaluar la participación de la fosforilación de ERK1 y ERK2 en la relajación inducida por salbutamol (10 μ M). **Resultados:** Observamos que salbutamol 10 μ M indujo una relajación total del MLVA pre-contraído con 20 mM de KCl. Sin embargo, cuando el MLVA fue precontraído con 60 mM de KCl, esta concentración de salbutamol induce una mínima relajación. Cuando utilizamos PD 98059 en el MLVA precontraído con 20 mM de KCl, encontramos que las concentraciones 1,10 y 32 μ M disminuyeron parcialmente el efecto de relajación del salbutamol. Sin embargo, cuando utilizamos 50 μ M de este inhibidor, éste bloqueo completamente el efecto relajante del salbutamol. Estos resultados fueron corroborados cuando utilizamos U0126. Encontramos que el efecto de relajación inducido por salbutamol 10 μ M disminuyó ~50%. En el análisis del western blot por densitometría, encontramos que la relajación inducida por salbutamol incrementó significativamente la fosforilación únicamente de ERK2 cuando el MLVA es pre- contraído con 20 mM de KCl. En cuanto a los tejidos pre-contraídos con 60 mM de KCl, hubo una disminución significativa de la fosforilación de ERK1/ERK2. Cuando utilizamos PD 98059 50 μ M encontramos que éste disminuyó los niveles de fosforilación ERK1 en la relajación inducida por salbutamol en los tejidos pre-contraídos con KCl 20 mM. Por otro lado, PD 98059 32 μ M y 50 μ M disminuyeron significativamente ($p<0.01$) la fosforilación de ERK1/2. **Conclusión,** Salbutamol 10 μ M induce relajación del MLVA de la tráquea de cobayo pre-contraída con KCl 20 mM y esta relajación está relacionada con la fosforilación de las MAP cinasas ERK1 y de ERK2.

INTRODUCCIÓN

SISTEMA ADRENÉRGICO EN EL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS (MLVA)

El sistema nervioso se divide en el Sistema Nervioso Central, compuesto por el cerebro y médula espinal y el Sistema Nervioso Periférico conformado por vías eferentes (nervios que llevan la información desde el cerebro y la médula espinal hasta las células efectoras de los tejidos periféricos y fibras aferentes) a través de las cuales, los nervios transmiten información de la periferia al sistema nervioso central. (Mendoza N., *et al.*, 2008; Lüllmann H., *et al.*, 2008; Sandoval A., *et al.*, 2014).

El Sistema Nervioso Periférico se subdivide en:

Sistema Nervioso Somático: Este sistema tiene la función de percibir el medio ambiente y dirigir los movimientos corporales según la situación que percibe.

Sistema Nervioso Autónomo: Este sistema se divide en Sistema Nervioso Simpático y Sistema Nervioso Parasimpático y se encargan de la inervación de los efectores viscerales, es decir, el músculo liso, el músculo cardíaco y las glándulas, los cuales se encuentran en los órganos que constituyen los sistemas cardiovascular, respiratorio, digestivo, urogenital, tegumentario y endocrino, de tal manera que como su principal destino son las vísceras. Sus centros nerviosos principales residen en el hipotálamo, en el tronco cerebral y la médula espinal. (Zieher M., 2004; Sandoval A., *et al.*, 2014; Lüllmann H., 2008).

El Sistema Nervioso Parasimpático regula los procesos vinculados con la captación y almacenamiento de energía. Estos procesos se desarrollan en reposo corporal y se ubica en los nervios craneales III, VII, IX y X, y en los niveles S2-S-4, y es estimulado mediante el sistema colinérgico por medio de la liberación de acetilcolina (ACh) a través de su unión a receptores muscarínicos específicos para ACh que se encuentran en la membrana plasmática, estos receptores se dividen en 5 subtipos (M1-M5); de igual manera puede ser estimulado a través de la nicotina, la cual se

une a receptores nicotínicos de la ACh. Una estimulación en la porción parasimpática provoca la contracción de los bronquios (manteniendo así el volumen respiratorio), mediante el nervio X (nervio vago), los receptores M3 desempeñan un papel en el tono de la musculatura lisa de los bronquios, ya que su excitación produce una estimulación de la fosfolipasa C (PLC), una despolarización de membrana y un aumento en el tono muscular (Zieher LM., 2004; Lüllmann H., 2008).

Por otro lado, el Sistema Nervioso Simpático produce las reacciones necesarias para alcanzar un estado capaz de un elevado rendimiento, como sucede en la lucha o en la huida. Este sistema se localiza en los segmentos T1 - L2 de la médula espinal y se encuentra mediado por el sistema adrenérgico, el cual es estimulado por las catecolaminas (CA) tales como: adrenalina, noradrenalina y dopamina (liberadas por la médula adrenal). Los efectos biológicos de las CA están mediados por los receptores adrenérgicos. En 1948, Ahlquist definió dos tipos diferentes de receptores adrenérgicos: α y β , en función de las respuestas de excitación e inhibición respectivamente (Ahlquist R., 1984). Por otro lado, Lands, *et al.* (1966) propusieron la existencia de dos receptores β diferentes, los β_1 y β_2 , posteriormente se describieron los receptores β_3 (Lans A., *et al.*, 1967). Langer S. (1974) propuso la clasificación de los receptores adrenérgicos del tipo α_1 y α_2 . En los últimos años, se han utilizado agonistas y antagonistas adrenérgicos de alta afinidad por el receptor, para el estudio directo de los receptores (Jarilla D. & Fernández G., 1992; Fernández C., *et al.*, & Gnus J., 2012).

La clasificación más reciente elaborada por la IUPHAR (*International Union of Basic and clinical Pharmacology, 2015*) y los mecanismos de transducción por los cuales actúan cada uno de los receptores se muestran en el **cuadro 1**.

Los receptores β_2 posibilitan, mediante una proteína G estimulante (Gs), un aumento de la formación de 3',5'-adenosin monofosfato cíclico (AMPc). La inhibición consecuente de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) produce la relajación de la musculatura lisa induciendo broncodilatación, así como el aumento de la actividad mucociliar (Arreola J., *et al.*, 2013; Jarilla D. & Fernández G., 1992; Sandoval A., *et al.*, 2014). Las vías de señalización implicadas en este sistema han sido un tema importante de estudio para poder explicar la fisiopatología del asma y sus implicaciones terapéuticas de su estimulación o inhibición (Goldie R., 2011).

Cuadro 1. Clasificación de receptores adrenérgicos y mecanismos de transducción.

Receptor	Subtipo	Mecanismo de transducción
α	α_{1A} α_{1B} α_{1D}	G_q / G_{11} \uparrow IP ₃ /DAG
	α_{2A} α_{2B} α_{2C}	G_i / G_o \downarrow AMP _c
β	β_1 β_2 β_3	G_s \uparrow AMP _c

Fuente: International Union of Basic and clinical Pharmacology (IUPHAR) 2015.

DISTRIBUCIÓN DE RECEPTORES β ADRENÉRGICOS (β - AR)

Los receptores β -adrenérgicos (β -AR) están presentes en la superficie de casi todos los tipos de células de mamíferos (Libretto S.E., 1994), son estimulados fisiológicamente por hormonas endógenas (catecolaminas): adrenalina, noradrenalina y dopamina, los receptores β se clasifican en β_1 -AR, β_2 -AR y β_3 -AR (Cohen, *et al.*, 2016). Los β_1 -AR se encuentran principalmente en el músculo cardíaco y el tejido adiposo; los β_2 -AR en el músculo liso de las vías aéreas (MLVA) y se ha descrito que la densidad de estos aumenta conforme incrementan las generaciones del árbol bronquial hasta llegar a los alveolos; además se han identificado en el tracto gastrointestinal, músculo esquelético, vejiga, endotelio vascular, epitelio ciliado, células cebadas, eosinófilos, linfocitos, células de Clara, neumocitos tipo II y útero; los β_3 -AR, en el tejido adiposo. Las glándulas submucosas tienen una pequeña población de receptores β_1 (10%) y el resto de β_2 (90%; Jarilla D. & Fernández G. 1992).

Las respuestas farmacológicas y fisiológicas de un tejido serán el resultado de la presencia particular de alguno o varios de los tres subtipos de β -AR presentes en esa célula. (Mersmann HJ, 1998; Giembycz & Newton, 2006; Cohen, *et al.*, 2016; Op't Holt, 2007).

ESTRUCTURA DEL β_2 - AR

Los β_2 -AR tienen una estructura tridimensional de características glicoproteicas compuestas de 413 aminoácidos, con un peso molecular entre 90 000 daltons y es en general más sensible a la adrenalina que a la noradrenalina, forman parte de la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCR por sus siglas en inglés G-protein coupled receptor; Barisione, *et al.*, 2010) y para su activación es imprescindible la presencia de dicha proteína. Así como los GPCRs, su composición presenta siete dominios transmembranales, un amino terminal que se encuentra en el espacio extracelular y un carboxilo terminal rico en serina y treonina, el cual se

encuentra en el citoplasma (Charlotte K., *et al.*, 2017; Jarilla D. & Fernández G., 1992; **Figura 1**). El gen responsable de su codificación es un gen sin intrones, localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (Perpiñá M., 2008). La función de los β_2 -AR está relacionada con su densidad, ya que su respuesta biológica es directamente proporcional al número de receptores ocupados. Si disminuye el número de receptores disminuye la respuesta máxima del músculo liso y disminuye la sensibilidad al agonista (Fernández C. SF, Walker JKL., *et al.*, 2011).

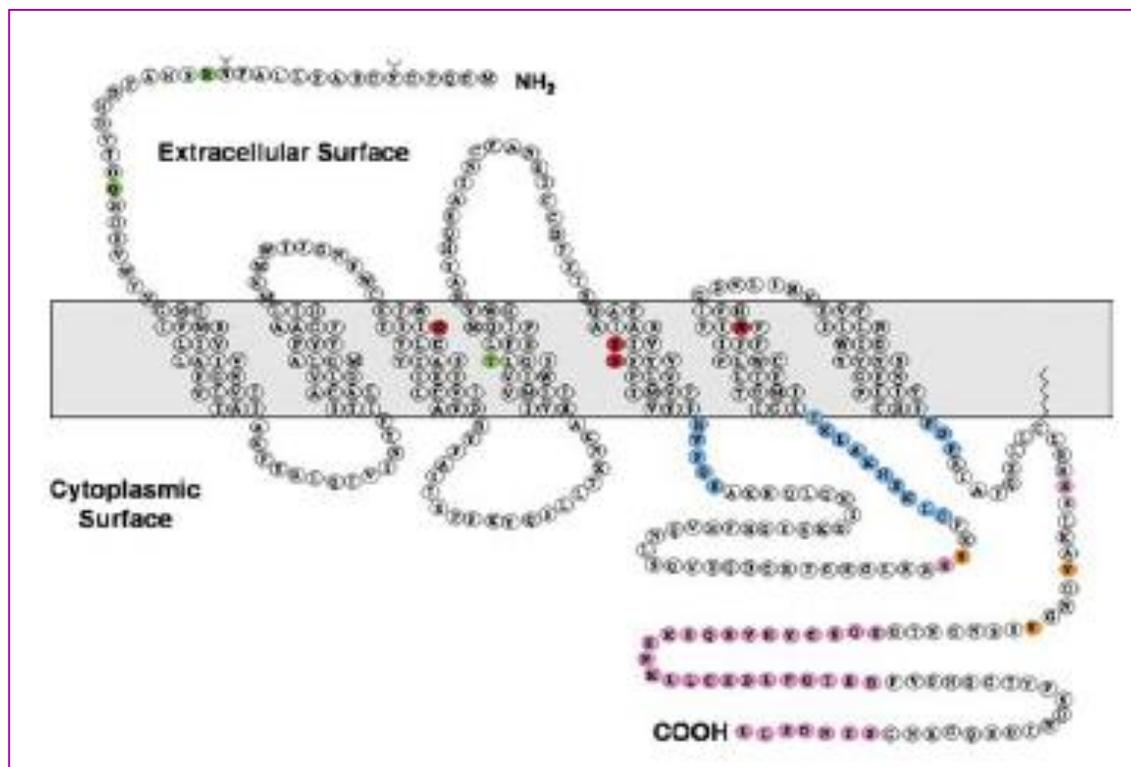


Figura 1. Imagen de la cadena de aminoácidos del receptor β_2 -adrenérgico de humano.
Tomado de B Op't Holt, 2007.

MECANISMO DE CONTRACCIÓN DEL MLVA

La actividad de contracción y relajación del músculo liso de la vía aérea está bajo control miogénico, neurogénico y hormonal, siendo el efecto final la regulación de la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), la cual determinará el grado de tensión a desarrollar por el músculo liso. En condiciones fisiológicas la concentración de Ca^{2+} intracelular en las células en reposo es del orden de 10^{-7} mol/L (100 nM) mientras que las concentraciones de Ca^{2+} extracelular son habitualmente 10^{-3} mol/L (1 mM; Thirstrup S., 2000).

Se conocen dos mecanismos de acoplamiento excitación-contracción del músculo liso de las vías aéreas: el primero es a través de la estimulación con agonistas contráctiles (acoplamiento farmacomecánico) y el segundo se lleva a cabo por la despolarización de la membrana plasmática (acoplamiento electromecánico; Thirstrup S., 2000).

En el acople farmacomecánico, involucra la estimulación de receptores membranales por acción directa de neurotransmisores que desencadenan toda la vía de transducción de señales que involucra a las proteínas G y la producción de segundos mensajeros, siendo el efecto final la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico por el 1, 4,5 trifosfato de inositol (IP_3 ; Bazán, *et al.*, 2003; Horowitz, *et al.*, 1996), seguido por la entrada de Ca^{2+} del espacio extracelular a través de los canales catiónicos inespecíficos de la membrana plásmática dentro de los cuales se encuentran los operados por receptor asociados a proteínas G (ROC, Wang, *et al.*, 1997) y/o los que se abren cuando el RS es vaciado de su contenido de Ca^{2+} (SOC, Bazán, *et al.*, 2003). Se ha propuesto que la entrada de Na^+ a la célula por estos canales produce una depolarización abriendo los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L generando así, una entrada adicional de Ca^{2+} (Montaño, *et al.*, 1996).

El incremento de $[Ca^{2+}]_i$ y su unión a la proteína calmodulina forma un complejo Ca^{2+} -Calmodulina, el cual activa a la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), con la subsecuente fosforilación de la serina en la posición 19 de la cadena ligera de 20 kDa de la miosina. Esta fosforilación permite a la ATPasa de miosina ser activada por la actina, y en consecuencia, el músculo se contrae (Somlyo & Somlyo, 2000). La serina previamente fosforilada de la cadena ligera de la miosina es susceptible de ser defosforilada por la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP) y en esta forma inhibir el proceso de la contracción (**Figura 2**).

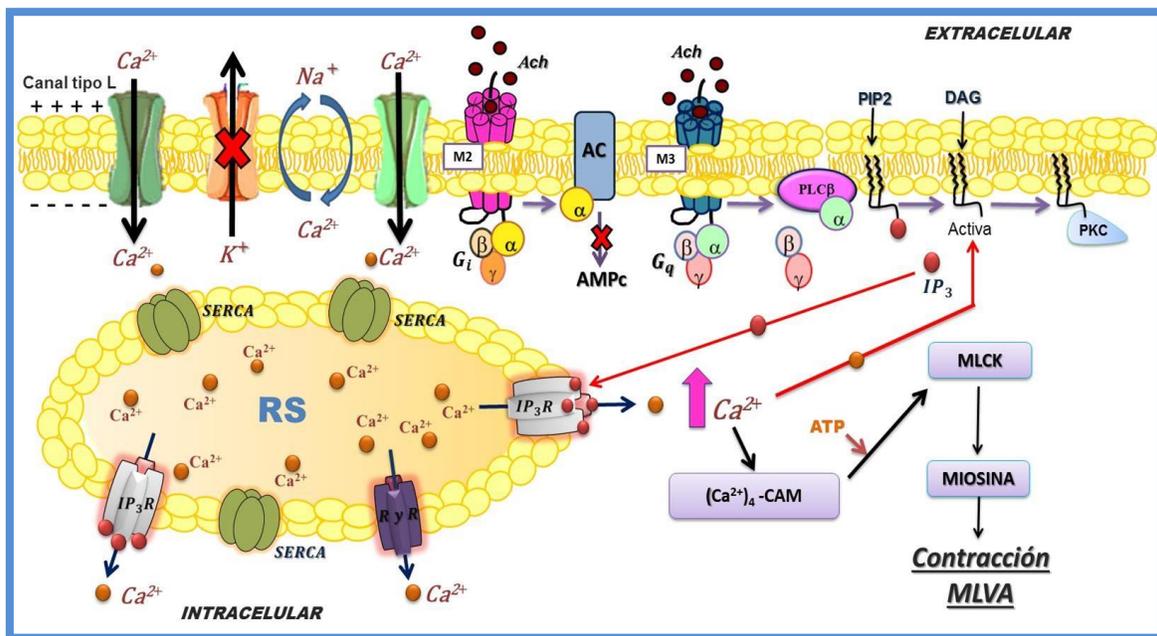


Figura 2. Mecanismo de contracción farmacomecánica en el músculo liso de las vías aéreas (MLVA) inducido por Acetil colina (ACh). Tomado y modificado de Carbajal V., 2006.

Otro mecanismo de contracción es el electromecánico; el cual opera mediante cambios en el potencial de la membrana plasmática. El potencial de membrana en reposo del MLVA es negativo (-50mV) con respecto al espacio extracelular y cuando hay un aumento en potenciales positivos ocurre una despolarización, resultado de un incremento rápido en las $[Ca^{2+}]_i$, debido al flujo de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L, alterando así el potencial de membrana (despolarización) para provocar la contracción (Somlyo & Somlyo, 1994; Pfitzer G., 2001; **Figura 3**).

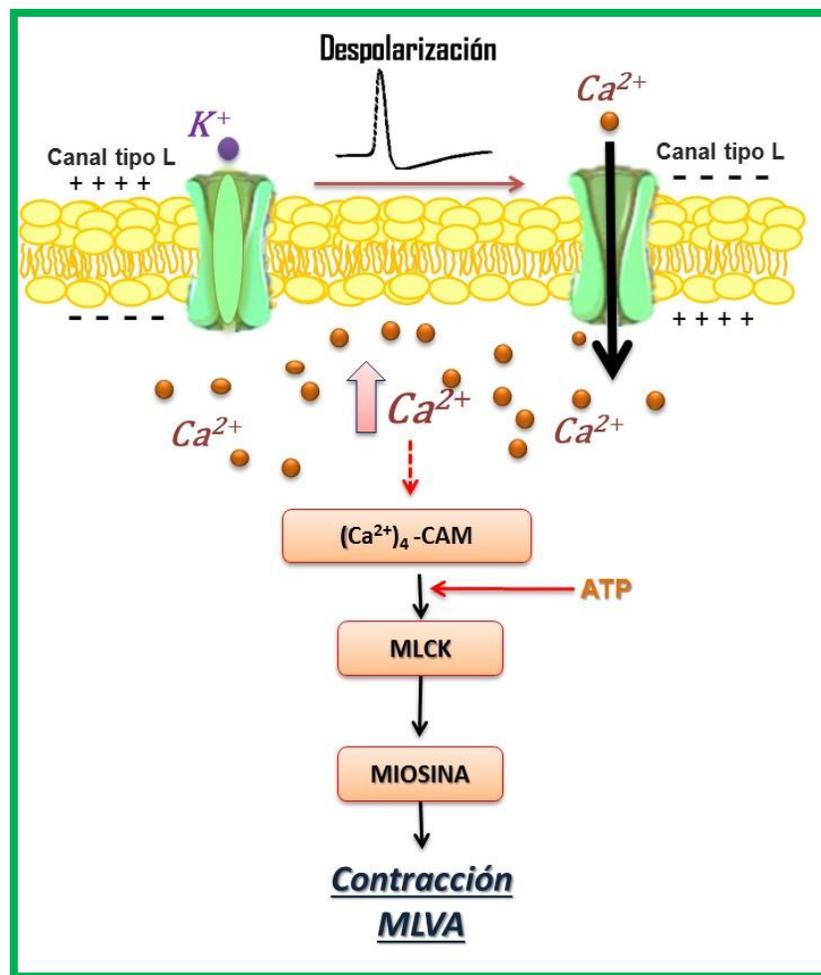


Figura 3. Mecanismo de contracción electromecánica en el MLVA (Rosa Sandoval Roldan).

Durante mucho tiempo el KCl ha sido utilizado como un estímulo conveniente para eludir a los receptores de proteína G y activar al músculo liso por un mecanismo altamente reproducible y relativamente simple al involucrar la activación de los canales de Ca^{2+} tipo L que conduce a un incremento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y posteriormente inducir la contracción. KCl puede incrementar la actividad de ERK en células de músculo liso aórticas cultivadas y arterias (Ratz, *et al.*, 2005). Estudios en células cerebrales, se ha observado que la actividad de ERK1/ERK2 depende de los niveles depolarizantes de KCl (Obara, *et al.*, 2007).

Adicionalmente se ha postulado que el caldesmon, un filamento delgado del músculo liso, participa durante la contracción de éste tejido. La función del caldesmon es inhibir la interacción de los filamentos de actina y miosina mediante la inhibición de la ATPasa de miosina y de esta forma evitar la contracción. Cuando el caldesmon es fosforilado, su efecto inhibitorio desaparece (Hemric, *et al.*, 1993).

En 1997, Gerthoffer, *et al.*, encontraron que el carbacol (agonista colinérgico) inducía la fosforilación en el músculo liso traqueobronquial mediante la activación de las MAPK: ERK1/ERK2. Por otro lado, Lelliott, *et al.* (2012), encontraron que la ERK regula el tono de los bronquios periféricos de cerdo por inhibir la relajación mediada por el β -AR, pero no tiene efecto sobre la respuesta contráctil inducida por el agonista.

MECANISMO DE RELAJACIÓN MEDIADO POR LOS β_2 -AR EN EL MLVA

Desde 1960 ha sido establecido que la activación de los β_2 -AR es mediada por un incremento de los niveles de AMPc intracelular. El acoplamiento del receptor β_2 adrenérgico activa a una proteína Gs trimérica (Barnes P.J., 1993; Wang, *et al.*, 2009), la cual contiene una subunidad α (la que estimula a la adenilato ciclasa, AC) y las subunidades $\beta\gamma$ (el cual transduce otras vías de señalización). La AC, cataliza la conversión de ATP a AMPc (y la formación de un pirofosfato inorgánico PPI). El AMPc activa a la proteína cinasa A (PKA, Barnes P.J., 2004; Deshpande, 2006) en la subunidad reguladora. La PKA fosforila residuos de serina y treonina de proteínas específicas tales como proteínas reguladoras, canales iónicos y enzimas dentro de la célula. En el MLVA la PKA fosforila a: (1) la MLCK, (2) los receptores de IP_3 del retículo sarcoplásmico (IP_3R), (3) los canales de potasio dependientes de calcio ($BK_{Ca^{2+}}$), (4) la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico (SERCA) y (5) la ATPasa de calcio de la membrana plasmática (PMCA; Hall I., 2000), favoreciendo la relajación de la siguiente manera:

- 1) La fosforilación de la MLCK: disminuye la afinidad de la MLCK por el complejo calcio/calmodulina, reduciendo así su actividad y la fosforilación de la Serina posición 19 de la cadena ligera de miosina (MLC; Penn R., *et al.*, 2007).
- 2) La fosforilación del IP_3R del RS: reducen su afinidad a IP_3 , lo que limita la movilización y salida de Ca^{2+} del RS al espacio extracelular (Penn R., *et al.*, 2007; Hall I., 2000).
- 3) Los $BK_{Ca^{2+}}$ fosforilados, inducen la hiperpolarización de la membrana (a través del flujo de K^+) y el cierre de los canales de calcio tipo L para disminuir el calcio intracelular (Hansel & Barnes, 2005; Hall I., 2000).
- 4) La fosforilación de SERCA, promueve la entrada de Ca^{2+} al RS, provocando una disminución en las $[Ca^{2+}]_i$ (Hansel & Barnes, 2005; Hall I., 2000).

5) La activación de la PMCA induce la salida de Ca^{2+} al espacio extracelular a través de la membrana plasmática, disminuyendo así las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Hansel & Barnes, 2005; Somlyo & Somlyo, 1994; Malcolm J., 2006; Hall I., 2000).

Los niveles de AMPc son regulados por la actividad de la enzima fosfodiesterasa (PDE), la cual catalizan la ruptura del enlace fosfodiéster del 3'-5'AMPc, convirtiéndolo en su metabolito 5' AMP; en el MLVA se encuentran las fosfodiesterasas tipo III y tipo IV (Hall I., 2000; **Figura 4**).

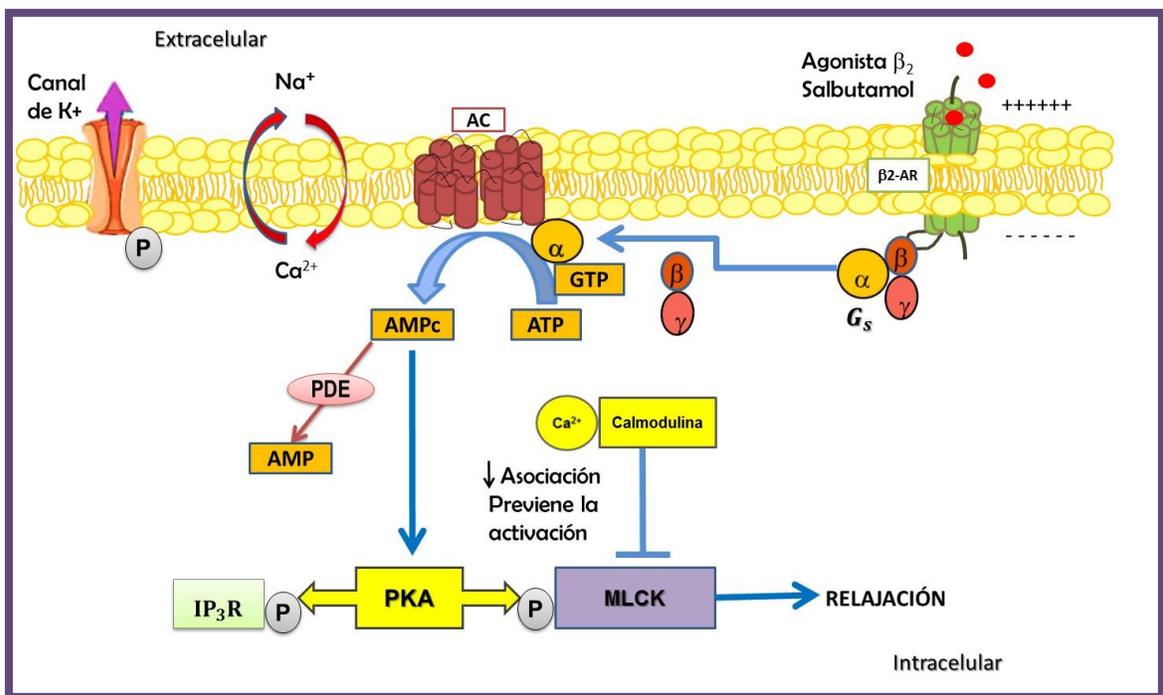


Figura 4. Mecanismo de relajación del músculo liso, inducido por salbutamol un agonista β_2 adrenérgico. Tomado y Modificado de Hansel & Barnes, 2005.

AGONISTAS β_2 -AR

Los agonistas β_2 constituyen el tratamiento comúnmente utilizado para el asma y el manejo de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Éstos, ejercen sus efectos broncodilatadores vía los β_2 -AR localizados en el MLVA como previamente se describió. El mecanismo bioquímico de la acción de los agonistas β_2 no ha sido clarificado por completo. Se sabe que inducen un aumento en la tasa de formación de AMPc a partir del trifosfato de guanósina (GTP) en presencia de AC, poniendo en marcha reacciones en cadena dando como resultado la relajación del MLVA y la dilatación de la vía aérea (Barisione, *et al.*, 2010; Charlotte K, *et al.*, 2017; Walker JKL., 2011).

Su efecto depende de la selectividad de cada agonista β_2 y su capacidad para acoplarse a su receptor. Desde el punto de vista farmacológico, es muy importante su capacidad de difusión a través de la membrana celular, que dependerá en cierto grado de su hidrófilia o lipofilia (Fernández C. www.seaic.org/wpcontent/plugins/downloadbetaagonistas).

Actualmente los agonistas β_2 adrenérgicos son agrupados dentro de tres grupos (Sánchez M., 2007; Cohen, *et al.*, 2016; Charlotte K., *et al.*, 2017; **Cuadro 2**):

1. Corta Acción (SABAs, por sus siglas en inglés short-acting β -agonists)
2. Larga Acción (LABAs, por sus siglas en inglés long –acting β - agonists)
3. Ultra-Larga Acción (Ultra-LABAs).

➤ **SABAs**

Son agentes de rescate altamente eficaces para la terapia del asma debido a que combaten la broncoconstricción y las exacerbaciones agudas; se pueden administrar por vía oral o inhalatoria y se ha demostrado su acción efectiva a nivel pulmonar como broncoprotector frente a una variedad de estímulos.

Generalmente se reservan para uso necesario y su inicio de acción es aproximado a 5min. Tienen un efecto máximo de 60-90 min, persistiendo por 4-6 h (Cazzola M., 2012; Carrasco C., 2013).

➤ LABAs

Tienen una gran selectividad por los receptores β_2 y mantienen la broncodilatación por 12 h. Su inicio de acción es más lento, ya que puede variar entre los 5-15 min en comparación con los SABAs. Su uso por lo general es en combinación con corticoides inhalados.

Se han desarrollado como terapia para el mantenimiento de la EPOC leve a moderada. Su ruta de administración puede ser oral o inhalada, siendo esta última más eficaz para tratar esta enfermedad dado que mejora significativamente la disnea y disminuye las exacerbaciones (Cazzola M., 2012; Carrasco C., 2013; Cohen, *et al.*, 2016).

➤ Ultra-LABAs

En el 2009, Indacaterol fue aprobado como el primer agonista β_2 adrenérgico Ultra-LABAs por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y en el 2011 se aprobó para el tratamiento de pacientes con EPOC. Su vía de administración es por inhalación, tiene un rápido inicio de acción debido a su rápida absorción y tiene una duración hasta de 24 h. Actualmente no es considerado como una terapia única para tratar la EPOC; este tipo de β_2 adrenérgico aún no es aprobado para el uso en el tratamiento del asma (Cazzola M., 2012).

Cuadro 2. Clasificación de los agonistas β_2 usualmente usados en la clínica

		Rescate		M a n t e n i m i e n t o
		Corta	Larga	
Rápido	Rápido inicio. Corta duración Terbutalina inhalada Salbutamol inhalado	Rápido inicio. Larga duración Formoterol inhalado		
Lento	Inicio lento. Corta duración Terbutalina oral Salbutamol oral	Inicio lento. Larga duración Salmeterol inhalado Bambuterol oral		

Tomada de: www.seaic.org/wpcontent/plugins/downloadbetaagonistas

SALBUTAMOL

La terapia broncodilatadora para el asma más antigua conocida por la humanidad inicio hace más de 5000 años, con la planta *Ephedra sínica* de la medicina China la cual es rica en efedrina, componente similar a la adrenalina (Hansel & Barnes, 2004; Oscanoa T., 2014).

Al comienzo de la II Guerra Mundial, en 1940, H. Konzett en los Laboratorios Boehringer Ingelheim sintetizo la isoprenalina (isoproterenol en EE.UU) agonista β , el cual mostro ser un también un estimulante cardiaco, con ello fue necesario encontrar un agonista selectivo de los receptores β bronquiales (β_2) que no estimulase los receptores β -cardiacos (Raviña E., 2008).

El Dr. David Hartley de la compañía farmacéutica británica Allen & Hamburys Ltd. (después perteneciente al grupo Glaxo) desarrollaron el salbutamol racémico, albuterol (nombre comercial *Ventolin*) considerablemente más broncodilatador que estimulante cardiaco. El Salbutamol estuvo disponible en el Reino Unido en 1969 y en los Estados Unidos en 1980 (Raviña E., 2008; Hartley D. & Middlemiss D. 1971).

El nombre salbutamol deriva de su composición química: SAL por saligenina, BUT por butil, AM por amino, y OL por etanol; **Figura 5**.

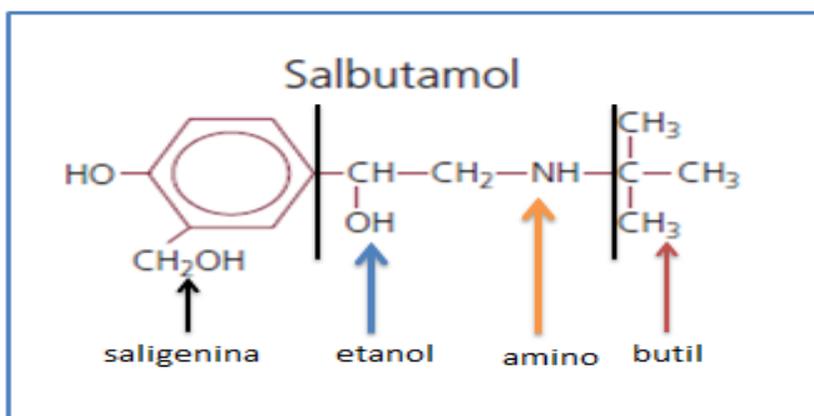


Figura 5. Estructura y composición química del salbutamol.

En la actualidad salbutamol es un agonista selectivo para los receptores β_2 y en las vías áreas su efecto principal es relajar el musculo liso traqueobronquial (Starkey E., *et al.*, 2014).

El mecanismo de acción molecular del salbutamol comienza con la estimulación del receptor β_2 en el MLVA para después activar a AC, la cual aumenta el AMPc intracelular, esto lleva a la activación de PKA, esta enzima inhibe la fosforilación de la miosina y disminuye la concentración de Ca^{2+} intracelular, llevando a una relajación (Oscanoa T., 2014).

Los efectos secundarios más comunes son el temblor, la ansiedad, el dolor de cabeza, el espasmo muscular, la sequedad de boca y la palpitación cardíaca. Otros signos o síntomas pueden incluir la taquicardia, la arritmia cardíaca, el sonrojo de cara. Más raros pero importantes son reacciones alérgicas como el broncoespasmo (Cazzola M., 2012; Carrasco C., 2013).

ANTAGONISTAS ADRENÉRGICOS

Los antagonistas adrenérgicos son fármacos que se unen con alta afinidad, pero no activan a los receptores, es decir, carecen de actividad intrínseca (Baynes J. & Dominiczak M., 2008). En la actualidad ocupan un papel importante en el tratamiento de diversos procesos cardiovasculares (hipertensión arterial, arritmias) y no cardiovasculares (ansiedad, glaucoma, migraña, temblor). Sin embargo, y aunque todos los antagonistas tiene la misma capacidad para bloquear los receptores β -adrenérgicos, existen importantes diferencias en sus propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas (Mendoza N., 2008; **cuadro 3**).

Estos antagonistas se fijan a los receptores β -adrenérgicos e impiden la activación de la vía de señalización proteína Gs-AC-AMPc-PKA por las CA. Como consecuencia, reducen los niveles celulares de AMPc e inhiben la activación de la PKA y la fosforilación de diversas proteínas celulares (Oscanoa T., 2014).

Cuadro 3. Selectividad de los antagonistas adrenérgicos por adrenoreceptores.

SELECTIVIDAD DE LOS ANTAGONISTAS ADRENÉRGICOS POR ADRENORECEPTORES.	
Receptor blanco/ fármaco	Afinidad receptores
<p style="text-align: center;">α</p> Prazocina, terazocina Fenoxibenzamina Fentolamina yohimbina, tolazolina	$\alpha_1 \ggggg \alpha_2$ $\alpha_1 > \alpha_2$ $\alpha_1 = \alpha_2$ $\alpha_1 \gg \alpha_2$
<p style="text-align: center;">α, β</p> Labetalol, carvedilol	$\beta_1 - \beta_2 > \alpha_1 > \alpha_2$
<p style="text-align: center;">β</p> Metoprolol, acebutolol, atenolol, celiprolol, esmolol, betaxolol Propanolol, carteolol, nadolol, pindolol, timolol Butoxamina	$\beta_1 \ggg \beta_2$ $\beta_1 - \beta_2$ $\beta_2 \ggg \beta_1$

Fuente: Tomado y modificado de Mendoza N., 2008.

LAS MAP CINASAS (MAPK)

Las cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAPK) se cree que tienen un papel central en las vías de señalización iniciadas por factores promotores de crecimiento sobre una variedad de receptores de superficie celular. Estas cinasas participan activamente en convertir el estímulo extracelular a señales intracelulares que afectan la expresión de genes necesarios para un gran número de funciones biológicas, incluyendo crecimiento, proliferación y diferenciación celular (Crespo P., *et al*, 1995). En el MLVA se describen varias funciones importantes mediadas por la activación de estas cinasas de proteína tales como: la síntesis de proteínas de matriz extracelular, la proliferación celular y la contracción (Gerthoffer, *et al.*, 1997).

Las MAP cinasas están conformada por tres familias de componentes interrelacionados, los cuales reciben, transmiten y responden a señales extracelulares diferentes: las ERK, las JNK y la p38 (Valdespino G., *et al.*, 2015).

A inicios de 1980, se descubrió la primera familia de las MAP cinasas, la cual se identificó como la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK, por sus siglas en inglés extracelular signal regulated protein kinase; Zaganjor & Cobb, 2011). Se dividen en dos sub-familias: las pequeñas ERK1 y ERK2 (42 y 44 KDa, respectivamente) y la grande ERK5 (98 KDa; Lee J., *et al.*, 1995).

Adicionalmente se han encontrado otras isoformas de la ERK, conocidas como ERK3 y ERK4 y ERK 7 y ERK8, pero que actualmente se desconoce si estas cinasas son activadas por fosforilación a través de la vía de señalización de las MAPK (Wortzel I., 2011; **Figura 6**).

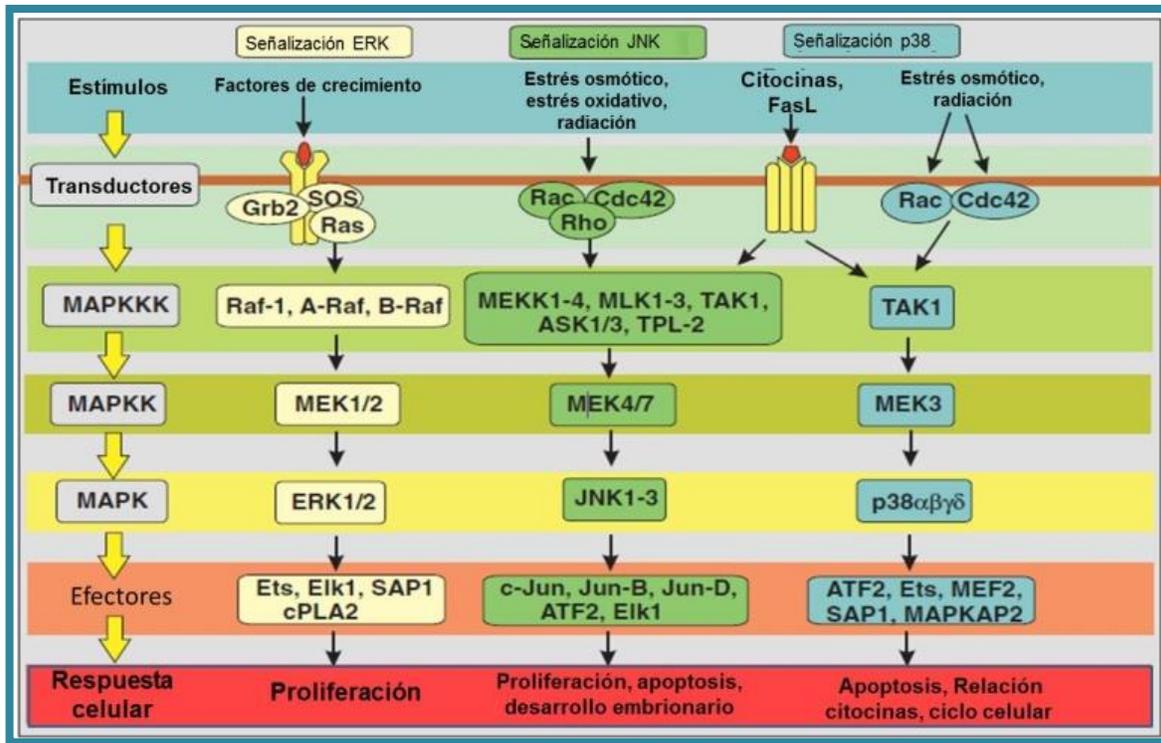


Figura 6. Mecanismos de señalización de las MAP cinasas (MAPK, Tomado y modificado de Berridge, M., 2014).

INTERACCIÓN DE LOS β_2 -AR CON LA VÍA DE LAS MAPK

La activación de la cascada de señalización de la ERK1 / ERK2 es iniciada en la membrana plasmática por medio de receptores de la cinasa de tirosina (RTKs), por otro lado, los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y canales iónicos entre otros (Wortzel I., 2011), pueden activar a la proteína Ras dando lugar a la fosforilación de la Raf-1, que continuamente fosforila a la MEK1 / 2 y ésta a su vez fosforila a la ERK1 / ERK2 (Berridge, M., 2014).

Las vías de unión entre los receptores acoplados a proteínas G con las MAPK aún son poco conocidas. Recientes reportes indican que las MAPK pueden ser activadas por un gran número de receptores unidos a Gi. Por ejemplo, los receptores α_2 -adrenérgico, muscarínicos M2, dopaminérgico D2 y ácido

lisofosfatídico pueden potencialmente activar a las MAPK. La actividad enzimática de las MAPK puede ser inducido por la estimulación de los receptores acoplados a proteínas Gq, tales como los receptores muscarínicos M1 y bombesina que dependen parcialmente de PKC (Crespo P., *et al.*, 1995).

Interesantemente, se ha descrito que los β_2 -AR pueden acoplarse a múltiples efectores a través de distintas proteínas G. Diferentes estudios realizados en los 1980s y los 1990s demostraron que cuando el β_2 -AR era purificado o un péptido correspondiente a la tercera asa intracelular de la proteína podrían activar a G_i pura, en un sistema libre de células, indicando que este acoplamiento promiscuo puede también ocurrir en células intactas e in vivo. En efecto, los β_2 -AR pueden acoplarse a múltiples proteínas unidoras de GTP, incluyendo G_i , permitiendo la activación de las MAPK (ERK1/ERK2) a través del complejo $G\beta\gamma$ (Giembycz & Newton, 2006).

Sin embargo, un papel para $G\alpha_s$ y PKA en la señalización de $G\beta\gamma$ a Ras ha sido identificado en este tipo de receptores estimulados por el agonista isoproterenol.

Debido a que la unión del agonista a los GPCR puede activar tanto $G\alpha_s$ como $G\beta\gamma$, la activación de $G\beta\gamma$ de Ras podría proceder concurrentemente con la activación $G\alpha$ de Rap1. Por ejemplo, en células HEK293 (línea celular de riñón embrionario humano) el isoproterenol puede activar a Rap1 con $G\alpha_s$ /AMPc y a Ras a través de $G\beta\gamma$ (Dakaa, *et al.*, 1997). Otro ejemplo, lo encontramos en células COS-7 (línea celular de riñón de mono verde africano), isoproterenol puede inhibir a ERK a través de AMPc, pero puede activar a ERK a través de $G\beta\gamma$ y Ras (Stork, *et al.*, 2002). Esto es particularmente interesante porque los β_2 -AR acoplados a la AC incrementan los niveles intracelulares de AMPc, datos recientes indican que elevadas concentraciones de AMPc pueden bloquear la activación de las MAPK a través de proteínas Ras oncogénicas, receptores de cinasa de tirosina (RTK) y GPCRs. Así, los receptores acoplados a proteínas Gs podrían disminuir más que estimular la actividad de las MAPK (Crespo P., *et al.*, 1995).

JUSTIFICACIÓN

Los agonistas β_2 -adrenérgicos como el salbutamol han sido usados ampliamente para regular el MLVA una vez contraído, tanto experimentalmente como en patologías que involucran la contracción del MLVA. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales los agonistas β_2 adrenérgicos causan relajación no están completamente definidos. Existe evidencia (Giembycz & Newton, 2006) de que los agonistas β_2 -adrenérgicos presentan cierta promiscuidad, que puedan estar participando en múltiples vías de señalización, independientemente del incremento en los niveles de AMPc para inducir relajación. Debido a esto, resulta interesante explorar si el uso de KCl, un estímulo que no requiere la activación de proteínas G, solo la activación de canales de Ca^{2+} tipo L para inducir contracción (Ratz, *et al.*, 2005) presenta dicha promiscuidad. Por lo que las vías de señalización involucradas en este fenómeno resultan de gran relevancia para el mejor entendimiento del mecanismo de acción de los agonistas β_2 -adrenérgicos.

HIPÓTESIS:

La relajación inducida por salbutamol sobre la contracción de KCl involucra un incremento en la fosforilación de ERK1/ERK2.

OBJETIVO GENERAL:

Investigar la participación de la vía de señalización de las MAPK: ERK1/ERK2 durante la relajación inducida por salbutamol sobre la respuesta de contracción a KCl en el músculo liso tráqueal de cobayos sanos.

OBJETIVOS PARTICULARES:

ÓRGANOS AISLADOS

- ❖ Evaluar si el salbutamol (1 nM a 10 μ M) induce relajación sobre la respuesta de contracción (20 y 60 mM) de KCl.
- ❖ Evaluar la participación de las MAPK: ERK1/ERK2 durante el proceso de relajación inducida por salbutamol sobre la respuesta de contracción de 20 mM de KCl mediante el uso de **PD98059** (PD, inhibidor de MEK: 1, 10, 32, 50 μ M), **U0126** (inhibidor altamente selectivo de MAP cinasas, 5 μ M) y **U0124** (análogo inactivo de U0126, 5 μ M).

WESTERN BLOT

- ❖ Evaluar si salbutamol modifica la fosforilación de ERK1/ERK2
- ❖ Investigar si **PD98059** (1, 10, 32, 50 μ M) disminuye la fosforilación de las MAPK ERK1/ERK2 en el proceso de relajación con salbutamol sobre la contracción por 20 mM de KCl.

DISEÑO EXPERIMENTAL

ANIMALES

Se utilizaron cobayos machos de la cepa Harley con un peso corporal de 200 g a 300 g, los cuales se mantuvieron en condiciones controladas en el bioterio: aire acondicionado filtrado, temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, con un 50-70 % de humedad, en cama estéril, con acceso libre a agua y alimento y con un ciclo de luz y oscuridad de 12-12 h. El protocolo (B12-15) fue aprobado por el Comité de Investigación, el Comité de Bioética e Investigación y el Comité de Bioseguridad del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Ismael Cosío Villegas.

Los animales se sacrificaron por una sobredosis de pentobarbital sódico (30 mg/Kg, vía intraperitoneal) y se exanguinaron. Inmediatamente, se obtuvo la tráquea de cada cobayo y se colocó en una caja de Petri con solución Ringer Krebs a temperatura ambiente. La tráquea fue disecada y limpiada del exceso de tejido conjuntivo bajo un microscopio estereoscópico (**Figura 7**); de cada tráquea se obtuvieron 8 segmentos y cada segmento tenía 4 anillos traqueales en promedio.

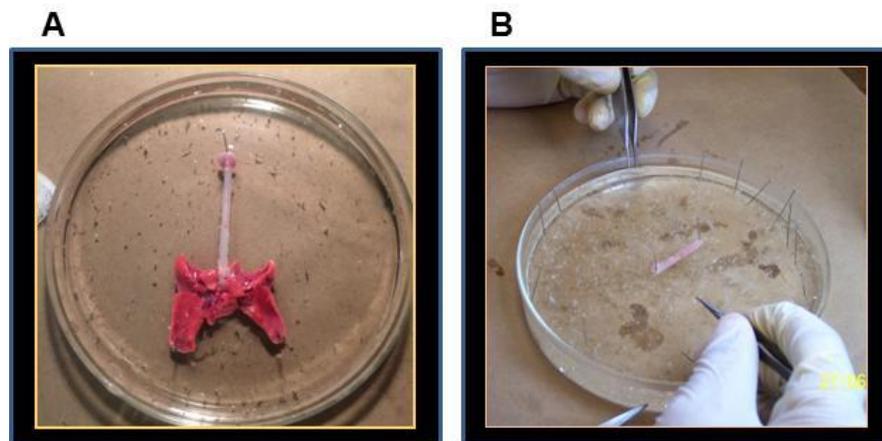


Figura 7. Aislamiento de la tráquea de cobayo. **A)** Obtención del bloque pulmonar. **B)** Disección de la tráquea.

SISTEMA DE ÓRGANOS AISLADOS

Cada segmento obtenido se colocó en una cámara de órganos aislados, cada una contenía 5 ml de solución Ringer de Krebs bicarbonatada con la siguiente composición (mM): (NaCl 120, NaHCO₃ 25, Glucosa 11, KCl 4.77, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2 y CaCl₂ 2) a un pH 7.4 a 37°C. Además, la solución fue constantemente burbujeada con una mezcla de 95 % de O₂ y 5 % de CO₂. Cada tejido fue sujetado a un transductor de tensión isométrica (modelo FT03, Grass Instruments, Rhode Island, E.UA.) 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 digital analógico (Digidata 1200A, Axon Instruments).

La tensión isométrica fue registrada, almacenada y analizada en una computadora y los datos procesados mediante un programa de Axoscope v. 7.0 (**Figura 8**).

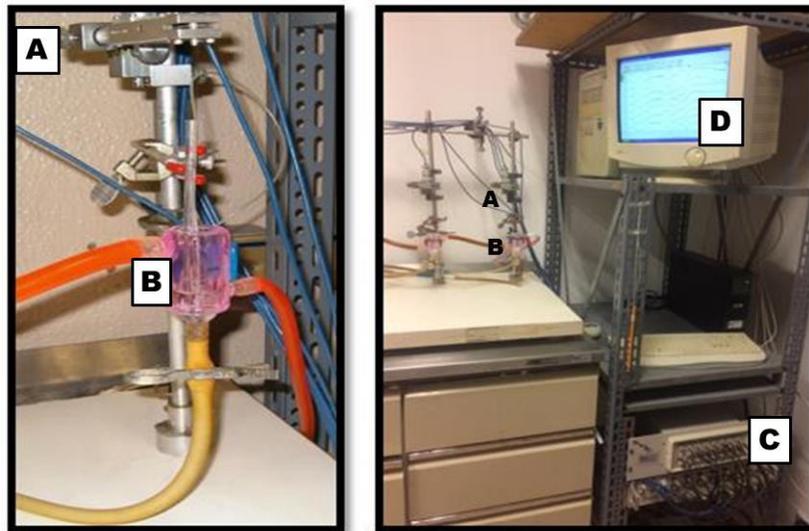


Figura 8. Sistema de órganos aislados. A) Transductor de tensión isométrica; B) Solución de Ringer de Krebs; C) Amplificador y convertidor digital; D) computadora.

Cada uno de los tejidos se mantuvo a 1 g de tensión durante 30 min con la finalidad de estabilizar el tejido, antes de iniciar el protocolo. Con el propósito de normalizar las respuestas de los tejidos, se estimularon 3 veces con 60 mM de KCl durante 30 min hasta alcanzar la respuesta máxima de contracción. Para evaluar la relajación inducida por salbutamol, los tejidos fueron pre-contraídos con 20 o 60 mM de KCl hasta que alcanzaron su respuesta máxima y enseguida se realizó una curva concentración respuesta acumulativa a salbutamol (1 nM a 10 μ M; Sigma, No. Cat. S5013).

Para evaluar la participación de ERK1/ERK2 en la relajación inducida por salbutamol, en otros grupos experimentales los tejidos se incubaron durante 30 minutos con PD98059 (PD: inhibidor de la MEK, Tocris bioscience, No. Cat. 1213), a 1, 10, 32 y 50 μ M; antes de que fueran pre-contraídos con 20 mM de KCl, una vez que alcanzaron su respuesta máxima de contracción se realizó la curva concentración respuesta a salbutamol (1 nM a 10 μ M).

Por otro lado, para corroborar si efectivamente ERK1/ERK2 son las cinasas que participan en la relajación inducida por salbutamol se utilizó un inhibidor altamente selectivo para estas cinasas, el U0126 (Calbiochem, No. Cat. 662005, 5 μ M) así como su análogo inactivo, el U0124 (Calbiochem, No. Cat. 662006, 5 μ M). Cuando se incubó este inhibidor y su análogo se realizó el mismo protocolo que con el PD98059.

Al finalizar cada experimento en órganos aislados, cada segmento de tráquea se disecó para obtener únicamente el músculo liso, éste se colocó en un criotubo. Los criotubos que contenían los tejidos se introdujeron inmediatamente en nitrógeno líquido. Posteriormente, las muestras se almacenaron a -80°C .

WESTERN BLOT

Extracción y cuantificación de proteínas. Cada una de las muestras preservadas a -80°C se les añadió $500\ \mu\text{L}$ de una solución buffer de lisis que contenía: Tritón X-100 1%, Tris 50 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM, fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) 1mM, aprotinina $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$, leupeptin $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$, Na_3VO_4 1mM, NaF 50mM y un coctel inhibidor de proteasas (Protease Inhibidor Cocktail Set III, (Calbiochem®, No. Cat. 539134, 1:250 v/v) y se incubaron durante 30 min a 4°C . Posteriormente, cada tejido fue homogeneizado (Omni Tip Plastic Homogenizer Probes, OMNI International, USA, Kennesaw, GA) y concentrado a $100\ \mu\text{L}$ mediante filtración a través de una membrana Amicon® Ultra-4 (30,000 Molecular Weight Cut-off; Millipore, No. Cat. UFC803096) con centrifugación a 3000 rpm durante 12 min a 4°C . La determinación de proteína se realizó mediante el método de Lowry utilizando un kit comercial (DC™ protein Assay, Bio Rad, No. Cat. 500-0116).

Electroforesis: Se utilizaron $40\ \mu\text{g}$ de proteína total por muestra. A cada muestra se le añadió $10\ \mu\text{L}$ de solución de carga (Tris-HCl 0.5 M [pH 6.8], dodecil sulfato de sodio (SDS) 2 %, 2-mercaptoetanol 0.1 %, glicerol 10 % y azul de bromofenol 0.01 %), luego se calentaron a 98°C aproximadamente durante 5 min a baño María, posteriormente cada muestra fue cargada en diferentes líneas de los geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 10 % (**gel separador:** poliacrilamida 30 %, Tris-HCl 1.5 M con pH 8.8, SDS 10 %, agua desionizada 2.608 mL, TEMED $15\ \mu\text{L}$ y persulfato de amonio 10 %; **gel concentrador:** poliacrilamida 30%, Tris-HCl 1.5 M con pH 6.8, SDS 10 %, agua desionizada 1.525 mL, TEMED $15\ \mu\text{L}$ y persulfato de amonio 10 %). La separación de las proteínas se realizó por electroforesis con una solución amortiguadora (Tris 0.025 M, Glicina 0.192 M y SDS 0.1 %), a 10°C durante 2 h a 100V.

La electrotransferencia de las proteínas se realizó sobre una membrana de nitrocelulosa con un buffer de transferencia (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M y metanol 20 %) a 10°C durante 1h a 100V.

Inmunodetección: Las membranas de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se bloquearon con 15 ml de un buffer salino-Tris (TBS: Tween 20 al 0.1 % y leche descremada al 5 % durante 1.5 h a temperatura ambiente y cubierto de la luz. Posteriormente las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con un anticuerpo primario policlonal de conejo contra MAP cinasa fosforilada (Phospho- p44/42 MAPK; Cell Signaling, No. Cat. 9101S, Beverly, MA) 1:1000 v/v en TBS-Tween 20 y leche descremada al 5 %.

Posteriormente, para retirar el exceso de anticuerpo las membranas se lavaron tres veces con 20 mL de TBS+Tween 20 durante 15 min. Finalmente, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario conjugado-HRP goat anti-rabbit IgG (Millipore, No. Cat. 12-348) 1:2000 v/v, durante 1 h a 37°C en agitación y cubierto de la luz; después de este tiempo las membranas volvieron a lavarse como se describió anteriormente.

La detección de las proteínas se realizó usando un substrato quimioluminiscente (Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, No. Cat. 34096; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). El anticuerpo monoclonal anti-ratón GAPDH se utilizó como un control de la proteína cargada (Invitrogen, Frederick, MD, USA, No. Cat. 39-8600) 1:1000 v/v. Estas membranas se incubaron con un anticuerpo secundario anti- ratón IgG-HRP (Abcam, Cambridge, MA, USA, No. Cat. ab97046) 1:10 000 v/v. Los inmunoblots fueron analizados por densitometría usando un software de Molecular Imaging ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Hercules).

ANALISIS ESTADISTICO

Los estudios en órganos aislados fueron evaluados mediante la respuesta máxima de relajación inducida por el salbutamol entre cada concentración. Los datos se evaluaron mediante la prueba t de Student pareada. En algunos experimentos se utilizó análisis de varianza y pruebas de comparación múltiple como 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.

FARMACOS

➤ KCl

El compuesto químico inorgánico, cloruro de potasio (KCl), es un haluro metálico compuesto de potasio y cloro, en su estado puro es inodoro. El cloruro de potasio se utiliza en medicina, aplicaciones científicas y procesamiento de alimentos (Figura 9).

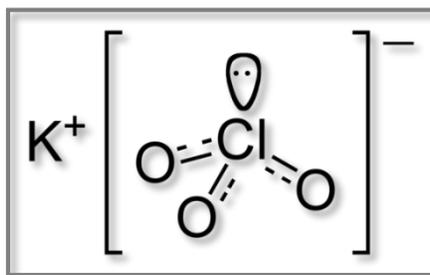


Figura 9. Estructura química del KCl

➤ Salbutamol

El salbutamol es un agonista de los los receptores β_1 y β_2 ; en las vías áreas su efecto principal es relajar el musculo liso traqueobronquial. Su introducción como fármaco fue en los 1964 (Gerthoffer, et al., 1997; Sigma No. Cat. S5013; Figura 10).

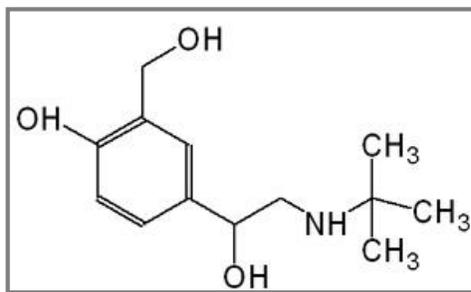


Figura 10. Estructura química del salbutamol

➤ **PD 98059**

PD 98059 fue el primer inhibidor sintético de la proteína cinasa activada por mitógenos (MEK). El nombre oficial es [2- (2'-amino-3'-metoxifenil)-oxanaftalen-4-ona], es un flavonoide que se utiliza con frecuencia experimentos *in vivo* e *in vitro*, e implica la inhibición de las vías de señalización de ERK1, ERK2 y ERK 5. PD 98059 no inhibe Raf, pero previene la activación de la cinasa MEK *in vitro* en concentraciones IC₅₀= 2-7 μM. El alto grado de especificidad de PD 098059 *in vitro* e *in vivo* está indicado por su incapacidad para inhibir 18 proteína Ser /Thr cinasas (Chen X.Y., *et al.*, 2015; Alessi D., *et al.*, 1995; Davies S.P., *et al.*, 2000; Tocris bioscience, No. Cat. 1213; **Figura 11**).

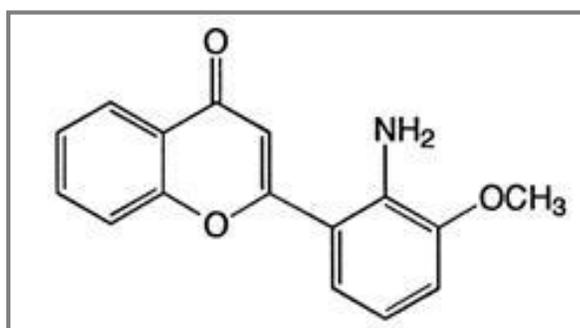


Figura 11. Estructura química del PD 98059

➤ **U0126.**

U0126 fue sintetizado a finales de la década de 1950 por W. J. Middleton. Su nombre oficial es: 1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis (2-aminophenylthio) butadieno; es bastante estable en su estado cristalino incluso después de cuatro décadas de almacenamiento y actualmente es un potente inhibidor de la actividad transcripcional ERK1. Aunque es fácilmente susceptible de isomerización y ciclación. (Duncia J., *et al.*, 1998; Calbiochem, No. Cat. 662005; **Figura 12**).

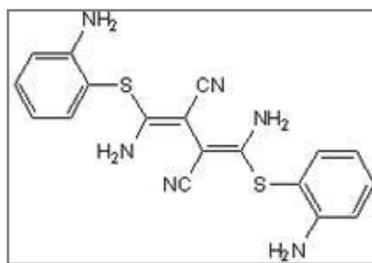


Figura 12. Estructura química del U0126

➤ **U0124.**

Análogo inactivo de U0126. No inhibe MEK en concentraciones de hasta 100 μ M. Su nombre oficial es: 1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(methylthiol)butadieno (Favata M., 1998; Calbiochem, No. Cat. 662006; **Figura 13**)

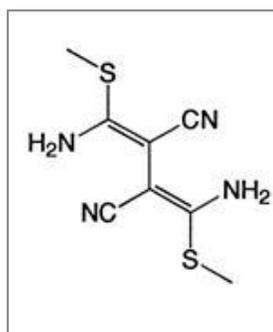


Figura 13. Estructura química del U0124

RESULTADOS

Evaluación de la relajación inducida por salbutamol sobre la respuesta de contracción 60mM y 20 mM de KCl en la tráquea de cobayo.

En estos experimentos se disecaron segmentos de tráquea de cobayo. La respuesta de contracción de cada tejido se normalizó al dar tres estímulos previos con 60 mM de KCl antes del protocolo experimental. Posteriormente, los tejidos se pre-contrajeron con 60 mM de KCl o 20 mM de KCl hasta alcanzar su respuesta máxima, y después se realizaron curvas concentración-respuesta para el salbutamol (1 nM a 10 μ M). Encontramos que la administración acumulativa de salbutamol (1 nM a 10 μ M, n=12) produjo una respuesta de relajación del músculo liso de la vía aérea (MLVA), en el caso de los tejidos pre-contraídos con 60 mM de KCl esta relajación fue significativa ($p < 0.05$) en concentraciones altas (**Figura 14A**). Sin embargo, cuando el MLVA fue pre-contraído con 20 mM de KCl esta relajación fue más evidente y altamente significativa ($p < 0.01$) a partir de 10 nM (**Figura 14B**).

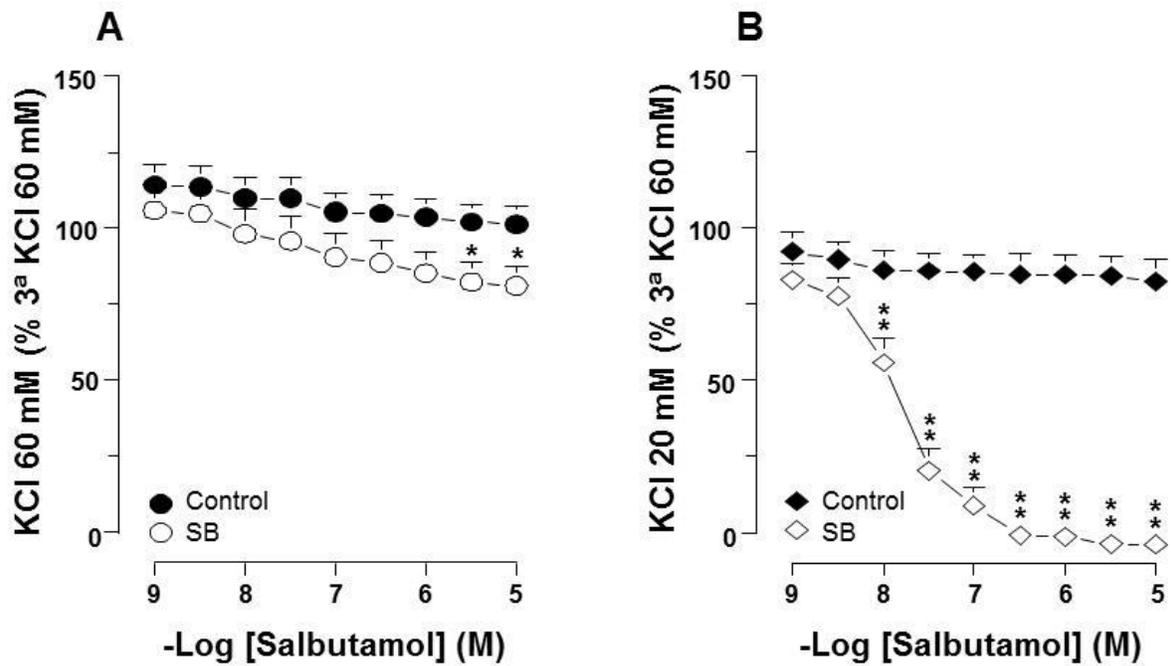


Figura 14. Curva Acumulativa concentración respuesta a salbutamol (SB: 1 nM – 10 μ M) en segmentos de tráquea de cobayo pre-contraídos con KCl. A) 60 mM de KCl (n=12) y B) 20 mM de KCl (n=12). Se utilizó una t de Student pareada con *p<0.05 y **p<0.01. Los símbolos representan el promedio \pm el error estándar.

Participación de ERK1 y ERK2 en la relajación inducida por salbutamol

Para evaluar si la relajación inducida por salbutamol en el MLVA pre-contraído con 20 mM de KCl o 60 mM de KCl podría deberse a la fosforilación de ERK1/ERK2, decidimos explorar su participación mediante western blot. Los tejidos fueron pre-contraídos con 20 mM de KCl o 60 mM de KC hasta alcanzar su respuesta máxima, y después se realizaron curvas concentración-respuesta para el salbutamol (1 nM a 10 μ M). La fosforilación de ERK1/ERK2 se evaluó en los tejidos con una concentración final acumulativa de 10 μ M de salbutamol y en los tejidos donde no se relajaron con salbutamol. El análisis de densitometría de nuestros datos de Western blots (n=8, para cada grupo) mostraron que salbutamol incremento significativamente ($p<0.05$) la fosforilación de ERK2 inducida por 20 mM de KCl, sin embargo, salbutamol no modifico la fosforilación de ERK1. Por otro lado, salbutamol produjo una disminución significativa ($p<0.05$) en la fosforilación de ERK1/ERK2 inducido por 60 mM de KCl. Estos datos se analizaron en porcentaje con respecto al grupo control sin ningún estímulo o tratamiento (C, **Figura 15**).

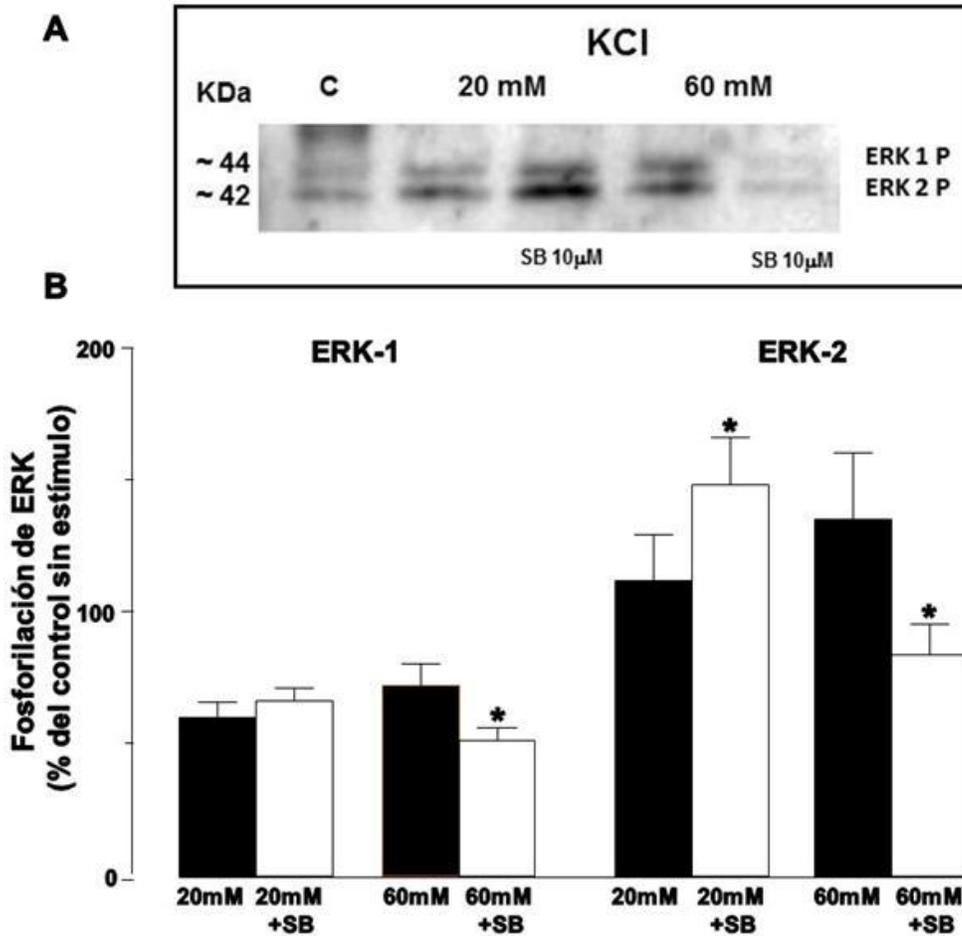


Figura 15. Efecto del salbutamol (SB 10 μ M) sobre el músculo liso de la tráquea de cobayo pre-contraído con 20 mM de KCl o 60 mM de KCl (n=8). A) Western Blot representativo de la fosforilación de ERK1 Y ERK2. B) Análisis por densitometría de la fosforilación de ERK1 Y ERK2, las barras negras representan el grupo control para 20 mM de KCl y 60 mM de KCl. Las barras blancas representan el efecto del SB sobre la fosforilación de ERK1 Y ERK2 sobre el músculo liso de tráquea de cobayo pre-contraído con 20 mM de KCl o 60 mM de KCl. Se utilizó una t de Student pareada con una $*p < 0.05$. Las barras representan el promedio \pm error estándar en % con respecto al grupo control sin ningún estímulo o tratamiento (C).

Efecto del PD 98059 o U0126 sobre la relajación inducida por salbutamol en el MLVA pre-contraído con 20 mM de KCl

Nosotros observamos previamente en órganos aislados que salbutamol (10 μM) induce el 100% de relajación cuando el MLVA es pre-contraído con 20 mM de KCl que con 60 mM de KCl, además también observamos que salbutamol produjo un incremento significativo en la fosforilación de ERK 2. Para corroborar la participación de la ERK1/ERK2 en la relajación inducida por salbutamol en los tejidos pre-contraídos con 20 mM de KCl; decidimos preincubar durante 30 min antes de la respuesta de pre-contracción con 20 mM de KCl con inhibidores de las MAP cinasas y posteriormente realizamos una curva concentración respuesta a salbutamol (1nM - 10 μM). El primer inhibidor que utilizamos fue el PD 98059 (inhibidor de la MEK, cinasa serina/tirosina/treonina) a diferentes concentraciones (1, 10, 32 y 50 μM). Nosotros encontramos que las concentraciones de 1,10 y 32 μM PD 98059 disminuyeron parcialmente el efecto de relajación del salbutamol en el MLVA pre-contraído con 20 mM de KCl. Sin embargo, cuando utilizamos 50 μM de PD 98059, éste bloqueó completamente el efecto del salbutamol en la pre-contracción del MLVA por 20 mM de KCl (**Figura 16**).

Por otro lado, con el propósito de corroborar si la vía de señalización era efectivamente a través de la ERK1 y ERK2, se realizaron otra serie de experimentos en donde el MLVA se incubó durante 30 min con el U0126 (inhibidor específico de estas MAPK, 5 μM) o el U0124 (análogo inactivo del inhibidor U0126, 5 μM) antes de pre-contrair el tejido con 20 mM de KCl. Encontramos que la pre-incubación del U0126 disminuyó parcialmente y significativamente el efecto relajante del salbutamol sobre la relajación del MLVA pre-contraído con 20 mM de KCl. En cuanto al U0124, tal como se esperaba no tuvo ningún efecto sobre la respuesta de relajación inducida por este agonista β_2 adrenérgico (**Figura 17**).

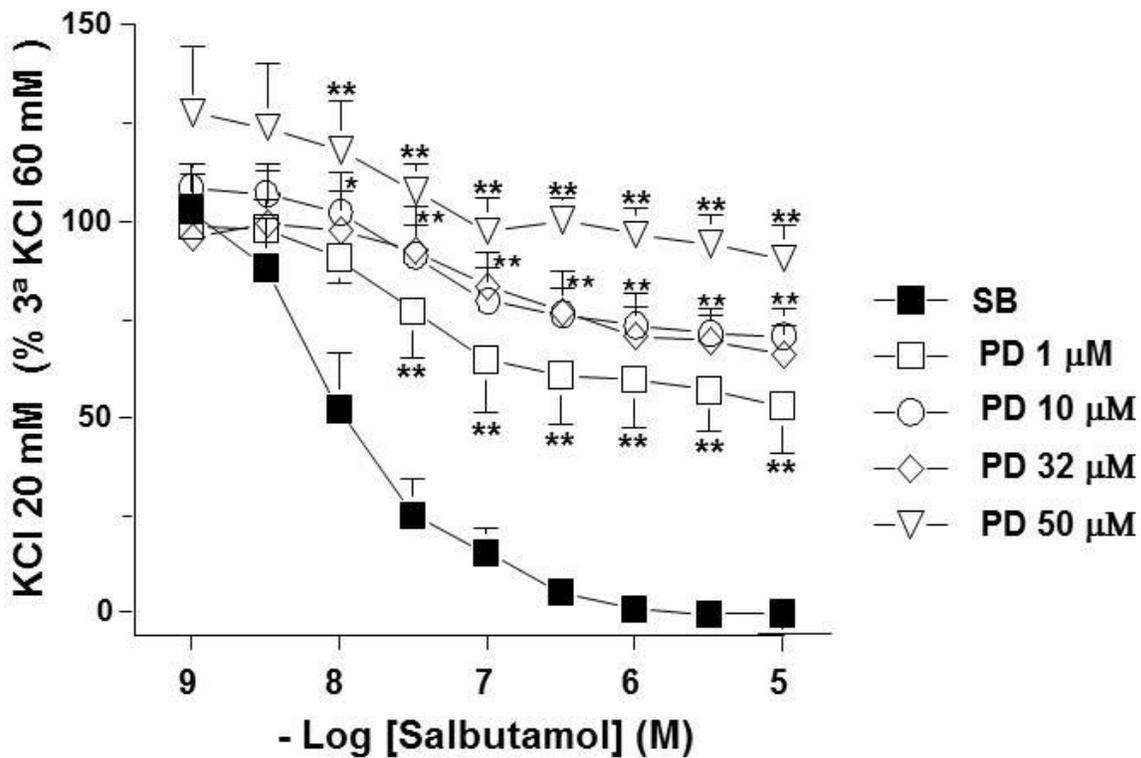


Figura 16. Efecto del inhibidor de la MEK: PD 98059 (n=5, para cada concentración, 1,10,32 y 50 μM) sobre la respuesta de relajación inducida por Salbutamol (SB) en anillos de tráquea de cobayo pre-contraídos con 20 mM de KCl. Se utilizó una prueba de Dunnett con una *p<0.05 y **p<0.01. Los símbolos representan el promedio ± el error estándar.

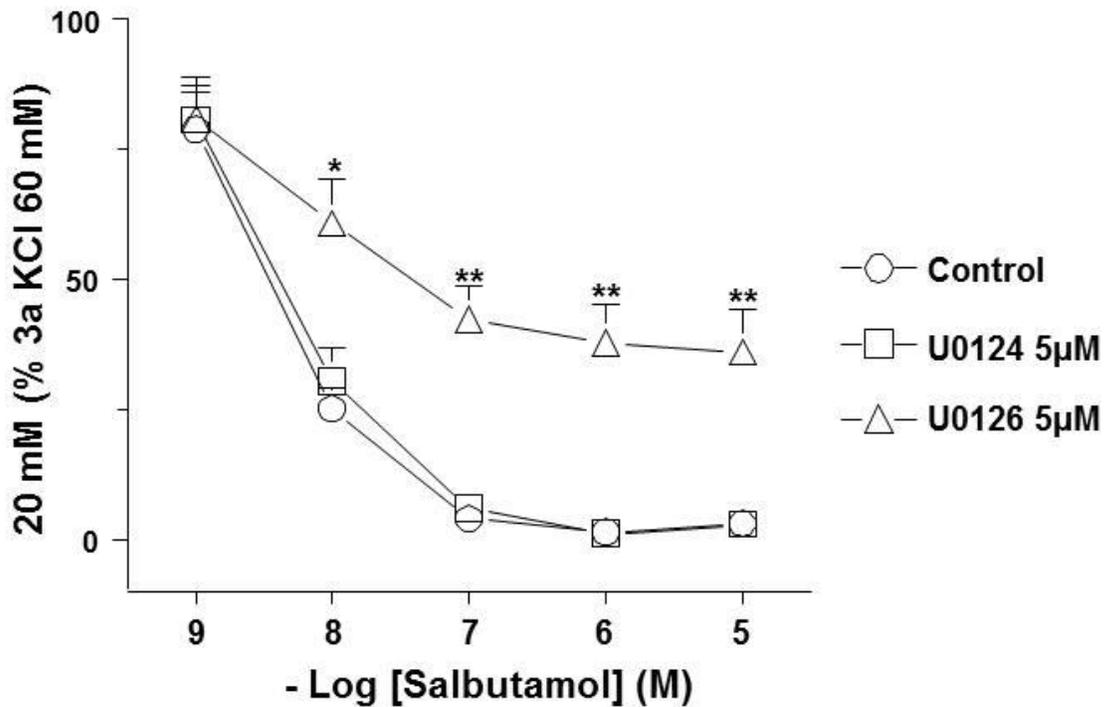


Figura 17. Efecto del U0126 sobre la respuesta de relajación inducida por salbutamol en el MLVA de tráquea de cobayo pre-contráidos con 20 mM de KCl. ○: 20 mM de KCl + salbutamol (n=3); □ ,U0124 5µM + 20 mM de KCl + salbutamol (U0124, análogo inactivo de U0126, n=3); △ ,U0126 5 mM + 20 mM de KCl + salbutamol (U0126 inhibidor selectivo de las MAPK ERK1/ERK2,n=3). Se utilizó una prueba de Dunnett con una *p<0.05 y **p<0.01. Los símbolos representan el promedio ± el error estándar.

Efecto del PD 98059 sobre la fosforilación de ERK1 y ERK2 en la relajación inducida por salbutamol en el MLVA pre-contraído con 20 mM de KCl

El hecho que PD (1, 10 y 32 μM , n=5) disminuirá parcialmente la relajación inducida por salbutamol en el MLVA pre-contraído con 20 mM de KCl, nos llevó a explorar si la fosforilación de la ERK1/ERK2 estaba alterada. El análisis de densitometría nos mostró que sólo PD 98059 50 μM disminuyó significativamente (* $p < 0.05$) la fosforilación ERK1. Por otro lado, encontramos que las concentraciones de PD 98059 32 μM y 50 μM disminuyeron de forma significativa ($p < 0.01$) la fosforilación de ERK2 (**Figura 18**).

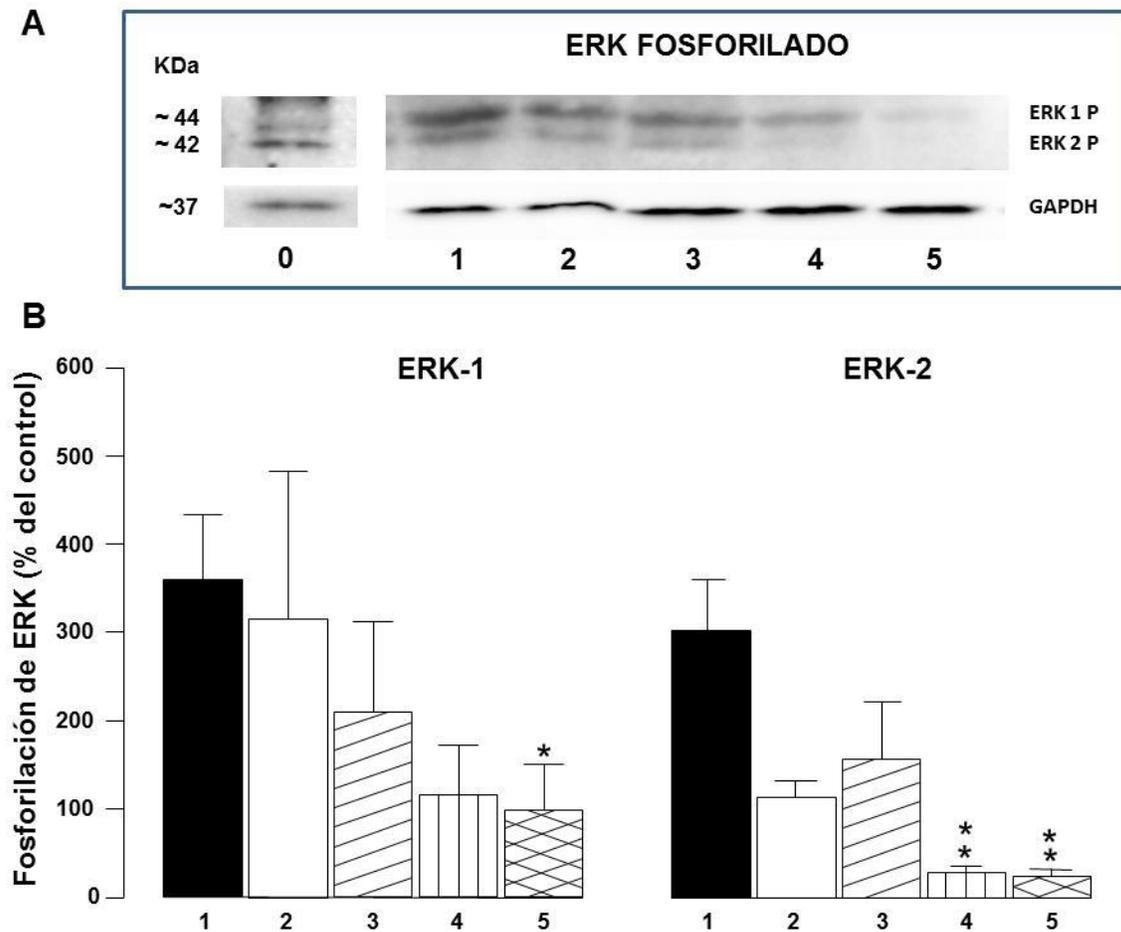


Figura 18. PD 98059 inhibe la fosforilación de ERK1/2 inducida por salbutamol en el MLVA pre-contráido con 20 mM de KCl. A) Western Blot representativo del efecto del PD 98059 (PD: 1, 10, 32 y 50 μ M, n=5) sobre la fosforilación de ERK1 y ERK2 inducida por salbutamol (SB: 10 μ M) en el músculo liso de las vías aérea de cobayo precontraído con 20 mM de KCl (KCl). B) Análisis por densitometría del efecto de PD98059 sobre la fosforilación de ERK1 y ERK2. Todos los valores fueron ajustados como porcentaje al control sin ningún tratamiento. Línea 0, control sin ningún tratamiento; línea y barra 1, KCl + SB; línea y barra 2, PD 1 μ M + KCl + SB; línea y barra 3, PD 10 μ M + KCl + SB; línea y barra 4, PD 32 μ M + KCl + SB; línea y barra 5, PD 50 μ M + KCl + SB. Las barras representan el promedio \pm error estándar. Se utilizó una prueba de Dunnett con una * p <0.05 y ** p <0.01.

DISCUSIÓN

En este trabajo, encontramos que salbutamol fue capaz de inducir una rápida relajación sobre el MLVA de cobayo pre-contraído con 20 mM de KCl. Sin embargo, cuando el MLVA fue pre-contraído con 60 mM de KCl el efecto de salbutamol fue menor aún a una mayor concentración de este agonista. Este hallazgo nos sugirió que había un mecanismo diferente involucrado en el efecto de relajación inducido por salbutamol.

En 2006, Giembycz & Newton reportaron que los β 2-AR pueden acoplarse a múltiples proteínas unidoras de GTP, incluyendo Gi, permitiendo la activación de la vía de las MAP cinasas, activando a ERK1 y ERK2. Por otro lado, Adam, *et al.* (1989), encontraron que, en el músculo liso vascular en reposo, caldesmon (un miofilamento del músculo liso) se encuentra fosforilado y que los niveles de fosforilación incrementan significativamente en respuesta a diferentes agentes farmacológicos tales como KCl, histamina, ouabaina y 12,13 forbol dibutirato (PDB). Caldesmon es fosforilado mediante la activación de las MAPcinasas (Gerthoffer, *et al.*, 1997), indicándonos de manera indirecta la previa fosforilación de estas cinasas. También se ha descrito que, en células cerebrales, ERK1 y ERK2 son activadas por niveles depolarizantes de KCl (Obara, *et al.*, 2007).

En este contexto, nosotros encontramos que KCl incrementa la fosforilación de ERK1/2 y es dependiente de la concentración utilizada en el MLVA de cobayo.

Se sabe que los agonistas β 2-adrenérgicos actúan a través de su receptor β 2 y que se encuentra acoplado a una proteína G, específicamente Gs y Gi actualmente está bien documentado que existe una comunicación cruzada entre la vía de señalización de receptores acoplados a proteínas G y la vía de la cinasa de tirosina (Daaka, *et al.*, 1997; Crespo P., *et al.*, 1995; Giembycz, *et al.*, 2006). Esta situación significa que salbutamol puede estimular estas dos vías, la tradicional, incrementando los niveles de AMPc para activar a la PKA y la vía de la cinasa de tirosina a través de la activación de Ras-Raf-1 y por ende la fosforilación de ERK1 y ERK2. Sin embargo, Crespo P., *et al.*, encontraron en células COS-7 que la

señalización de los receptores acoplados a proteínas Gs a MAP cinasas tienen 2 componentes distintos: una vía de activación mediada por la subunidad $\beta\gamma$ que actúa a través de Ras-Raf-1 y una vía inhibitoria inducida por $G\alpha_s$ mediada por AMPc y PKA. Interesantemente, nosotros encontramos que el efecto de salbutamol sobre el MLVA pre-contraído con 20 mM de KCl incrementó los niveles de fosforilación de ERK2 con respecto a su control y que su posible explicación es que la vía de señalización que se está activando es a través de la subunidad $\beta\gamma$ para fosforilar a las MAP cinasas. En contraste, el efecto de salbutamol sobre el MLVA pre-contraído con 60 mM de KCl disminuyó significativamente la fosforilación de ERK1/2 con respecto a su control, este fenómeno se podría explicar porque AMPc-PKA inhibe la fosforilación de Ras-Raf-1 y por consiguiente la fosforilación de ERK1/2.

Por otro lado, encontramos que el PD 98059 (1, 10 y 32 μ M, inhibidor de la MEK) disminuyó ~ 50% y un 100 % con 50 μ M el efecto de relajación del salbutamol en el MLVA pre-contraído con 20 mM de KCl, este hallazgo fue confirmado cuando utilizamos el U0126 (5 μ M, inhibidor específico de la ERK1 /ERK2).

Estos hallazgos son diferentes a los encontrados por Lelliott, *et al.*, (2012), ellos reportaron que los agonistas contráctiles carbacol, histamina y endotelina-1 (ET-1), incrementan la fosforilación de ERK1 y ERK2, y que PD98059 no tenía ningún efecto sobre la contracción inducida por estos agonistas. Sin embargo, isoprenalina (agonista β 2-adrenérgico) indujo relajación en el MLVA de porcino pre-contraído con carbacol y esta relajación fue prevenida con TEA (un bloqueador de los canales $BK_{Ca^{2+}}$). Sin embargo, cuando utilizaron un activador de la adenilato ciclasa (forskolina) no hubo relajación. Sugiriendo que la relajación era debida a un mecanismo independiente de AMPc y posiblemente a través de una interacción con el canal de $BK_{Ca^{2+}}$ (Lelliott, *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren la posibilidad que salbutamol induce relajación en el MLVA de cobayo pre-contráido con 20 mM de KCl a través de la activación de Ras-Raf-1 para activar la fosforilación de ERK1/ERK2. Por otro lado, salbutamol inhibe la fosforilación de ERK1 y ERK2 a través de AMPc-PKA en el MLVA de cobayo pre-contráido con 60 mM de KCl.

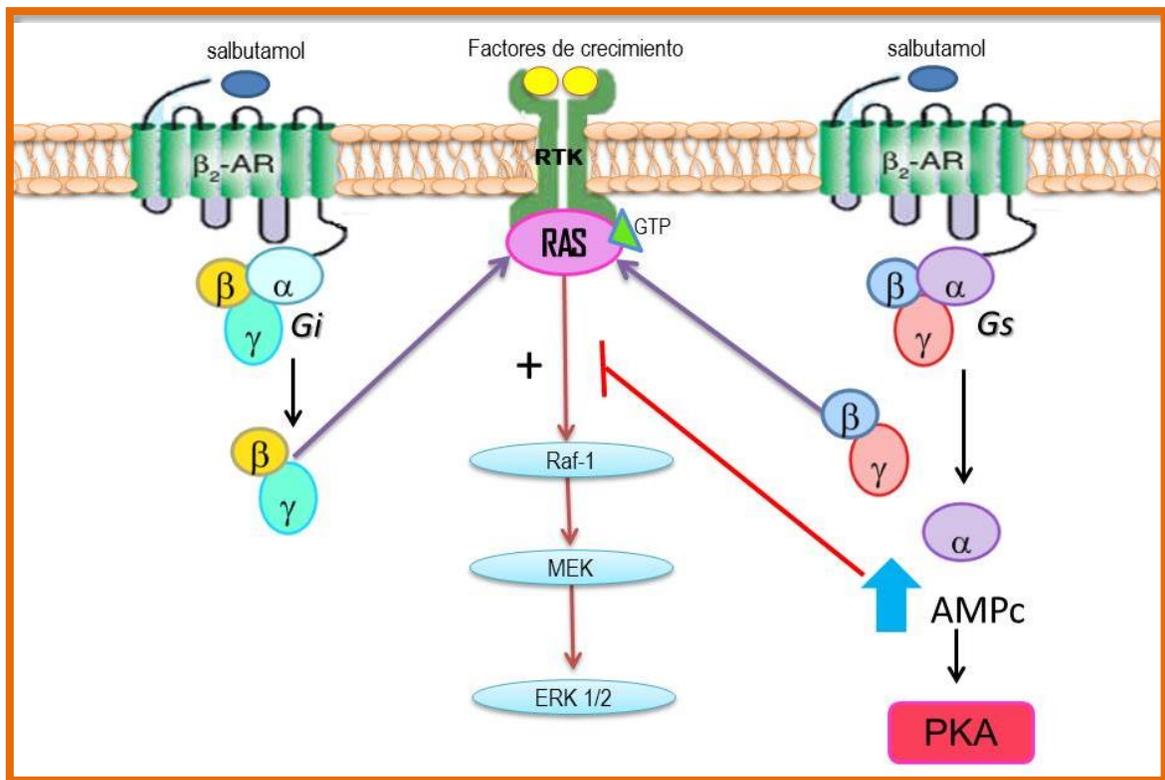


Figura 19. Posible mecanismo de interacción de los β_2 -AR con la vía de las MAPK. La estimulación del β_2 -AR por salbutamol, puede activar la vía de señalización de ERK a través de la proteína Ras, mediante la subunidad $\beta\gamma$ de las proteínas G_i . Por otro lado, la subunidad α de la proteína G_s participa en el incremento de AMPc, el cual puede inhibir a la proteína Ras. Tomado y Modificado de Stork, *et al.*, 2002

PERSPECTIVAS

Aunque en este trabajo se describen algunos de los mecanismos involucrados en la relajación por los agonistas β_2 adrenérgicos en el mecanismo de contracción electromecánico, aún quedan vías de señalización no exploradas y que requieren de nuestra atención por lo que en un futuro próximo exploraremos si la fosforilación de ERK1 y ERK2, fosforilan a la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP), además de verificar que papel juega la sensibilización al calcio en este fenómeno.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Adam Leonard P., Joe R., Haeberl E. & David R.** Phosphorilation of Caldesmon in Arterial Smooth Muscle. *Journal of Biological and Chemistry*. 264 (13): 7698-7703, 1989.
2. **Ahlquist Raymond P.** A study of adrenotropic receptors. American Physiological Society. 153: 586-600, 1948.
3. **Alessi D., Cuenda A., Cohen P., Dudley D. & Saltiel A.** PD98059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *Journal of Biological and Chemistry*. 270: 27489–27494, 1995.
4. **Arreola Ramírez José Luis, Morales Hernández Pablo Ernesto, Fálcon Rodríguez y Segura Medina Patricia.** Aspectos generales de la inervación pulmonar. *Gaceta Médica de México*. 149: 502- 508, 2013.
5. **Barisione G., Baroffio M., Crimi E., & Brusasco R.** Beta-Adrenergic Agonists. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland). 3(4): 1016–1044, 2010.
6. **Barnes P.J.** Adrenoceptors on smooth muscle, nerves and inflammatory cells. *Life Sciences*. 52: 2101–2109, 1993.
7. **Barnes P.J.** New drugs for asthma. *Nature Reviews Drug Discovery*. 3: 831–844, 2004.
8. **Baynes J.W. & Dominiczak M.H.** Bioquímica Médica. Elsevier. Vol.3, 2008.
9. **Bazan Perkins B., Flores Soto E., Barajas López C. & Montaña L.M.** Role of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content in Ca^{2+} entry of bovine airway smooth muscle cells. *Naunyn Schiedeberts Archives Pharmacology*. 368:277-83, 2003.
10. **Berridge, M.J.** *Cell Signalling Biology*, doi:10.1042/csb0001002. 2014.
11. **Carbajal Salinas Verónica E.** Participación de la cinasa de proteína C y la cinasa de tirosina en la hiperreactividad inducida por el leucotrieno D4 a la histamina en tiras de músculo liso traqueal de bovino (Tesis de Doctorado). Instituto Politécnico Nacional. México. DF., 2006.

12. **Carrasco C.** Avances en la terapia inhalatoria de las vías aéreas en asma y EPOC. *Chilena Enfermedades Respiratorias*. 29: 204–2019, 2013.
13. **Cazzola M., Page C. P., Calzetta L., & Matera M.** Pharmacology and Therapeutics of Bronchodilators. *Journal of Biological Chemistry*. 64(3): 450–504, 2012.
14. **Charlotte K., Billington P., Raymond B. Penn J., & Ian P.** β 2-agonists. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 237: 23–40, 2017.
15. **Chen XY., Cai HZ., Wang XY., Chen QY., Yang H., Chen YJ. & Tang YP.** Application of the ERK signaling pathway inhibitor PD 98059 in long-term in vivo experiments. *Genetics and Molecular Reserch*. 14 (4): 18325-18333, 2015.
16. **Cohen J., Miles M., Donohue J., & Ohar A.** Dual therapy strategies for COPD: the scientific rationale for LAMA + LABA. *International Journal of COPD*. 3: 785–797, 2016.
17. **Crespo P., Cachero G., Xu N. & Gutkind S.** Dual Effect of β -Adrenergic Receptors on Mitogen-activated Protein. *Journal of Biological and Chemistry*. 270(42): 25259–25265, 1995.
18. **Daaka Y., Louis M. L. & Robert J. L.** Switching of the coupling of the β_2 -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Journal Nature*. 390: 88-91, 1997.
19. **Davies S., Reddy H., Caivano M. & Cohen P.** Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochemical Journal*. 351: 95–10, 2000.
20. **Duncia J., Santella B., Higley A., Pitts W., Frieze E., Tabaka C., Favata M., & Trainor G.** MEK inhibitors: The Chemistry and Biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Journal Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 8: 2839-2844, 1998.
21. **Deshpande D. & Penn B.** Targeting G protein-coupled receptor signaling in asthma. *Cell Signal* 18: 2105–2120, 2006.

22. **Favatta M., Horiuch K., Manos E., Daulerio A., Stradley D., Feeser W., Van D., Pitts W., & Trzaskos J.**, Identification of a novel inhibitor of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 18623-18632, 1998.
23. **Fernández C., Vives R. & Daroca P.** www.seaic.org/wpcontent/plugins/downloadbetaagonistas.
24. **Gerthoffer W., Yamboliev A., Pohl J., Haynes R., Dang S. & McHugh, J.** Activation of MAP kinases in airway smooth muscle. *The American Journal of Physiology*. 272(21): L244-52, 1997.
25. **Giembycz M. A. & Newton R.** Beyond the dogma: novel β_2 -adrenoceptor signalling in the airways. *The European Respiratory Journal*. 27(6): 1286–1306, 2006.
26. **Gnus J., Czeerski A., Ferenc S., Zawadzi W., Witkiewicz W., Hauzer W., Rusiecka A. & Bujok J.** In vitro study on the effects of selected agonists and antagonists of alpha- adrenergic receptors on the contractility of the aneurysmally-changed aortic smooth muscle in humans. *Journal Physiology Pharmacology*. 63(11): 29-32, 2012.
27. **Goldie R.G.** Receptors in asthmatic airways. *American Review of Respiratory Disease*. 141: 151-156, 1990.
28. **Hall I.** Second messengers, ion channels and pharmacology of airway smooth muscle. *European Respiratory Journal*. 15:1120-1127, 2000.
29. **Hansel T.T. & Barnes P.J.** Introduction: definitions, burden and causation. *An Atlas of Chronic Obstructive Pulmonary Disease COPD* New York U.S.A: Pathernon publishing. 160-162, 2004.
30. **Hartley D. & Middlesmiss D.** Absolute configuration of the optical isomers of salbutamol. *Journal Medical Chemistry*. 14(9): 995-6, 1971.
31. **Harry J. Mersmann.** Overview of the effects of β -adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. *Journal of Animal Science*. 76 (1): 160–172, 1998.

32. **Hemric M.E., Lu F.W., Shrager R., Carey J. & Chalovich J.M.** Reversal of caldesmon binding to myosin with calcium-calmodulin or by phosphorylating caldesmon. *Journal Biological Chemistry*. 268: 15305-15311, 1993.
33. **Horowitz A., Walsh M.P., Clement-Chomienne O, Andrea J.E., Allen B.G., & Morgan K.G.** Protein kinase C mediation of Ca²⁺- independent contractions of vascular smooth muscle. *Biochemistry and Cell Biology Journal*. 74: 485–502, 1996.
34. **Jarilla Diez J.L. & Gutiérrez Fernández B.** Receptores adrenérgicos en el asma bronquial. *Archivos de Bronconeumología*. 28: 286-295, 1992.
35. **Lands A., Groblewski G. & Brown T.** Comparison of the action of isoproterenol and several related compounds on blood pressure, heart and bronchioles. *International Journal of Pharmacology* 16 (1): 68-75, 1996.
36. **Langer S.** Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochemical Pharmacology*. 23: 1793-1800, 1974.
37. **Lee J.F., Ulevitch R.J. & Han J.** Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinasa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 213: 715-724, 1995.
38. **Lelliot A., Nikkar-Estahani A., Offer J., Orchard P. & Roberts R.E.** The role of extracellular-signal regulates kinase (ERK) in the regulation of airway tone in porcine isolated peripheral bronchioles. *European Journal Pharmacology*. 15 (674): 407-14, 2012.
39. **Libretto S.E.** A review of the toxicology of salbutamol (albuterol). *Archives of Toxicology*. 68(4): 213-216, 1994.
40. **Lümann H., Mohr K. & Hein L.** Farmacología Texto y Atlas. 6ta Edición. *Editorial Médica Panamericana*. México. 520p, 2008.
41. **Malcolm Jhohnson.** Molecular mechanism of β_2 -adrenergic receptor function, response, and regulation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 117: 18-24, 2006.
42. **Mendoza N.** Farmacología Médica. 5ta Edición. *Editorial Médica Panamericana S.A. de C.V.* 1008p, 2008.

43. **Mersmann H.J.** Overview of the effects of beta-adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanism of action. *Journal Animal Science*. 76 (1): 160-72, 1998.
44. **Montaño L.M, Barajas-López C & Daniel E.E.** Canine bronchial sustained contraction in Ca²⁺-free medium: role of intracellular Ca²⁺. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 74(12): 36-48, 1996.
45. **Obara Y., Angela M. H. & Philip I. S.** The requirement of Ras and Rap1 for the activation of ERKs by cAMP, PACAP, and KCl in cerebellar granule cells. *Journal of Neurochemistry*. 101: 470-782, 2007.
46. **Op't Holt.** Inhaled Beta Agonists SABA Mechanism of Action. *Respiratory Care* . 52 (7): 820–832, 2007.
47. **Oscanoa Teodoro.** Seguridad de los beta 2 agonistas (β_2 A) revisar bien el titulo en asma bronquial. *Horizonte Médico*. 3 (14): 49-55, 2014.
48. **Perpiña T. M.** Controversia sobre los agonistas adrenérgicos β_2 de acción prolongada en el asma. *Medicina Respiratoria*. 1: 21-31, 2008.
49. **Penn R. & Benovic J.** Regulation of heterotrimeric G protein signaling in airway smooth muscle. *American Thoracic Society*. 5(1): 47-57, 2007.
50. **Pfitzer G.** Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *Journal of Applied Physiology*. 91 (1): 497-503, 2001.
51. **Ratz P. H., Berg K. M., Urban N. H. & Miner A. S.** Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 288(4): C769-83, 2005.
52. **Raviña E. R.** Medicamentos: un viaje a lo largo de la evolución histórica del descubrimiento de fármacos II. *Universidad de Santiago de Compostella*. 557-562, 2008.
53. **Sánchez Mendoza María E.** Mecanismo de acción relajante de Berberina aislada de *Argemone Ochroleuca Sweet* en anillos de tráquea aislada de cobayo (Tesis de Doctorado). Instituto Politécnico Nacional. México. DF., 2007.

54. **Sandoval A., Pérez A., Cervantes E., Pérez M., Castillo P., González M., Flores M., Chávez F., Grajeda M.** Sistema Nervioso Humano. FES Iztacala UNAM. México. D.F. 514, 2014.
55. **Somlyo A. P. & Somlyo A.V.** Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*. 372: 231–236, 1994.
56. **Somlyo A. P. & Somlyo A.V.** Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *Journal Physiological*. 15 (22): 177-85, 2000.
57. **Starkey E.S., Mulla H., Sammtons H.M., & Pandya H.C.** Intravenous Salbutamol for childhood asthma: evidence-based medicine. *Archives of Disease in Childhood*. 99: 873-877, 2014.
58. **Stork P.J.S., & Schmitt J.M.** Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends in Cell Biological*. 12(6): 258-266, 2002.
59. **Thirstrup S.** Control of airway muscle tone: II- Pharmacology of relaxation. *Respiratory medicine*. 94 (6):519-28, 2000.
60. **Valdespino-Gómez V.M., Valdespino-Castillo P.M. & Valdespino-Castillo V.E.** Interacción de las vías de señalización intracelulares participantes en la proliferación celular: potencial blanco de intervencionismo terapéutico. *Cirujía y Cirujano*. 83(2):165-174, 2015.
61. **Wang Y.X., Fleischmann B.K., Kotlikoff.** M1, M2 receptor activation of nonselective cation channels in smooth muscle cells: calcium and Gi/G(o) requirements. *American Journal Physiology*. 27: C500-8, 1997.
62. **Wang W.C.H., Mihlbachler K.A., Brunnett A.C., Liggett S.B.** Targeted transgenesis reveals discrete attenuator functions of GRK and PKA in airway β_2 -adrenergic receptor physiologic signaling. *Proceedings of the National of Sciences U.S.A.* 106: 15007–15012, 2009.
63. **Walker J.K.L., Penn R.B., Hanania N.A., Dickey B.F. & Band R.A.** New perspectives regarding β_2 adrenoreceptor ligands in the treatment of asma. *Bristish Journal of Pharmacology*. 163; 18-28, 2011.

64. **Wortzel I., Seger R.** The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer*. 2(3): 195-209, 2011.
65. **Zaganjor E. & Cobb M.H.** Signal control through Raf: in sickness and in health 14 Signal control through Raf: in sickness and in health. *Nature Journal*. 22(22):14-2214, 2011.
66. **Zhang X-Y, Zhu F-X, Olszewski M.A. & Robinson N.E.** Effects of enantiomers of β_2 -agonists on ACh release and smooth muscle contraction in the trachea. *American Physiological Society*. 2(3): 32-38,1998.
67. **Zierher L.M., Davoto F.M., Fernández J.C., González C., Guelman I., Iannantuono R., López J., Miceli M., Scublinsky D., Serra H. & Zubilete M.** Farmacología General y de la Neurotransmisión. Farmacología Clínica y Farmacoeconomía. Colección de Farmacología. México. DF. 439 p. 2004.