

11261  
Eej  
1

POSIBLE PAPEL DE LAS PROSTAGLANDINAS COMO MODULADORES DEL  
SISTEMA DE RELAJACION NO ADRENERGICO EN EL MUSCULO LISO  
TRAQUEAL DEL COBAYO.

POR

M.V.Z. LUIS MANUEL MONTAÑO RAMIREZ

TESIS QUE SE PRESENTA PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRIA EN  
CIENCIAS BIOMEDICAS. ORIENTACION FARMACOLOGIA.

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

1985

FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

## RESUMEN

El músculo liso traqueobronquial de los mamíferos está innervado por el sistema nervioso autónomo y por otro componente al que se le conoce como sistema de relajación no adrenérgico, el cual es parcialmente responsable de relajar el músculo liso traqueobronquial. Con el objeto de demostrar la presencia de este sistema y corroborar la hipótesis de que en la relajación producida por este sistema están involucradas las prostaglandinas, se diseñaron los siguientes experimentos: se prepararon unas cadenas de anillos traqueales de cobayo y se incubaron en cámaras de tejido aislado que contenían solución de Krebs bicarbonatada a 37°C, burbujeado con una mezcla de 95% de CO<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub>. Las preparaciones fueron sometidas a estímulos eléctricos (pulsos de 50 V, 1.5 m.s. a 16 Hz durante 10 seg.), por medio de electrodos de nicrom colocados paralelamente, a ambos lados de las preparaciones en presencia de 2.0 µg/ml de atropina y 10.0 µg/ml de propranolol. La administración del antagonista adrenérgico β, produjo un bloqueo parcial de la relajación traqueal lo que indica que el resto de esta respuesta está mediada por el sistema de relajación no adrenérgico. Para determinar si en la relajación de este sistema estaban involucradas las prostaglandinas, se utilizaron inhibidores de su síntesis: la indometacina y el ácido acetilsalicílico. El contacto previo de las preparaciones con estos fármacos produjo una disminución en la tensión inicial, en vista de lo cual se utilizó el tensómetro o histamina para ajustar la línea basal a su tensión original. Con ambos inhibidores se consiguió un bloqueo estadísticamente significativo de la relajación no adrenérgica. La administración de teofilina al baño de órganos aislados a diferentes concentraciones produjo una relajación traqueal dependiente de la concentración, aunque después de la incubación del tejido con indometacina (3.1 µg/ml) durante 30 minutos y ajustando la línea basal con el tensómetro las respuestas a la xantina disminuyeron. Sin embargo, tal respuesta de relajación no se modificó por la presencia de indometacina al ajustar previamente la línea basal con histamina. La adición de PGE<sub>2</sub> (0.01, 0.1 y 1.0 µg/ml) a las cadenas traqueales, produjo un efecto de relajación, no obstante, después de la incubación del tejido con indometacina o aspirina, se observó un efecto contractil de las cadenas traqueales, inducido por la PGE<sub>2</sub>. Estos resultados sugieren la posible participación de alguna prostaglandina en las respuestas producidas por el sistema de relajación no adrenérgico, así como la posible involucración de los leucotrienos en el efecto de contracción de la PGE<sub>2</sub>.

## CONTENIDO

	Pag
APROBACION DE LA TESIS -----	ii
RESUMEN -----	iii
AGRADECIMIENTOS -----	iv
LISTA DE TABLAS -----	vii
LISTA DE FIGURAS -----	viii
LISTA DE ABREVIATURAS -----	ix
INTRODUCCION -----	1
ANTECEDENTES -----	3
Receptores postsinápticos del sistema nervioso simpático -----	3
Sistema purinérgico -----	4
Prostaglandinas -----	12
Hipótesis -----	13
MATERIAL Y METODOS -----	15
Preparaciones -----	15
Registro isométrico -----	17
Estimulación de campo -----	18
Análisis estadístico -----	21
RESULTADOS -----	22
Experimentos para probar el sistema de registro isométrico -----	22
Influencia de la atropina en la respuesta de contracción -----	23
Influencia del propranolol en la relajación -----	24
Respuestas a la atropina y propranolol -----	25
Relajación: modificaciones de la estimulación de campo -----	26
Inhibidores de la síntesis de prostaglandinas -----	27
Acción de los inhibidores de la síntesis de prostaglandinas -----	27
Ajuste de la línea basal -----	30
Ajuste de la línea basal con histamina -----	30
Inhibidores de la fosfodiesterasa: teofilina -----	32
Acción de la prostaglandina E <sub>2</sub> -----	33
DISCUSION -----	37
REFERENCIAS -----	46

Lista de Tablas

Tabla I	Fármacos utilizados y las concentraciones finales en la cámara de órganos aislados.	Pag. ----- 19
---------	---	---------------

## Lista de figuras

Figura	Titulo	Pag
1 :	Diagrama de la preparación de cadenas traqueales. -----	16
2 :	Esquema del dispositivo experimental para la estimulación de campo. -----	19
3 :	Efecto de la estimulación eléctrica sobre las propiedades mecánicas del músculo liso traqueal del cobayo. -----	22
4 :	Efecto de la atropina y el propranolol sobre las respuestas de las cadenas de tráquea torácica o cervical del cobayo. -----	23
5 :	Efecto de la atropina y el propranolol sobre las respuestas de las cadenas de tráquea torácica y cervical del cobayo, -----	24
6 :	Efecto del propranolol sobre la relajación traqueal. -----	25
7 :	Efecto de la atropina, propranolol, indometacina y aspirina sobre las respuestas de las cadenas traqueales. -----	26
8 :	Efecto de la indometacina y la aspirina sobre la relajación traqueal no adrenérgica. -----	28
9 :	Efecto de la indometacina y aspirina sobre la relajación traqueal no adrenérgica, -----	29
10 :	Efecto de la indometacina sobre la relajación no adrenérgica inducida por estimulación eléctrica. -----	31
11 :	Efecto de la teofilina sobre las cadenas traqueales del cobayo, -----	33
12 :	Efecto de la PGE <sub>2</sub> sobre las cadenas traqueales del cobayo, -----	34
13 :	Efecto de la aspirina y la indometacina sobre la relajación traqueal inducida por la administración de PGE <sub>2</sub> y teofilina. ----	35

## Lista de Abreviaturas

O <sub>2</sub>	-----	Oxigeno
CO <sub>2</sub>	-----	Bioxido de Carbono
µg	-----	Microgramo
g	-----	Gramo
ml	-----	Mililitro
l	-----	Litro
mm	-----	Milímetro
cm	-----	Centímetro
m.s.	-----	Milisegundo
mseg	-----	Milisegundo
seg	-----	Segundo
min	-----	Minuto
Hz	-----	Frecuencia
V	-----	Volts
SSF	-----	Solución Salina Fisiológica
M	-----	Solución Molar
PG	-----	Prostaglandina

## INTRODUCCION

Hasta hace algun tiempo se suponía que la estimulación de los - nervios simpáticos que inervan la musculatura lisa traqueobronquial, liberaban noradrenalina, neurotransmisor responsable de relajar este tejido (1,2,3) y que la estimulación del vago producía una respuesta de contracción a través de su mediador químico la acetilcolina (3,4).

Bajo estos conceptos resultaba difícil explicar los eventos fisiológicos que ocurrían después de la estimulación eléctrica -- del músculo liso traqueal, en presencia de atropina (parasimpá ticolítico) y propranolol (simpaticolítico), ya que seguía obser vandose una respuesta de relajación del tejido que supuestamen te no debería ocurrir. (5).

Sin embargo Burnstock (6) en 1972, demostró en diferentes tejidos de mamíferos (tracto gastrointestinal, vejiga, útero, vesículas seminales, esófago, pulmón, sistema cardiovascular y sistema ner vioso central) un tercer mediador autonómico no adrenérgico y no colinérgico, al que se le ha dado el nombre de sistema purinérgi co. Este sistema no adrenérgico constituye parte del sistema de relajación del peristaltismo en el tracto gastrointestinal y en

y en algunos otros tejidos como el músculo liso traqueobronquial.

Por otro lado, diversos investigadores han postulado que las fibras nerviosas de este sistema de relajación no adrenérgico tienen su origen en las fibras postganglionares del parasimpático (7,8).

Existe en la literatura una gran controversia con respecto a cual es el mediador químico del sistema de relajación no adrenérgico responsable de relajar el músculo liso traqueal.

En el pasado se han postulado diferentes sustancias en calidad de mediadores del efecto mencionado anteriormente, tales como el ATP (6) y más recientemente un polipéptido denominado VIP (9). El efecto de esta sustancia en otros tejidos se bloquea por la indometacina (10,11), lo cual sugiere que el efecto relajante de este polipéptido sobre la musculatura lisa traqueal pudiera estar mediado a través de las prostaglandinas.

Para poder comprender con mayor detalle este problema se mencionan los siguientes antecedentes.

## ANTECEDENTES

### Receptores postsinápticos del sistema nervioso simpático.

Dentro del sistema nervioso simpático existen dos grandes grupos de receptores postsinápticos, en ocasiones antagonísticos que reciben las señales de este sistema y que fueron -- clasificados por Alquist en 1948, en receptores adrenérgicos  $\alpha$  y  $\beta$  (12). Adicionalmente, Lands y Col. demostraron -- experimentalmente que existían dos subtipos de receptores -- adrenérgicos postsinápticos, los  $\beta_1$  y los  $\beta_2$  (13). Los -- primeros se encontraban principalmente en el corazón y los intestinos, mientras que los receptores adrenérgicos  $\beta_2$  en diversos músculos lisos como el intestinal, el uterino, el traqueobronquial etc; en este último tejido los receptores  $\beta_2$  son responsables de la relajación bronquial (14,15,16,17,18,19). Aunque los receptores adrenérgicos  $\alpha$  se han considerado cuantitativamente poco importantes, existe alguna controversia a este respecto en la literatura, ya que bajo ciertas condiciones patológicas podrían ser los responsables de la contracción bronquial (20,21,22,23,24). Con respecto al sistema parasimpático, es bien conocido que produce una respuesta de contracción en el músculo liso traqueobron -- quial, por medio de la estimulación de los receptores muscarínicos a través de la acetilcolina, su mediador químico --

(3,4,23).

Sistema purinérgico.

Una serie sistemática de trabajos de investigación llevados a cabo en esta última década han revelado en numerosos tejidos de mamíferos ( pulmón, vejiga, útero, ojos, tracto gastrointestinal, vesículas seminales, esófago, parte del sistema cardiovascular y sistema nervioso central) un tercer mediador autonómico no adrenérgico y no colinérgico, al que se le ha dado el nombre de sistema purinérgico, por la presunción de que el ATP podría ser su mediador químico (6, 25). Este sistema no adrenérgico constituye el sistema inhibitorio dominante en la fase de relajación del peristaltismo en el tracto gastrointestinal, aunque en algunas ocasiones o estructuras puede producir efectos de contracción (7, 25,26,27,28,29).

Morfológicamente existen diferencias entre este sistema y los otros dos componentes autonómicos. Las terminales nerviosas de las fibras purinérgicas presentan principalmente vesículas sinápticas opacas a diferencia de las vesículas granulares encontradas en el simpático y el parasimpático (7). Estas vesículas opacas se han encontrado en el músculo

liso del tracto gastrointestinal y en el músculo liso traqueal del humano, pero no se han demostrado en la musculatura lisa traqueobronquial del cobayo.

La estimulación de los nervios purinérgicos del músculo liso intestinal con pulsos de corta duración ( $< 0.3$  mseg) producen una hiperpolarización por más de 25 mV en las células musculares lisas, estos potenciales no son afectados por la atropina, por agentes bloqueadores adrenérgicos ni por la denervación simpática, aunque son abolidos por la tetrodotoxina lo que sugiere que el simpático y el parasimpático no están involucrados en estas respuestas, aunque si parecen estarlo algunas fibras nerviosas paralelas a las colinérgicas (7).

La existencia del sistema purinérgico en el músculo liso del tracto gastrointestinal, ha sido revisada ampliamente por Burnstock (17), quién describe que la formación y almacenamiento de ATP en las vesículas sinápticas opacas se ha demostrado en preparaciones de estómago e intestino (30). Cuando estos órganos son incubados con adenosina tritiada, ésta es captada y convertida en [ $^3\text{H}$ ]-ATP (28). El empleo de la autoradiografía demostró que la mayoría del ATP radioactivo se encontraba almacena

do en los nervios de estos órganos (14). Para corroborar este hallazgo decidieron estimular eléctricamente a estas fibras nerviosas dando como resultado la liberación de la marca radioactiva lo que sugería que había liberación del ATP almacenado. Para evitar la interferencia de los nervios adrenérgicos, este estudio se llevo a cabo en presencia de guanetidina. Bajo estas condiciones se descartó la posibilidad de que las fibras adrenérgicas liberaran ATP (22,23).

Otras pruebas experimentales que se han realizado en la musculatura lisa intestinal, para demostrar que el mediador químico liberado por los nervios purinérgicos es el ATP, es el hecho de que la aplicación exógena de esta substancia reproduce los efectos de la estimulación eléctrica de nervios purinérgicos en este órgano, ya que ambos ocasionan la relajación del tejido (17). -- Más aun, el hallazgo de que ambas maniobras producen un aumento en la conductancia para el K y una hiperpolarización de las células musculares lisas puede considerarse como un dato que provee apoyo adicional a dicha hipótesis. La activación de las enzimas endógenas, como la ATPasa, la 5-nucleotidasa y la adenosina deaminasa, del tejido intestinal a través de la administración de Mg en un sistema de órganos aislados, resulta en una inactivación del ATP, y en estas condiciones este nucleótido no produce ninguna respuesta (17).

En 1978 Burnstock (24) propuso las bases para distinguir dos tipos de receptores purinérgicos los  $P_1$  y los  $P_2$ , llegando a la conclusión de que los receptores  $P_1$  son más sensibles a la adenosina y son bloqueados competitivamente por las metilxantinas y su activación produce un aumento en la acumulación de AMPc, mientras que los receptores  $P_2$  son más sensibles al ATP y son bloqueados (aunque no competitivamente) por concentraciones altas de quinidina, imidazolininas y quizás por concentraciones bajas de apamina, un péptido neurotóxico aislado del veneno de la abeja, el cual inhibe en la célula el aumento en la permeabilidad del potasio inducido por el ATP (25). Se ha sugerido que en el músculo liso traqueobronquial se encuentran principalmente los receptores del tipo  $P_1$  (24).

Por otro lado, se he postulado que los receptores  $P_1$  son presinápticos y que su estimulación produce una disminución en la liberación de los neurotransmisores como la acetilcolina o noradrenalina (tal efecto es dependiente de Ca). Mientras que los receptores  $P_2$  son postsinápticos y regulan la salida de K lo cual causa una hiperpolarización de la membrana postsináptica que resulta en una relajación del músculo liso (26).

Sin embargo la utilización del doble electrodo de sacarosa, para registrar simultáneamente el potencial de membrana y la tensión desarrollada en el tejido, permitió demostrar que la activación

del sistema de relajación no adrenérgico en el músculo liso traqueal del gato (por medio de la estimulación eléctrica en presencia de  $10^{-6}M$  de sulfato de atropina y  $5 \times 10^{-6}M$  de propranolol), induce la relajación del músculo liso sin afectar las propiedades eléctricas de la membrana celular en preparaciones precontractadas con  $1 \times 10^{-6}M$  de serotonina (27).

Diversos investigadores han demostrado la presencia de este sistema en tráqueas y bronquios aislados de cobayos, mono y de humano, utilizando la estimulación eléctrica de las cadenas traqueales en presencia de atropina y propranolol (28,29,30,31,32,33). Chesrow y Col. (34) y Diamond y Col. (35) en 1979 detectaron dicho sistema de relajación no adrenérgico in vivo en el cobayo y gato respectivamente, estimulando eléctricamente los troncos simpáticos y vagal. Aunque fué necesario emplear 6-hidroxidopamina además del propranolol o guanetidina para poder demostrar la presencia de tal sistema en ausencia del funcionamiento del sistema nervioso simpático. Dicho trabajo concluye que el tono del músculo liso traqueal del cobayo puede ser disminuido por dos mecanismos neuronales diferentes: a) por estimulación eléctrica del sistema simpático y b) por estimulación vagal en presencia de atropina. Esta última respuesta de relajación no es atenuada por el propranolol o por el tratamiento previo con la 6-hidroxidopamina (34). Adicionalmente se ha bloqueado completamente esta relajación con el hexametonio (36), lo cual nos

indica que las fibras del sistema de relajación no adrenérgico del músculo liso traqueobronquial tienen su origen en las fibras vagales.

Ciertos autores han logrado reproducir, bajo diferentes condiciones experimentales, el efecto del sistema de relajación no adrenérgico en el músculo liso traqueobronquial del cobayo y -- mono al aplicar ATP u otras purinas como la adenosina, adenina, inosina o guanosina a las preparaciones de traqueas aisladas -- (30,37). Sin embargo, existe en la literatura cierta controversia con respecto a cuales son las concentraciones óptimas de -- ATP para producir la relajación del tejido, ya que la administración de 1 a 30  $\mu\text{g/ml}$  de ATP a las cámaras de organos aislados -- no produce ninguna respuesta de relajación de la musculatura lisa traqueal del cobayo. No obstante, cuando el tejido es incubado con dipiridamol (un inhibidor de la captación de purinas) -- (38), se obtienen efectos de relajación con la administración -- de ATP a las mismas concentraciones (33). Otros investigadores, bajo las mismas condiciones experimentales, han reportado que -- el músculo liso traqueal de cobayo se relaja con la administración de ATP sin la incubación del tejido con dipiridamol, pero a concentraciones de 100 a 300  $\mu\text{g/ml}$  o de  $10^{-4}$  a  $10^{-3}$  M de ATP -- (37,39).

Farmer (39) en 1976 y Christie (40) en 1980 postularon la hipó-

tesis de que la molécula del ATP por si sola no produce la relajación de las tráqueas aisladas y que su metabolito, la adenosina es la responsable de relajar el músculo liso a través de sus receptores de membrana. Más aun, no se han encontrado receptores específicos para el ATP en este tejido (40). Adicionalmente se ha demostrado que la administración de diferentes concentraciones de ATP ( $10^{-5}$ -  $10^{-4}$ M) a las tráqueas aisladas de mono, no logró reproducir ningun efecto de relajación, sino que además se produjo una respuesta de contracción. Sin embargo, a concentraciones de  $1 \times 10^{-3}$ M si se obtuvo la relajación del tejido -- (29). La administración de ATP o ADP en aerosoles (1-50%) o por vía endovenosa (1-50 mg/kg) a gatos con broncoespasmo inducido con serotonina, en presencia de atropina y propranolol, no reproduce la broncodilatación producida por la estimulación eléctrica del parasimpático (41).

La relativa falta de potencia de estos nucleótidos en las tráqueas aisladas, comparada con la potencia conocida de ciertos neurotransmisores tales como la acetilcolina y noradrenalina, - dificultan la idea de que estas purinas sean los neurotransmisores del sistema de relajación no adrenérgico en el músculo liso traqueobronquial. Además, no existen las suficientes evidencias experimentales que demuestren que el ATP es el neurotransmisor de este sistema de relajación.

Recientemente se ha demostrado que existen cuerpos celulares - y fibras nerviosas terminales que contienen el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) en las vías aéreas del gato, el perro y el humano (42,43,44). Además, por métodos de radioinmunoensayo, Matsuzaki y Col. (45) reportaron que la estimulación eléctrica de campo de las cadenas traqueales del cobayo liberaban VIP produciendo la relajación del tejido y que la administración del antisuero contra este péptido, en las cámaras de órganos aislados, reduce la relajación traqueal,

Desde 1970 con los estudios de Piper y Col. (46) se postuló que el VIP producía la relajación del músculo liso del estómago de rata, del recto de aves, de la vesícula biliar del cobayo, del ileon terminal del gato y de las tráqueas de cobayos. Posteriormente, numerosos trabajos de investigación realizados hasta la fecha han reportado que este péptido vasoactivo intestinal produce la relajación del músculo liso traqueobronquial tanto in vitro como in vivo a concentraciones de 0.5 µg/ml y de 0.1 a 10 µg/kg respectivamente (47,48,49), lo cual nos indica que son concentraciones que probablemente si se podrían acumular durante condiciones fisiológicas, por lo que algunos investigadores han considerado a esta sustancia como el neurotransmisor del sistema de relajación no adrenérgico de la musculatura lisa traqueobronquial. Por otro lado también se ha postulado al VIP como mediador químico de este sistema en el músculo liso del cuello de

la vejiga del cerdo (50).

Sin embargo otros autores no estan de acuerdo con esta teoria, debido a que en sus experimentos realizados con cadenas traqueales de cobayo, encontraron que la relajación del tejido producido por la estimulación eléctrica, en presencia de atropina y propranolol, seguía presentandose cuando se les añadía a las preparaciones concentraciones efectivas máximas de VIP (51).

La adición de indometacina a las arteriolas cerebrales del gato e intestino de rata, inhiben el efecto vasodilatador en las arteriolas y el incremento en la secreción intestinal inducido por el VIP (52,53), por lo que es probable que las prostaglandinas modulan el efecto de este polipéptido.

#### Prostaglandinas.

Las prostaglandinas son un grupo de substancias liposolubles derivadas del metabolismo del ácido araquidónico las cuales pueden producir dos diferentes tipos de respuestas en el músculo liso. En primer lugar pueden contraer o relajar el tejido dependiendo de la prostaglandina utilizada (54) y en segundo lugar bloquean o mejoran indirectamente las respuestas a otros agonistas (55,56,57,58).

Por otro lado se ha propuesto que las prostaglandinas de las series E Y F $\alpha$  actúan como moduladores de la neurotransmisión adrenérgica o colinérgica a concentraciones por abajo de las necesarias para producir la contracción o relajación en los diferentes tejidos (bazo, arterias, venas, ileon, etc.) (59,60,61,62,63,64). Se ha sugerido que en el músculo liso vascular la PGF $_{2\alpha}$  mejora la transmisión adrenérgica facilitando la liberación del neurotransmisor de las terminaciones nerviosas simpáticas, mientras que la PGE bloquea la liberación inhibiendo la transmisión del impulso nervioso (54,57,58,64). Adicionalmente, diferentes investigadores demostraron que las prostaglandinas producían el efecto opuesto en la neurotransmisión colinérgica, donde la PGE incrementa la liberación de acetilcolina de los botones sinápticos (61,65).

#### Hipótesis.

Se propone que: la relajación no adrenérgica observada en el músculo liso traqueal después de la estimulación eléctrica (en presencia de atropina y propranolol) podría estar modulada por las prostaglandinas.

#### Propósitos de este trabajo.

Existe en la literatura una gran controversia con respecto a cual es el mediador químico del sistema de relajación no adre

nérgico responsable de relajar el músculo liso traqueal.

En el pasado se han postulado diferentes sustancias en calidad de mediadores del efecto mencionado anteriormente, tales como el ATP (14) y más recientemente un polipéptido denominado VIP (45). El efecto de esta sustancia en otros tejidos ha sido bloqueado por la indometacina (52,53), lo cual sugiere que el efecto relajante de este polipéptido sobre la musculatura lisa traqueal, pudiera estar mediado a través de las prostaglandinas. Con el propósito de estudiar su participación se decidió:

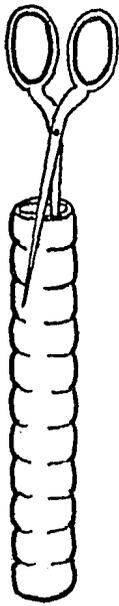
- 1.- Estudiar el sistema de relajación no adrenérgico en el músculo liso traqueal del cobayo (cadenas de segmentos traqueales en cámaras de órganos aislados provistas de electrodos de nicrom que permiten la estimulación de campo) a través de la estimulación eléctrica en presencia de antagonistas de los receptores colinérgicos (muscarínicos) y adrenérgicos  $\beta$ .
- 2.- Estudiar el efecto de dos inhibidores de la síntesis de prostaglandinas como la indometacina y el ácido acetilsalicílico en el sistema de relajación no adrenérgico.

## MATERIAL Y METODOS

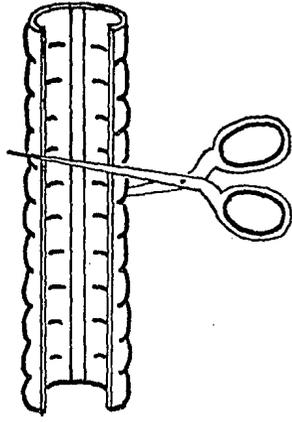
### Preparaciones.

Se usaron traqueas obtenidas de cobayos machos de 600 a 800 gr. de peso.

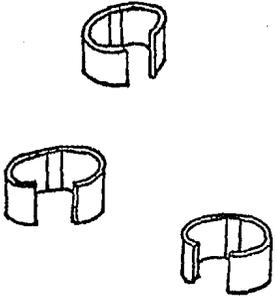
Los cobayos fueron sacrificados a través de un golpe rápido en la unión occipitoatloidea. Posteriormente se disecó la traquea, se cortó en forma longitudinal sobre el cartílago (A) y luego esta se seccionó transversalmente en forma de anillos (B), los cuales se convirtieron en segmentos con forma de C al cortarlos por la porción cartilaginosa (C) y se unieron en forma de cadena de 25 a 30 mm de longitud y de 4 a 5 mm de ancho (D) de acuerdo con la técnica descrita por Foster (66) (Fig.1). Se utilizó este tipo de preparación debido a que la técnica desarrollada -- por Castillo y De Beer en 1947 (67) presenta las siguientes desventajas con respecto a la de Foster: 1) El tamaño de la relajación máxima posible es más pequeña, 2) existe una mayor variación en la sensibilidad individual de los animales, 3) las respuestas a los fármacos son más lentas así como su recuperación, 4) no se puede medir el efecto de la relajación espontánea del tono muscular y 5) la apertura de los anillos traqueales cortando a través del cartilago, como lo describe Foster, incrementa la magnitud de las respuestas producidas por los fármacos hasta por un factor



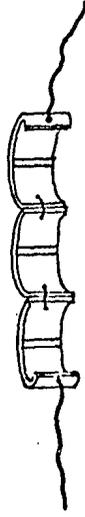
A



B



C



D

Fig. 1 : Diagrama de la preparación de cadenas traqueales. Para mayores detalles ver el texto.

de 3 veces y los hace más confiables y reproducibles.

Cada cadena traqueal fue colocada en una cámara de organos aislados de 10 ml, con solución de Krebs bicarbonatada, a una temperatura constante de 37°C, controlada por medio de un baño metabólico marca Dubnoff. El contenido de la solución de Krebs bicarbonatada fue el siguiente: (g/l); NaCl; 7.03; KCl, 0.356; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.16; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.29; NaHCO<sub>3</sub>, 2.1; CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.28; glucosa, 2.0 (33). El reservorio del líquido y las cámaras fueron burbujeadas con una mezcla de O<sub>2</sub> 95% y CO<sub>2</sub> 5%.

Las cadenas traqueales de los cobayos fueron divididas en torácicas y cervicales debido a que ciertos investigadores han reportado que existen diferencias en la distribución de los nervios adrenérgicos y no adrenérgicos en ambos segmentos traqueales. Las traqueas cervicales se obtuvieron de 1-2 cm por abajo de la laringe y las torácicas de 0,5-2,5 por arriba de la carina. (32).

#### Registro isométrico.

Las cadenas se conectaron a un transductor Gould Statham UC3 - para registrar la tensión isométrica, el cual estuvo conectado a un dinógrafo Beckman R-612. El transductor se montó en un soporte móvil (tensómetro o manipulador) que permitió un ajuste

fino de la longitud de la cadena traqueal. La velocidad del registro fué de 0.01 cm/seg.

Dentro de la cámara estuvieron colocados dos electrodos extramurales de nicrom, paralelos a la preparación, lo cual permitió realizar una estimulación de campo sobre las terminaciones nerviosas, las cuales a su vez liberan el médador químico hacia el espacio sináptico.

#### Estimulación de campo.

El tejido empleado es poco sensible a la estimulación eléctrica por lo que fué necesario emplear intensidades relativamente elevadas. Algunos autores reportan el uso de dispositivos amplificadores de corriente (68). Al utilizar corrientes elevadas sobreviene otro problema; normalmente se utilizan pulsos de corriente directa que liberan gases en la superficie de los electrodos y producen fenómenos electrolíticos indeseables. Para evitar estos fenómenos electrolíticos de polarización se recurrió a invertir la polaridad de los electrodos con cada pulso; para ésto se utilizó un conmutador electromecánico (relay) de dos polos y dos posiciones el cual era guiado por un estimulador Beckman 611. (Fig.2).

Las dos cámaras se conectaron en serie, de tal manera que pasa

ba la misma cantidad de corriente a través de ambas.

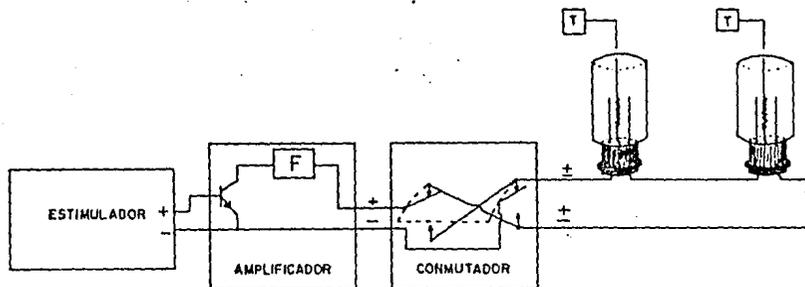


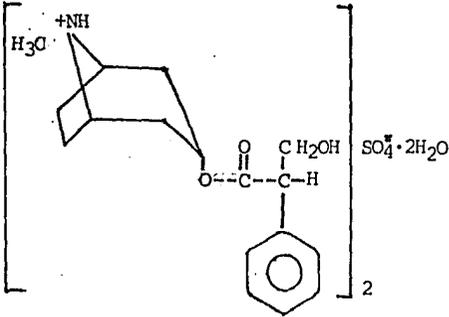
Fig. 2: Esquema del dispositivo experimental para la estimulación de campo. Fuente de poder (F).

En la siguiente tabla se muestran los fármacos utilizados y las concentraciones finales en las cámaras de órganos aislados.

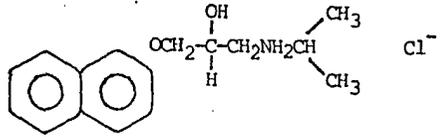
Tabla I

FARMACO	SOLVENTE	CONCENTRACION (ug/ml)
Sulfato de Atropina (Sigma)	SSF	2.0
Clorhidrato de Propranolol (Sigma)	SSF	3.1 y 10.0
Indometacina (Sigma)	Amortiguador de Tris 0.01M	0.1, 1.0 y 10.0
Acido Acetilsalicílico (Sigma)	Sol. de Krebs	1.0, 10.0 y 100.0
Clorhidrato de Histamina (Sigma)	SSF	1.0-2.0
Teofilina (Sigma)	SSF	3.1, 10.0 y 31.0
PGE <sub>2</sub> (Sigma)	Sol. de Alcohol al 10%	0.01, 0.1 y 1.0

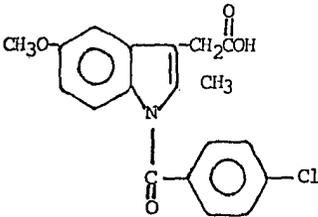
A continuación aparecen las estructuras químicas de todos los fármacos mencionados anteriormente.



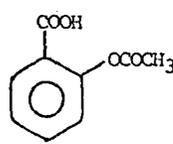
Sulfato de Atropina



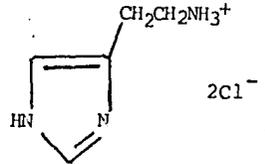
Clorhidrato de Propranolol



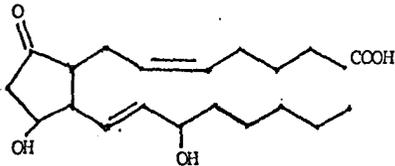
Indometacina



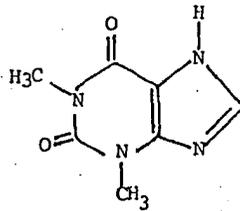
Aspirina



Diclorhidrato de Histamina



PGE<sub>2</sub>



Teofilina

El tejido se sometió a una tensión inicial de 1 g y se dejó en reposo durante 90 minutos antes de iniciar los experimentos.

Analisis estadístico.

Los datos obtenidos en este trabajo fueron analizados con la prueba T de Student para dos muestras correlacionadas. El límite para considerar la significancia estadística fue de  $P < 0.05$ . Los valores reportados en el texto fueron media  $\pm$  error estándar de la media,  $N=6$  para todos los experimentos.

## RESULTADOS

### Experimentos para probar el sistema de registro isométrico.

La estimulación eléctrica de las cadenas torácicas y cervicales se realizó con trenes de 10 segundos a diferentes voltajes (10-80 V), manteniendo constante la duración y la frecuencia de los estímulos (2.0 m.s. y 16 Hz respectivamente) (Fig. 3e,f,4),

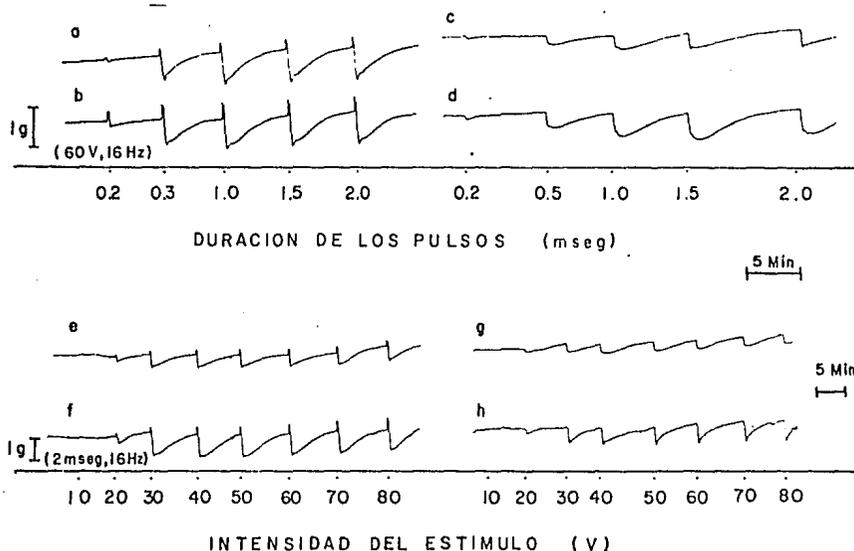


Fig. 3: Efecto de la estimulación eléctrica sobre las propiedades mecánicas del músculo liso traqueal del cobayo. En a y b se puede observar las respuestas de las cadenas de tráquea torácica y cervical inducidas por estimulación eléctrica, variando la duración de los estímulos, manteniendo constante la intensidad y frecuencia de los mismos durante 10 segundos, c y d en presencia de atropina (2.0 µg/ml) y propranolol (3.0 µg/ml) respectivamente. e y f Representan las respuestas de las cadenas de tráquea torácica y cervical a la estimulación eléctrica empleando diferentes voltajes (pulsos de 2 msec a 16 Hz durante 10 segundos), g y h en presencia de atropina (2.0 µg/ml) y propranolol (3.0 µg/ml) respectivamente.

o bien variando la duración de los pulsos (0,2-2,0 m.s.) y manteniendo constante la intensidad y la frecuencia de los mismos (60 V, 16 Hz) (Fig.3a,b.5). La estimulación del tejido con los parámetros antes mencionados produjo una respuesta bifásica de las preparaciones, primero se observó la contracción y después la relajación del músculo liso traqueal. Estas respuestas se obtienen con mayor intensidad con estímulos entre 50-80 V y con una duración de los pulsos entre 1-2 m.s. (Fig. 4,5).

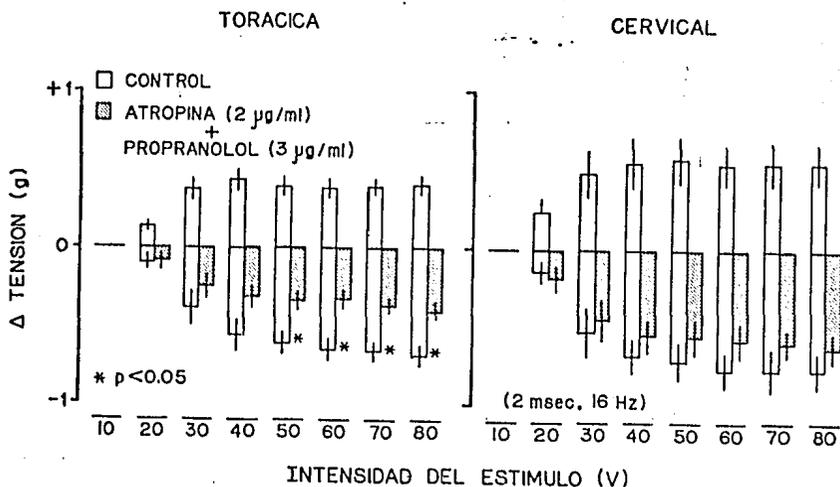


Fig. 4: Efecto de la atropina y el propranolol sobre las respuestas de las cadenas de tráquea torácica o cervical del cobayo a la estimulación eléctrica, empleando diferentes voltajes de estimulación (pulsos de 2 msec a 16 Hz durante 10 segundos). Todas las respuestas controles fueron bifásicas, primero se observó la contracción y después la relajación.

#### Influencia de la atropina en la respuesta de contracción.

Para demostrar la posibilidad de que la respuesta de contracción de las cadenas traqueales a la estimulación eléctrica, se debía al sistema colinérgico y no al sistema de contracción no colinérgico

(73) se añadió a las cámaras de órganos aislados 2.0 µg/ml de sulfato de atropina la cual produjo un bloqueo total de esta respuesta (Fig. 4, 7b, f).

### Influencia del propranolol en la relajación.

La administración de un antagonista adrenergico  $\beta$  como el propranolol (3.0 µg/ml) a las cadenas traqueales, produjo un bloqueo parcial de la relajación a la estimulación eléctrica. Las traqueas torácicas fueron estadísticamente ( $p < 0.05$ ) más sensibles que las cervicales al efecto bloqueador (Fig. 3c, d, g, h, 4).

Para explorar la posibilidad de que esta diferencia entre las cadenas cervicales y torácicas se debía a una mayor sensibilidad por parte de la segunda al propranolol, se aumentó la concentración de este a 10.0 µg/ml.

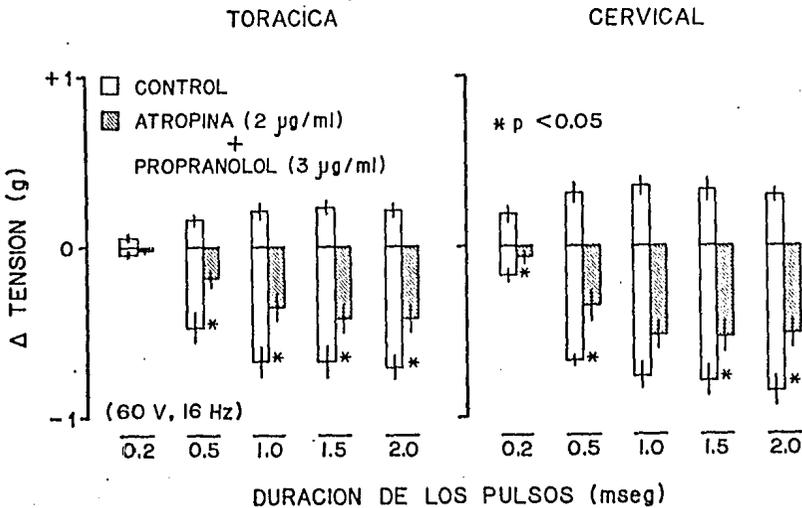


Fig. 5: Efecto de la atropina y el propranolol sobre las respuestas de las cadenas de tráquea torácica y cervical del cobayo inducidas por estimulación eléctrica, variando la duración de los estímulos y manteniendo constante la intensidad y frecuencia de los mismos.

Respuestas a la atropina y propranolol.

En los experimentos de las cadenas torácicas donde se utilizaron diferentes concentraciones de propranolol (3.0 y 10.0  $\mu\text{g/ml}$

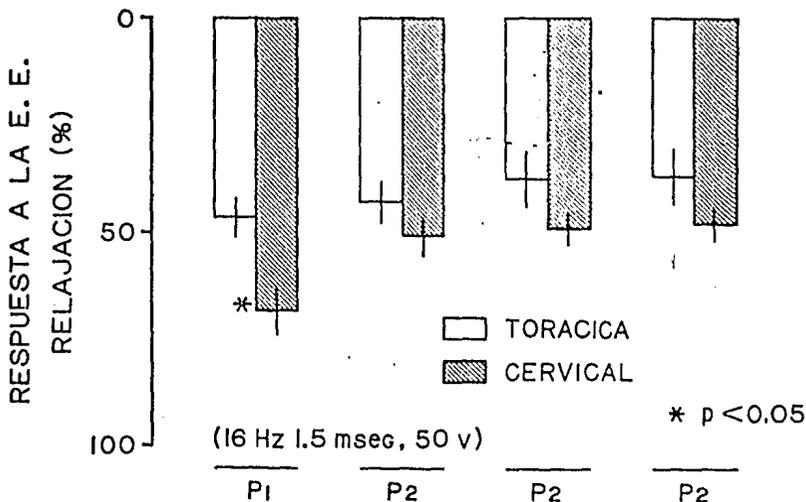


Fig. 6 : Efecto del propranolol sobre la relajación traqueal provocada por la estimulación eléctrica en presencia de 2.0  $\mu\text{g/ml}$  de atropina; - P<sub>1</sub> corresponde a 3.0  $\mu\text{g/ml}$  de propranolol y P<sub>2</sub> corresponde a 10.0  $\mu\text{g/ml}$ . Las preparaciones se incubaron con propranolol durante 30 minutos antes de obtener la respuesta inducida por la estimulación eléctrica.

en presencia de 2.0  $\mu\text{g/ml}$  de sulfato de atropina) para bloquear parcialmente la respuesta de relajación traqueal a la estimulación eléctrica, la adición del antagonista  $\beta$  en ambas concentraciones no produjo ninguna diferencia estadísticamente significativa en el bloqueo de la relajación. Sin embargo en las trá

queas cervicales si se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre el antagonismo inducido por la concentración de 3,0 y la de 10,0  $\mu\text{g/ml}$  de propranolol (Fig. 6).

Relajación: modificaciones de la estimulación de campo.

Basándonos en los resultados anteriores, se decidió utilizar co

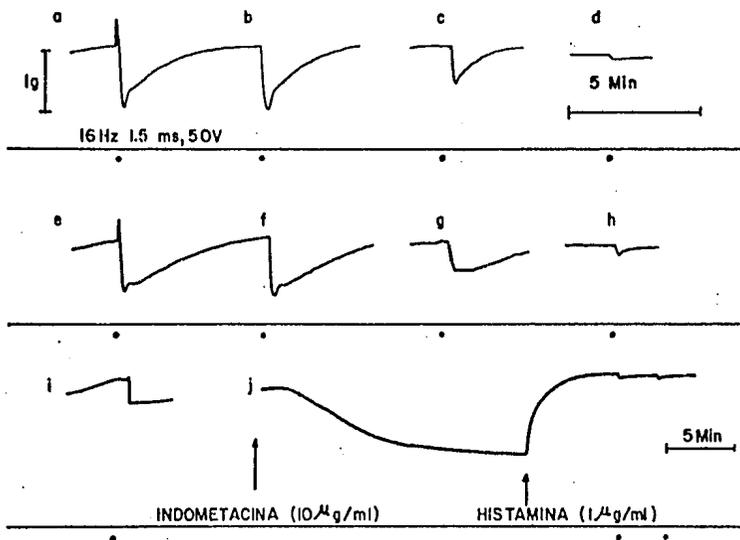


Fig. 7: Efecto de la atropina, propranolol, indometacina y aspirina sobre las respuestas de las cadenas traqueales a la estimulación eléctrica. a y e representan el control, b y f representan las respuestas de las cadenas traqueales a la estimulación eléctrica en presencia de atropina (2.0  $\mu\text{g/ml}$ ), c, g, i en presencia de propranolol (10.0  $\mu\text{g/ml}$ ) y d y h en preparaciones incubadas con indometacina (10.0  $\mu\text{g/ml}$ ) y ácido acetilsalicílico (100.0  $\mu\text{g/ml}$ ). El contacto previo de las preparaciones con la indometacina y el ácido acetilsalicílico produjo una disminución en la tensión inicial, en vista de lo cual se utilizó el tensómetro para ajustar la línea basal a su tensión original. En j la adición de indometacina produjo una disminución de la tensión inicial por lo que se administró histamina (1.0  $\mu\text{g/ml}$ ) para ajustar la línea basal. Los puntos indican la aplicación de los estímulos eléctricos.

mo parámetros óptimos de estimulación eléctrica, para los siguientes experimentos, pulsos de 50 V, 1.5 m.s., 16 Hz con trenes de 10 segundos, en presencia de sulfato de atropina (2.0  $\mu$ g/ml) y propranolol (10.0  $\mu$ g/ml). En virtud de que bajo estas condiciones las respuestas de las cadenas traqueales torácicas y cervicales son semejantes, en las siguientes preparaciones ya no se estudiaron por separado sino que se combinaron, es decir cada cadena estaba constituida por segmentos de ambas regiones.(Fig. 7a,b,e,f).

#### Inhibidores de la síntesis de prostaglandinas.

Para analizar si la respuesta de relajación traqueal que no es bloqueada por el propranolol (relajación traqueal no adrenérgica) a la estimulación eléctrica, estaba mediada por prostaglandinas, se utilizaron concentraciones crecientes de inhibidores de su síntesis, la indometacina y el ácido acetilsalicílico.

#### Acción de los inhibidores de la síntesis de prostaglandinas.

El contacto previo de las preparaciones con la indometacina y la aspirina durante 30 minutos, produjo una disminución en la tensión inicial, en vista de lo cual se utilizó el tensómetro para ajustar la línea basal a su tensión original.

En el caso de la indometacina (10.0  $\mu$ g/ml) ésta, produjo un --

bloqueo casi total de la relajación traqueal no adrenérgica -- estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ), el cual fué dependiente de la concentración (Fig.7d,8). En relación al amortiguador

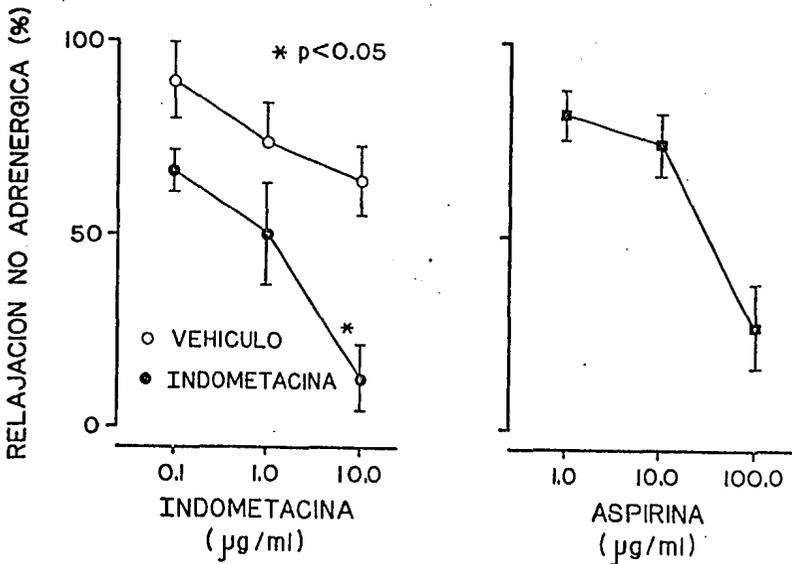


Fig. 8 : Efecto de la indometacina y la aspirina sobre la relajación traqueal no adrenérgica. La relajación fué inducida por estimulación eléctrica en presencia de 2.0 µg/ml de atropina y 10.0 µg/ml de propranolol. La indometacina se disolvió en amortiguador de tris 0.01 M y la aspirina en solución de Krebs. El contacto previo de las preparaciones con la indometacina y la aspirina produjo una disminución en la tensión inicial, en vista de lo cual se utilizó el tensómetro para ajustar la línea basal a su tensión original.

de tris (vehículo) que fué el solvente para la indometacina, - este por sí solo ocasionó una disminución en la respuesta de - la relajación no adrenérgica a la estimulación eléctrica. En - el caso del ácido acetilsalicílico, las concentraciones requere-

ridas para producir un bloqueo similar al observado con la indometacina, fueron 10 veces más altas. (Fig. 7h, 8).

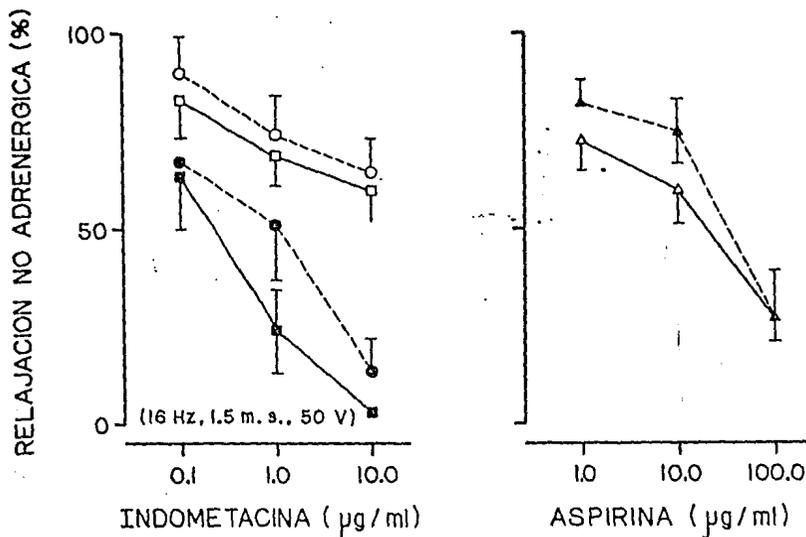


Fig. 9 : Efecto de la indometacina y aspirina sobre la relajación traqueal no adrenérgica inducida por estimulación eléctrica en presencia de atropina (2.0 µg/ml) y de propranolol (10.0 µg/ml). El contacto previo de las preparaciones con la indometacina y la aspirina, produjo una disminución en la tensión inicial en vista de lo cual se comparó el efecto de los fármacos en preparaciones en las que se ajustó la línea basal a su tensión original con otras en las que no se llevo a cabo tal ajuste. La indometacina se disolvió en amortiguador de tris 0.01 M y la aspirina en solución de Krebs. En la gráfica izquierda, los símbolos vacíos representan a preparaciones incubadas con el solvente de la indometacina, con ajuste de la línea basal (○) o sin el dicho ajuste (□) y los símbolos oscuros las preparaciones que estuvieron en contacto con indometacina, ajustando la basal (●) o sin ajuste (■). En la gráfica derecha los símbolos oscuro y vacío representan a las preparaciones que estuvieron en contacto con aspirina con ajuste (▲) y sin ajuste de la basal (△).

La relajación no adrenérgica de las cadenas traqueales, obteni

da por la estimulación eléctrica en presencia de propranolol (10,0 µg/ml) fué de 366.67 mg (Fig.7c,g,i). No obstante la incubación del tejido con ácido acetilsalicílico (100,0 µg/ml) produjo una disminución de la relajación traqueal no adrenérgica que fué de 116.67 mg. Esta diferencia fué estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

#### Ajuste de la línea basal.

Con el objeto de corroborar si el ajuste de la línea basal a su tensión original de las tiras traqueales, con el tensómetro, pudiera afectar la respuesta del tejido a la estimulación eléctrica en presencia de indometacina o ácido acetilsalicílico, se llevaron a cabo experimentos en los cuales no se ajustó la línea basal.

Las preparaciones que no fueron sometidas a un ajuste de su línea basal (para llevarlas a su tensión original) en presencia de indometacina o ácido acetilsalicílico, mostraron un efecto similar al observado en el caso de las traqueas que si fueron sometidas a un ajuste de su línea basal. El mismo resultado se observó con el amortiguador de tris (Fig.9).

#### Ajuste de la línea basal con histamina.

Por otro lado la administración de 1 a 2 µg/ml de histamina a

las cámaras, para ajustar la línea basal a su tensión original, no cambio las respuestas de las cadenas traqueales a la estimulación eléctrica en presencia de indometacina, ya que se siguió

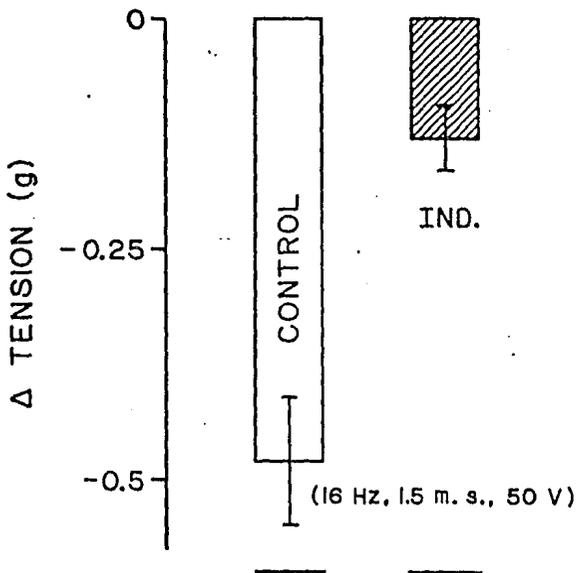


Fig. 10 : Efecto de la indometacina (IND) (10.0  $\mu\text{g/ml}$ ) sobre la relajación no adrenérgica inducida por estimulación eléctrica en presencia de atropina (2.0  $\mu\text{g/ml}$ ) y propranolol (10.0  $\mu\text{g/ml}$ ). El contacto previo de las preparaciones con indometacina produjo una disminución en la tensión inicial por lo que se administró histamina (1 a 2  $\mu\text{g/ml}$ ) para ajustar la línea basal a su tensión original.

observando un bloqueo casi total de la relajación no adrenérgica (Fig. 7j, 10).

Con la finalidad de estudiar en mayor detalle si el ajuste de

la línea basal, con el tensómetro, alteraba la respuesta de las cadenas traqueales a fármacos que produjeran relajación del músculo liso traqueal, se utilizó un agente que actuara a través de un mecanismo de acción diferente, como la teofilina, la cual es un inhibidor de la fosfodiesterasa, enzima encargada de inhibir al AMPc el cual se ha dicho que es un segundo mensajero en el caso de la relajación del músculo liso traqueal (44).

Inhibidores de la fosfodiesterasa: Teofilina.

La administración de teofilina al baño de órganos aislados a diferentes concentraciones (3.1, 10.0 y 31.0 µg/ml), produjo una relajación traqueal dependiente de la concentración. Después de la incubación del tejido con indometacina durante 30 minutos y ajustando la línea basal con el tensómetro, las respuestas a la xantina disminuyeron (Fig.11A). Sin embargo, esta respuesta de relajación por parte de la teofilina no se modificó por la presencia de indometacina, a concentraciones de 3.1 y 10.0 µg/ml, cuando la basal se ajustó con 1 a 2 µg/ml de histamina (Fig.11B,c).

En vista de que la indometacina y el ácido acetilsalicílico bloquearon, casi totalmente, la relajación no adrenérgica, se decidió estudiar el efecto de estos agentes sobre la relaja--

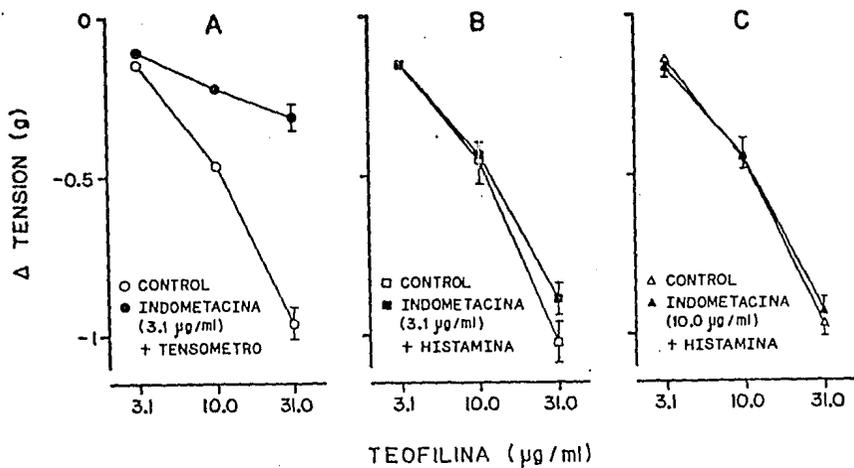


Fig. 11 : Efecto de la teofilina sobre las cadenas traqueales del cobayo antes y después de la administración de indometacina. En A se puede observar que la teofilina produjo una relajación traqueal, aunque después de la incubación del tejido con indometacina durante 30 minutos y ajustando la línea basal con el tensómetro, las respuestas a la xantina disminuyeron. En B y C la teofilina produjo un efecto de relajación traqueal que no se modificó por la presencia de indometacina al ajustar previamente la línea basal con histamina (1 a 2  $\mu\text{g/ml}$ ). Todas las cadenas traqueales fueron incubadas con 2.0  $\mu\text{g/ml}$  de atropina y 10.0  $\mu\text{g/ml}$  de propranolol.

ción traqueal inducida por la administración de  $\text{PGE}_2$ .

#### Acción de la prostaglandina $\text{E}_2$ .

La adición de  $\text{PGE}_2$  a las cadenas traqueales produjo un efecto de relajación a las tres concentraciones utilizadas (0.01, 0.1, y 1.0  $\mu\text{g/ml}$ ) (Fig.12a,13). No obstante, la incubación del tejido con indometacina (3.1  $\mu\text{g/ml}$ ) o aspirina (100.0  $\mu\text{g/ml}$ ) duran

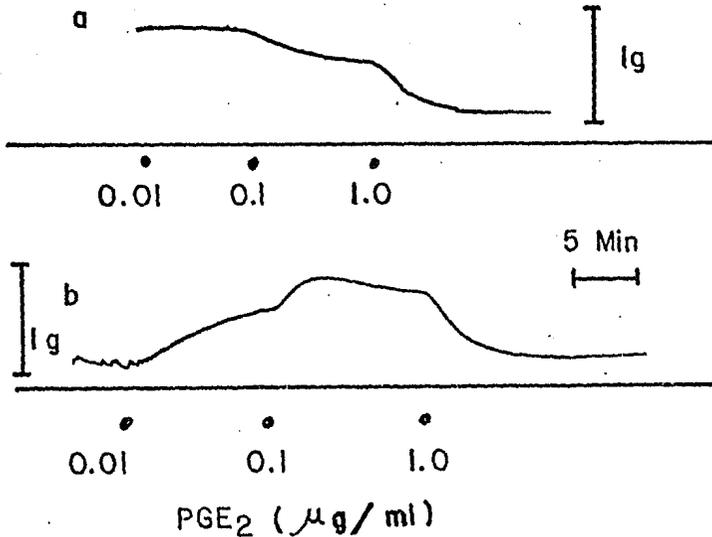


Fig. 12 : Efecto de la PGE<sub>2</sub> sobre las cadenas traqueales del cobayo antes y después de la administración de indometacina. En a., se puede observar que la PGE<sub>2</sub> produjo la relajación del músculo liso traqueal, mientras que en el segmento b, el tejido fué incubado con indometacina durante 30 minutos y se obtuvo el efecto contrario con concentraciones de 0.01 y 0.1 µg/ml de PGE<sub>2</sub>.

te 30 minutos, ocasionó que la respuesta de las cadenas traqueales a la PGE<sub>2</sub> fuera diferente. A concentraciones de 0.01 y 0.1 µg/ml se observó un efecto contractil de las traqueas, aunque la administración de 1.0 µg/ml fué seguida de una relajación de menor magnitud que la obtenida en la curva control (Fig. 12b, 13).

Para corroborar que la incubación del tejido con indometacina o ácido acetilsalicílico solo afectaba a las respuestas producidas por la PGE<sub>2</sub> y no a la de cualquier otro agente relajador del músculo liso traqueal, se utilizó a la teofilina.

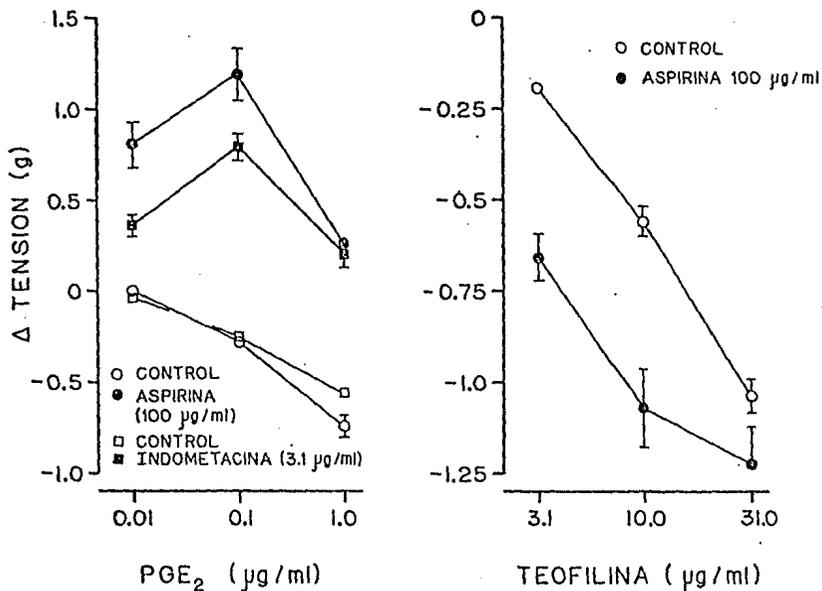


Fig. 13 : efecto de la aspirina y la indometacina sobre la relajación traqueal inducida por la administración de PGE<sub>2</sub> y teofilina. El contacto previo de las preparaciones con indometacina produjo una disminución en la tensión inicial en vista de lo cual se utilizó el tensiómetro para ajustar la línea basal a su tensión original. La PGE<sub>2</sub> produjo inicialmente un efecto de relajación traqueal, aunque después de la incubación del tejido con indometacina o aspirina durante 30 minutos, se obtuvo el efecto contrario con concentraciones de 0.01 y 0.1  $\mu\text{g/ml}$  de PGE<sub>2</sub>. En el caso de la teofilina siempre se produjo un efecto de relajación traqueal antes y después de la administración de la aspirina, más aun se puede observar que existe una potenciación en presencia del ácido acetilsalicílico. Todas las cadenas traqueales fueron incubadas con 2.0  $\mu\text{g/ml}$  de atropina y 10.0  $\mu\text{g/ml}$  de propranolol.

La administración de teofilina, siempre produjo un efecto de relajación traqueal a las tres concentraciones utilizadas -- (3.1, 10.0 y 31.0  $\mu\text{g/ml}$ ), antes y después de la incubación con aspirina durante 30 minutos, incluso, se observó que existe una potenciación de la relajación en presencia del ácido acetilsalicílico (Fig.13).

## DISCUSION

La estimulación eléctrica (de campo) de las cadenas traqueales produjo una relajación que se antagonizó solo parcialmente por el propranolol (un bloqueador adrenérgico beta que a las concentraciones empleadas antagoniza completamente las respuestas a agonistas adrenérgicos), lo cual señala la existencia de nervios no adrenérgicos que producen relajación corroborando la presencia del sistema de relajación no adrenérgico en las cadenas traqueales del cobayo. Los resultados obtenidos en este tejido, van de acuerdo con los experimentos realizados por muchos otros investigadores (5, 41, 74) y sugiere que este sistema puede constituir un mecanismo importante para la dilatación de las vías aereas.

Se ha demostrado que las vías aereas de los mamíferos no están inervadas exclusivamente por el sistema nervioso simpático y el parasimpático, sino que existe un tercer componente nervioso - autonómico que no es adrenérgico ni colinérgico y que es responsable de la relajación de por lo menos el músculo liso traqueobronquial, intestinal, del cuello de la vejiga y vena porta (5, 27, 28, 29, 43, 56) aunque en algunos organos puede producir efectos de contracción (75).

La respuesta de contracción de las cadenas traqueales a la es-

estimulación eléctrica fué bloqueada por la atropina, lo cual señala que este componente de la respuesta es colinérgico. Se halló que las traqueas torácicas son más sensibles al propranolol lo cual indica una mayor densidad de receptores  $\beta$ .

Por el momento no se ha definido con exactitud cual es el mediador químico de este sistema de relajación. Burnstock en 1970 (26) postuló que el ATP o algun nucleotido relacionado era el neurotransmisor de este sistema en el músculo liso intestinal. Varios investigadores han reproducido el efecto del sistema de relajación no adrenérgico en el músculo liso traqueal, añadiendo a las preparaciones in vitro, ATP o algunos de sus derivados (39,44,46,47). Cabe destacar que las concentraciones de ATP o adenosina utilizadas por estos autores para producir la relajación del tejido fueron de  $1 \times 10^{-3}$  M. Bajo estas condiciones parece improbable que tales concentraciones altas, requeridas para relajar la traquea, se pudieran acumular durante condiciones fisiológicas. Además Grundstrom (76) reportó que la respuesta de relajación no adrenérgica, no era afectada por agentes bloqueadores de los receptores  $P_1$  como la teofilina ni por bloqueadores de los receptores  $P_2$  como la quinidina, por lo que no está del todo claro la participación de estas purinas como mediadores químicos de este sistema de relajación no adrenérgico en el músculo liso traqueobronquial.

Más aun en 1980 se encontró en la vejiga urinaria del conejo, -- que la administración de 100  $\mu$ g/ml de ATP o ADP reproducen los

efectos de la estimulación eléctrica del sistema de relajación no adrenérgico y que la incubación del tejido con indometacina bloquea la respuesta de contracción producida por estos nucleótidos, sugiriendo que el efecto del ATP sobre la vejiga se lleva a cabo en forma indirecta por medio de la liberación de prostaglandinas (75). Cabe la posibilidad de que la relajación producida por la administración de estos nucleótidos en las traqueas aisladas se deba también a la liberación de prostaglandinas como lo sugiere Kamikawa (77).

Para explorar si en la relajación producida por este sistema estaban involucradas las prostaglandinas, se utilizaron concentraciones crecientes de inhibidores de su síntesis: la indometacina y el ácido acetilsalicílico (78,79). En ambos casos se consiguió un bloqueo estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) de la relajación no adrenérgica, lo que sugiere la posible participación de alguna prostaglandina en las respuestas producidas por tal sistema. Estos hallazgos experimentales difieren de los obtenidos por otros investigadores (41,80), los cuales encontraron que concentraciones de 1.0 y 10.0  $\mu\text{g/ml}$  de indometacina y 10 a 30  $\mu\text{g/ml}$  de ácido acetilsalicílico no bloqueaban los efectos del sistema de relajación no adrenérgico en las cadenas traqueales, sino que además se mejoraban las respuestas. Estas diferencias podrían deberse a que en los experimentos de Coleman (41) la duración de los estímulos fué de 0.3 mseg y la técnica utilizada para ob

tener los registros, fué midiendo la presión intraluminal del tubo traqueal. Cabe destacar que las concentraciones utilizadas de histamina (10.0  $\mu\text{g/ml}$ ) o de cloruro de bario (100.0  $\mu\text{g/ml}$ ) para ajustar la línea basal a su tensión original, fueron muy altas (41,80).

El contacto previo de las preparaciones con la indometacina o el ácido acetilsalicílico, los cuales son inhibidores de la síntesis de prostaglandinas, produjo una disminución en la tensión inicial de las traqueas, lo cual sugiere que las prostaglandi--nas  $E_2$  y  $F_{2\alpha}$  pudieran ser las responsables de mantener el tono basal del músculo liso traqueal (78,81,82,83). Para corroborar si el ajuste de la línea basal con el tensómetro no afectaba la inhibición de la relajación no adrenérgica, se compararon estos --resultados con un grupo de cadenas traqueales a las cuales no --se les ajusto la línea basal. Los datos obtenidos de estos experimentos nos sugieren que no existen diferencias entre ambos --grupos en el bloqueo de la relajación no adrenérgica. El ajuste de la línea basal con histamina tampoco cambio el bloqueo de la relajación no adrenérgica producido por la indometacina. Con la finalidad de estudiar en mayor detalle si el ajuste de la línea basal, con el tensómetro, alteraba la respuesta de las cadenas traqueales a fármacos que produjeran relajación del músculo li--so traqueal, se utilizó a la teofilina. En el caso de esta xanti--na hubo una inhibición casi total de la relajación producida por

esta substancia cuando la linea basal se ajusto con el tensómetro, no observandose este fenómeno cuando la linea basal se -- ajustaba con la histamina.

La ausencia de una respuesta por parte del tejido a la teofilina, cuando se utilizó el tensómetro, podría deberse a que las traqueas bajo estas condiciones se encuentran totalmente relajadas, independientemente de que regresaron a su linea basal - por un efecto mecánico. Sin embargo, cuando la linea basal se ajusto con la histamina las cadenas traqueales regresaron a su tensión inicial por un aumento en cuanto a su tono basal.

Con respecto al amortiguador de tris, este por si solo ocasionó una disminución en la respuesta de la relajación no adrenérgica a la estimulación eléctrica, pero en ningun momento fué comparable a la que se observó con la indometacina.

Estos hallazgos experimentales nos sugieren que para futuros - experimentos, donde la indometacina o la aspirina sean utilizados para inhibir la síntesis de prostaglandinas, se utilice de preferencia a la histamina para ajustar la linea basal.

En general, las prostaglandinas especialmente la  $PGE_2$ , son capaces de producir relajación o contracción del músculo liso traqueal dependiendo de la concentración y el tono de la preparación. El hecho de que la  $PGE$  produce la relajación de las tra-

queas aisladas fué reportad6 por Main (81) y posteriormente -- ha sido confirmado por otros autores (78, 82, 83, 84]. No obstante Ono (78) postul6 que la  $PGE_2$  no solo produce relajaci6n traqueal sino que tambien contracci6n, y que este efecto contractil depende del tono en el que se encuentre la preparaci6n, ya que cuando a~ade aspirina, el tono basal disminuye y la administraci6n de  $PGE_2$  produce un efecto de contracci6n.

En otros trabajos de investigaci6n han encontrado que el efecto de contracci6n de la  $PGE_2$  no depende del tono en el que se encuentre el tejido, ya que la disminuci6n de este con teofilina no revierte el efecto relajante de la  $PGE_2$ , solo lo disminuye. Adem6s proponen que las prostaglandinas actuan sobre tres tipos diferentes de receptores, receptores X los cuales producen contracci6n, receptores  $\psi$  que producen relajaci6n y los receptores  $\omega$  que producen irritaci6n y que su activaci6n depende de la concentraci6n de las prostaglandinas (85, 86).

Nuestros resultados obtenidos con la  $PGE_2$  nos muestran que bajo condiciones basales esta prostaglandina produce la relajaci6n del tejido, sin embargo cuando las traqueas son incubadas con indometacina o aspirina, la  $PGE_2$  produce efectos distintos, dependiendo de la concentraci6n; a concentraciones bajas se observa una contracci6n y a concentraciones altas se produce la relajaci6n. Es importante destacar que la tensi6n inicial fué

disminuida por estos inhibidores de la biosíntesis de prostaglandinas, pero se ajusto la línea basal a su tensión original con el tensómetro, por lo que la respuesta de contracción de la  $PGE_2$  se llevo a cabo cuando las preparaciones se encontraban en condiciones basales similares de tensión y a las mismas concentraciones. Estos resultados difieren de los obtenidos -- por otros investigadores, en los cuales la  $PGE_2$  solo produce un efecto de contracción cuando las cadenas traqueales se encuentran en un tono basal muy bajo. (78).

Los resultados obtenidos con la  $PGE_2$  en las cadenas traqueales del cobayo son similares a los reportados por otros autores -- (79) donde esta prostaglandina relaja la traquea, pero en presencia de inhibidores de la ciclooxigenasa (indometacina, meclofenamato de sodio), ocurre el efecto contrario. Sin embargo -- cuando se utilizan inhibidores de la lipooxigenasa (fenidona, ácido 5,8,11,14-ecosatetraínoico), el efecto de contracción de la  $PGE_2$  es bloqueado, postulando que probablemente esta prostaglandina en presencia de inhibidores de la ciclooxigenasa sea capaz de activar a la lipooxigenasa.

Es bien conocido que en los metabolitos del ácido araquidónico generados por la vía de la lipooxigenasa, se encuentran una serie de sustancias dentro de las cuales estan los leucotrienos

C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, y E<sub>4</sub> que probablemente sean la substancia de reacción lenta a la anafilaxia (87,88,89,90,91').

Una posible explicación del efecto de contracción de la PGE<sub>2</sub>, es el que esta prostaglandina active a la lipooxigenasa en presencia de la indometacina, y en consecuencia aumente la concentración de los leucotrienos, en especial del C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, y E<sub>4</sub>, en el tejido traqueal. El broncoespasmo que puede producir la aspirina en pacientes hipersensibles pudiera deberse al mecanismo descrito anteriormente (89).

Los resultados del presente estudio indican la existencia del sistema de relajación no adrenérgico en el músculo liso traqueal del cobayo y apoyan la participación de las prostaglandinas en las respuestas producidas por tal sistema.

En resumen se puede señalar que:

- 1.- La administración de un antagonista adrenérgico  $\beta$  como el propranolol a las cadenas traqueales de cobayo en presencia de atropina, apoya la existencia del sistema de relajación no adrenérgico.
- 2.- Las traqueas torácicas son claramente más sensibles que las cervicales al efecto bloqueador del propranolol.
- 3.- La indometacina y el ácido acetilsalicílico producen un bloqueo estadísticamente significativo de la relajación no adrenérgica.

gica.

4.- Estos resultados apoyan la existencia del sistema de relación no adrenérgico en el músculo liso traqueal del cobayo y sugieren la participación de las prostaglandinas en las respuestas producidas por tal sistema.

5.- La  $PGE_2$  en presencia de indometacina o ácido acetilsalicílico, probablemente estimula a la lipooxigenasa, aumentando la concentración de leucotrienos en el tejido.

REFERENCIAS

1. CANNON, W.B. and ROSENBLUETH, A.: Autonomic neuroeffector systems. The Macmillan Co., New York, (1937).
2. EULER, U.S. VON.: Adrenaline and noradrenaline distribution and action. *Pharmacol. Rev.*, 6: 15-22, (1952).
3. GOODMAN, L.S. y GILMAN, A.: Las bases farmacológicas de la terapéutica. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, p. 72-104, (1982).
4. BAIN, W.A.: Method of demonstrating humor transmission of effects of cardiac vagus stimulation in frog. *Q. J. Exp. Physiol. (London)*, 22: 269-274, (1932).
5. COBURN, R.F., and TOMITA, T.: Evidence for non- adrenergic inhibitory nerves in the guinea pig trachealis muscle. *Am. J. Physiol.*, 224: 1072-1080, (1973).
6. BURNSTOCK, G.: Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.*, 24: 509-581, (1972).
7. BURNSTOCK, G.: Comparative studies of purinergic nerves. *J. Exp. Zool.* 194: 103-134, (1975).
8. COBURN, R.F. and YIP, P.: Inhibitory innervation of the guinea pig -- trachealis muscle. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 39: 1062, -- (1980).
9. MATSUZAKI, Y., HAMASAKI, Y. and SAID, S.I.: Vasoactive intestinal -- peptide: A possible transmitter of non-adrenergic relaxation of guinea pig airways. *Science*, 210: 1252-1253, (1980).
10. WEI, E.P., KONIOS, H.A. and SAID, S.I.: Mechanism of action of vaso-- active intestinal polypeptide on cerebral arterioles. *Am. J. Physiol.* 239: 765-768, (1980).
11. ALBUQUERQUE, R.H., OWENS, C.W.I. and BLOOM, S.R.: A study of vaso -- active intestinal polypeptide (VIP) stimulated intestinal fluid secretion in rat and its inhibition by indomethacin. *Experientia*, 35: 1496-1497, (1979).
12. AHLQUIST, R.P.: A study of the adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.* 153: 586-600, (1948).
13. LANDS, A.M., ARNOLD, A., Mc AULIFF, J.P., LUDUENA, F.P. and BROWN, T. G.: Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature, (London)*, 214: 597-598, (1967).

14. CASTRO DE LA MATA, R., PENNA, M., and AVIADO, D.M.: Reversal of ---  
sympathomimetic bronchodilation by dichloroisoproterenol. *J. Pharma-  
col. Exp. Ther.*, 135: 197-203, (1962).
15. FOSTER, R.W.: The nature of adrenergic receptors of the trachea of ---  
the guinea pig. *J. Pharm. Pharmacol.*, 18: 1-12, (1966).
16. EVERITT, B.J. and CAIRNCROSS, K.D.: Adrenergic receptors in the guinea  
pig trachea. *J. Pharm. Pharmacol.*, 21: 97-102, (1969).
17. ANTHRACITE, R.F., VACHON, L. and KNAPP.: Alpha adrenergic receptors -  
in the human. *J. Am. Psychiat. Med.*, 33: 481-489, (1979).
18. CABEZAS, G.A., GRAF, P.D. and NADEL, J.A.: Sympathetic versus para ---  
sympathetic nervous regulation of airways in dogs. *J. Appl. Physiol.*,  
5: 651-655, (1971).
19. GURGIS, H.M. and Mc NEIL, R.S.: The nature of the adrenergic alpha -  
receptors in isolated human bronchi. *Thorax*, 24: 613-615, (1969).
20. FLEISCH, J.H., MALING, H.M. and BRODIE, B.B.: Evidence for existence  
of alpha adrenergic receptors in the mammalian trachea. *Am. J. Physiol.*  
218: 596-599, (1970).
21. PRIME, F.J., BIANCO, J., GRIFFIN, J.P. and KAMBUROFF, P.L.: The ---  
effects of air conductance of alpha adrenergic stimulation and ---  
blocking. *Bull. Physiopath. Resp.*, 8: 99-109, (1972).
22. KNEUSSL, M.P. and RICHARDSON, J.B.: Alpha adrenergic receptors in ---  
human and canine tracheal and bronchial smooth muscle. *J. Appl. ---  
Physiol.*, 45: 307- 311, (1978).
23. RICHARDSON, J.B., and FERGUSON, C.C.: Neuromuscular structure and ---  
function in the airways. *Fed. Proc.*, 38: 202-208, (1979).
24. MONTANO, R.L., HONG, E. y SELMAN, M.: Diferentes efectos de la epine-  
frina sobre el músculo liso traqueal del *Erythrocebus patas*: predomi-  
nio de los receptores adrenérgicos alfa. *Archivos de Investigación ---  
Médica.*, 16: 169-174, (1985).
25. FERRERO, J.D., COCRS, T. and BURNSTOCK, G.: A comparison between ATP  
and bradykinin as possible mediators of the responses of smooth muscle  
to non-adrenergic non-cholinergic nerves. *European J. Pharmacol.*, 63:  
295-302, (1980).
26. BURNSTOCK, G., CAMPBELL, G., SATCHELL, D. and SIMTHE, A.: Evidence ---  
that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter  
substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br.  
J. Pharmacol.*, 40: 668-688, (1970).

27. BAUER, V., MATUZAK, O. and KURIYAMA, H.: Non-cholinergic, non adrenergic responses to nerve stimulation of different regions of the guinea pig small intestine. *Arch. Pharmacol.*, 319: 108-114, (1982).
28. BIANCHI, C., BEANI, L., FRIGO, G.M. and CREMA, A.: Further evidence for the presence of non-adrenergic inhibitory structures in the guinea pig colon. *Europ. J. Pharmacol.*, 4: 51-56, (1968).
29. BURNSTOCK, G., CROW, R. and WONG, H.K.: Comparative pharmacological and histochemical evidence for purinergic inhibitory innervation of the portal vein of the rabbit, but not guinea pig. *Br. J. Pharmacol.* 65: 377-388, (1979).
30. BURNSTOCK, G. and IWAYAMA, T.: Fine structural identification of autonomic nerves and their relation to smooth muscle: Histochemistry of nervous transmission. *Prog. Brain Res.*, 34: 389-404, (1971).
31. SU, C., BEVAN, J. and BURNSTOCK, G.: [<sup>3</sup>H] Adenosine triphosphate: Release during stimulation of enteric nerves. *Science*, 173: 337-339, (1971).
32. KUCHII, M., MIYAHARA, T. and SHIBATA, S.: [<sup>3</sup>H]-Adenosine nucleotide and [<sup>3</sup>H]-noradrenaline release evoked by electrical field stimulation, perivascular nerve stimulation and nicotine from taenia of the guinea pig caecum. *Br. J. Pharmacol.*, 49: 258-267, (1973).
33. BURNSTOCK, G.: In cell membrane receptors for drug and hormones. (R.W. Straubs and L. Bolis eds.), p 107 New York: Raven Press (1978).
34. BANKS, C.E.B., BROWN, C., BURGESS, M.G., BURNSTOCK, G., CLARET, M., COCKS, M.T. and JENKINSON, H.D.: Apamin blocks certain neurotransmitter-induced increases in potassium permeability. *Nature*, 282: 415-417, (1979).
35. RIBEIRO, J.A.: Purinergic modulation of transmitter release. *J. Theor. Biol.*, 80: 259-270, (1979).
36. ITO, Y. and TAKEDA, K.: Non-adrenergic inhibitory nerves and putative transmitters in the smooth muscle of cat trachea, *J. Physiol.*, 330: 497-511, (1982).
37. HAMMARSTROM, M. and SJOSTRANDS, N.O.: Pathways for excitatory and inhibitory innervation to the guinea pig tracheal smooth muscle. *Experientia* 15: 64-65, (1979).
38. MIDDENDORF, W.F. and RUSSELL, J.A.: Innervation of airways smooth muscle in the baboon; evidence for a non-adrenergic inhibitory system. *J. Appl. Physiol.*, 48: 947-956, (1980).

39. KRELL, R.D.: Pharmacologic characterization of isolated Rhesus monkey bronchial smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 211: 436-443, --- (1979).
40. RICHARDSON, J. and BELAND, J.: Non-adrenergic inhibitory nervous --- system in human airways. *J. Appl. Physiol.*, 41: 764-771, (1976).
41. COLEMAN, R.A. and LEVY, G.P.: A non adrenergic inhibitory nervous --- pathway in guinea pig trachea. *Br. J. Pharmacol.*, 52: 167-174, (1974).
42. CHESROWN, S.E., VENUGOPALAN, C.S. and GOLD, W.M.: In vivo demonstration of non-adrenergic inhibitory innervation of the guinea pig trachea. *J. Clin. Invest.*, 65: 314-320, (1979).
43. DIAMOND, L. and O'DONNELL, M.: A non-adrenergic vagal inhibitory --- pathway to feline airways. *Science*, 208: 185-188, (1980).
44. COLEMAN, R.A.: Effects of some purine derivatives on the guinea pig -- trachea and their interaction with drugs that block adenosine uptake. *Br. J. Pharmacol.*, 57: 51-57, (1976).
45. KOLASSA, N., PELEGER, K. and RUMEL, W.: Specificity of adenosine up-- take into the heart and inhibition by dipyridamole. *Eur. J. Pharmacol.* 9: 265-268, (1970).
46. FARMER, J.B. and FARRAR, D.G.: Pharmacological studies with adenine, - adenosine and some phosphorylated derivatives on guinea pig tracheal - muscle. *J. Pharmacol. Pharmac.*, 28: 748-752, (1976).
47. CHRISTIE, J. and SATCHELL, D.G.: Purine receptors in the trachea: is - there a receptor for ATP ?, *Br. J. Pharmacol.*, 70: 512-514, (1980).
48. IRVIN, C.G., MACKLEM, P.T. and MARTIN, R.R.: Evidence against in vivo P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> purinergic pulmonary receptors. *Fed. Proc.*, 39: 1062, (1980).
49. DEY, R.D. and SAID, S.I.: Immunocytochemical localization of VIP-immuno reactive nerves in bronchial walls and pulmonary vessels. *Fed. Proc.*, - 39: 1062, (1980).
50. UDDMAN, R., ALLUMETS, J., DENSERT, O., HAKANASON, R. and SUNDLER, F.: - Occurrence and distribution of VIP nerves in the nasal mucosa and --- tracheo-bronchial wall. *Acta Otolaryng.*, 86: 443-448, (1978).
51. DEY, R.D., SHANON, W.A. and SAID, S.I.: Localization of VIP-immuno -- reactive nerves in airways and pulmonary vessels of dogs, cats, and - human subjects. *Cell Tissue Res.*, 20: 231-238, (1981).
52. PIPER, P.J., SAID, S.I. and VANE, J.R.: Effect on smooth muscle pro--

parations of unidentified vasoactive peptides from intestine and lung. *Nature*, 225: 1144-1146, (1970).

53. DIAMOND, L., SZAREK, J.L., GILLESPIE, M.N. and ALTIERE, R.J.: In vivo bronchodilator activity of vasoactive intestinal peptide in the cat. - *Am. Rev. Resp. Dis.*, 128: 827-832, (1983).
54. ALTIERE, R.J., SZAREK, J.L. and DIAMOND, L.: Response of cat airways - and intralobarartery to vasoactive intestinal peptide (VIP). *Fed. Proc.* 24: 245, (1982).
55. FRANDSEN, E.K., KRISHNA, G.A. and SAID, S.I.: Vasoactive intestinal -- polypeptide promotes cyclic adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in guinea pig trachea. *Br. J. Pharmacol.*, 62:367-369, (1978).
56. HILLS, J., MELDRUM, L.A., KLARSKOV, P. and BURNSTOCK, G.: A novel non-adrenergic, non-cholinergic nerve mediated relaxation of the pig bladder neck: An examination of possible neurotransmitter candidates. *Eur. J. - Pharmacol.*, 99: 287-293, (1984).
57. KARLSSON, J.A. and PERSSON, C.G.A.: Evidence against vasoactive intestinal polypeptide (VIP) as a dilator and in favour of substance P as a -- constrictor in airway neurogenic responses. *Br. J. Pharmacol.*, 79: 634-636, (1983).
58. KADOWITZ, P.J., SWEET, C.S. and BRODY, M.J.: Differential effects of - prostaglandins E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, F<sub>1α</sub> and F<sub>2α</sub> on adrenergic vasoconstriction in - the dog hindpaw. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 177: 641-649, (1971).
59. HOLMES, S.W., HORTON, E.W. and MAIN, I.H.: The effect of prostaglandin E<sub>1</sub> on responses of smooth muscle to catecholamines, angiotensin, and - vasopressin. *Br. J. Pharmacol.*, 21: 538-543, (1963).
60. CLEGG, P.C.: Antagonism by prostaglandins of the responses of various smooth muscle preparations to sympathomimetics. *Nature (London)*, 209: 1137-1139, (1966).
61. TOBIAN, L. and VIETS, J.: Potentiation of in vitro norepinehrine vasoconstriction with prostaglandin E<sub>1</sub>. *Fed. Proc.*, 29: 387, (1970).
62. WENNMAIM, A. and HEDQUIST P.: Prostaglandin E<sub>1</sub> as inhibitor of the sympathetic neuroeffector system in the rabbit heart. *Life Sci.* 9: 931-937 (1970).
63. HEDQUIST, P.: Control by prostaglandin E<sub>2</sub> of sympathetic neurotrans -- mission in the spleen. *Life Sci.*, 9: 269-278, (1970),
64. KADOWITZ, P.J., SWEET, C.S. and BRODY, M.J.: Blockade of adrenergic -- vasoconstrictor responses in the dog by prostaglandins E<sub>1</sub> and A<sub>1</sub>. *J. - Pharmacol. Exp. Ther.*, 179: 563-571 (1971).

65. JUNSTAD, M. and WENNMALM, A.: Release of prostaglandin from the rabbit isolated heart following vagal nerve stimulation or acetylcholine infusion. *Br. J. Pharmacol.*, 52: 375-379, (1974).
66. CLARK, K.E., KYAN, M.J. and BRODY, M.J.: Effect of prostaglandins on vascular resistance and adrenergic vasoconstrictor responses in the canine uterus. *Prostaglandins*, 12: 71-78, (1976).
67. BOONYAVIROJ, P. and GUIMAN, Y.:  $\alpha$ -Adrenergic stimulants, prostaglandins and catecholamine release from the adrenal gland in vitro. *Prostaglandins*, 10: 109-116, (1975).
68. KADOWITZ, P.J., SWEET, C.S. and BRODY, M.J.: Potentiation of adrenergic venomotor responses by angiotensin, prostaglandin F<sub>2</sub>  $\alpha$  and cocaine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 176: 167-173, (1971).
69. BENNETT, A., ELEY, K.G. and STOCKLEY, H.L.: Modulation by prostaglandins of contractions in guinea pig ileum. *Prostaglandins*, 9: 377-384, (1975).
70. FOSTER, R.W.: Paired tracheal chain preparation. *J. Pharm. Pharmacol.*, 12: 189-191, (1960).
71. CASTILLO, and De BEER.: The tracheal chain. A preparation for the study of antispasmodic with particular reference to bronchodilator drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 90: 104-109, (1947).
72. McGRATH, M.A.: 5-Hydroxytryptamine and neurotransmitter release in canine blood vessels. *Circulation Research*, 41: 428-435, (1977).
73. KARLSSON, J.A., and PERSSON, C.G.: Local anesthetics selectively inhibit non-cholinergic neuronal contractions in guinea pig airways. *Acta Physiol. Scand.*, 120: 469-471, (1984).
74. RICHARDSON, J.B.: Demonstration of a non-adrenergic inhibitory nervous system in the trachea of the guinea pig. *J. Allergy, Clin. Immunol.*, 56: 473-480, (1975).
75. HUSTED, S., SJOGRE, C., and ANDERSSON, K.E.: Mechanism of the responses to non-cholinergic, non-adrenergic nerve stimulation and to ATP in isolated rabbit urinary bladder: Evidence for ADP evoked prostaglandin release. *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, 47: 84-89, (1980).
76. GRUNSTROM, N., ANDERSON, R.G. and WIKBERG, J.E.: Investigations on possible presynaptic effect of adenosine and noradrenaline on cholinergic neurotransmission in guinea-pig trachea. *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, 49: 158-160, (1981).

77. KAMIKAWA, Y. and SHIMO, Y.: Mediation of prostaglandin E<sub>2</sub> in the - biphasic response to ATP of the isolated tracheal muscle of guinea pig, *J. Pharm. Pharmacol.*, 28: 231-238, (1976).
78. ONO, T., MOTOYAMA, Y., SAKAI, S., YONEDA, J. and KUMADA, S.: In -- teraction between aspirin and prostaglandins in the isolated guinea pig trachea muscle, *Japan J. Pharmacol.*, 29: 865-875, (1979).
79. BURKA, J.F. and PATERSON, A.M.: Evidence for lipooxygenase pathway involvement in allergic tracheal contraction, *Prostaglandins*, 19: 349-370, (1980).
80. KAMIKAWA, Y. and SHIMO, Y.: Pharmacological differences of non- - adrenergic inhibitory responses and of ATP induced relaxation in - guinea-pig tracheal strip-chains. *J. Pharm. Pharmacol.*, 28: 854 -- 855, (1976).
81. MAIN, I.H.: The inhibitory actions of prostaglandins on respiratory smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 22: 511-519, (1964).
82. TAKANOS, A., SAWANO, A., WATANABE, H. and SUZUKY, T.: A comparison of responses of guinea-pig isolated trachea to six prostaglandins, *Prostaglandins*, 15: 485-489, (1978).
83. HORTON, E.W. and MAIN, H.M.: A comparison of the actions of prosta glandins F<sub>2</sub> α and E<sub>1</sub> on smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 24: 470-476, (1965).
84. SHEARD, P.: The effect of prostaglandin E on isolated brochial -- muscle from man. *J. Pharm. Pharmacol.*, 20: 232-240, (1968).
85. GARDINER, P.J. and COLLIER, H.O.: Specific receptors for prostaglan dins in airways. *Prostaglandins*, 19: 819-841, (1980).
86. GARDINER, P.J., COPAS, J.L., SCHNEIDER, C. and COLLIER, H.O.: 2- Decarboxy-2-hydroxymethyl prostaglandin E<sub>1</sub> (TR4161), a prostaglan din bronchodilator of low tracheobronchial irritancy, *Prostaglandins*, 19: 349-370, (1980).
87. SAMUELSSON, B. and HAMMARSTROM, S.: Nomenclature for leukotriens. *Prostaglandins*, 19: 645-646, (1980).
88. MORRIS, H.G.: Concepts regarding fomation, action and pharmacolo- gic inhibition of arachidonic acid metabolites in asthma, *J. Asthma*, 20: 15-21, (1983).
89. GOLDYNE, M.E.: Leukotriens: Clinical significance. *J. Am. Acad. - Dermatol.*, 10: 659-668, (1984).

90. KRELL, R.D., OSBORN, R., VICKERY, L., FALCONE, K., O'DONNELL, M., GLEASON, J., KINZIG, C. and BRYAN, D.: Contraction of isolated -- airway smooth muscle by synthetic leukotriens C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub>. Prosta - glandins, 22: 387-407, (1981).
91. GOETZL, E., PAYAN, D. and GOLDMAN, D.: Immunopathogenetic roles of leukotriens in human diseases. J. Clin. Immunol., 4: 79-84, (1984).