

03068
2
leje.

**PARTICIPACIÓN DE UN FACTOR HUMORAL
EN LA CONTRACCIÓN SOSTENIDA DEL MÚSCULO
LISO BRONQUIAL INDUCIDA POR CARBACOL
EN UN MEDIO SIN CALCIO.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
PRESENTA:**

Blanca Margarita Bazán Perkins

TUTOR:

Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez

COASESORES:

**Dr. Mario Humberto Vargas Becerra
Dr. Marte Lorenzana Jiménez
Dra. María G. Campos Lara
Dr. Héctor Ponce Monter**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1994



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.

INDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	2
GLOSARIO	3
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	6
· Regulación del Ca^{2+} Citoplasmático: Papel del IP_3	6
· Almacenes de Ca^{2+} : RS y Caveolas	8
· Contracción del Músculo Liso en un Medio Con Ca^{2+}	9
· Contracción del Músculo Liso en un Medio Sin Ca^{2+}	9
· Participación de la CCP	12
· La Endotelina	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS GENERALES	17
OBJETIVOS PARTICULARES	17
MATERIAL Y MÉTODO	18
· Preparación de MLVA y Bronquio	18
· Contracción Inducida por Carbacol en un Medio Sin Ca^{2+} en las Preparaciones de MLVA y Bronquio	19
· Incubación con PMA y PDB	20
· Incubación con Calfostina C	20
· Incubación con Calfostina C más PMA o PDB	20
· Incubación con Calfostina C más ACP	21
· Incubación con Endotelina	21
· Incubación con Endotelina más BAYK 8644	21
· Fármacos	22
· Análisis de Resultados	22
RESULTADOS	23
· Respuesta de Contracción Inducida por Carbacol en un Medio Sin Ca^{2+}	23
· Efecto de los Ésteres de Forbol en la Contracción del MLVA y Bronquio en un Medio Con Ca^{2+}	23
· Efecto de los Ésteres de Forbol en la Contracción Producida por Carbacol en un Medio Sin Ca^{2+}	24
· Efecto de la Calfostina C en la Respuesta de Contracción Producida por los Ésteres de Forbol	24
· Influencia de la Calfostina C y del ACP en la Contracción Sostenida Producida por Carbacol en la Preparación Bronquial en un Medio Sin Ca^{2+}	25
· Respuesta de Contracción Mediada por Endotelina	25
· Respuesta de Contracción Mediada por Endotelina y el BAYK 8644 Sobre la Contracción Transitoria del MLVA	26
DISCUSIÓN	41
REFERENCIAS	50

AGRADECIMIENTOS

Correspondo al pueblo de México, al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y a la Universidad Nacional Autónoma de México la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría que culminan con la realización de esta tesis.

Al Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez le otorgo mi mas grande agradecimiento por darme toda la confianza, el asesoramiento, el apoyo y la amistad que me ayudaron no sólo a llevar a cabo esta tesis, sino también a involucrarme con una nueva y fascinante manera de ver la investigación científica. Gracias Luis.

A los Doctores María G. Campos Lara, Mario H. Vargas Becerra, Marte Lorenzana Jiménez y Héctor Ponce Monter agradezco su amable interés y las valiosas sugerencias aportadas durante la revisión del presente trabajo.

Asimismo mi más sincero agradecimiento al personal del Bioterio del INER, en especial al Señor Lozada (Q.E.P.D.), a David García Martínez y a Calixto Vargas Schimpf por el amable suministro de los animales de experimentación; al Laboratorio de Cirugía Experimental por su valioso préstamo de equipo y por el apoyo técnico en la obtención del material biológico; a Beatriz Vanda Cantón por compartir sus animales de experimentación; a Patricia Campos Bedolla por facilitarme el material bibliográfico con el que inicié la fundamentación de la tesis y a los Doctores Alfonso García-Sáenz y Carlos Ramos Abraham por el préstamo de reactivos.

GLOSARIO

ACP	-Acido Ciclopiazónico
BAYK 8644	-Agonista de Canales de Ca^{2+} tipo L
Ca^{2+}	-Calcio
CCP	- Cinasa C de Proteína
CE25	- Concentración Efectiva 25%
CE50	- Concentración Efectiva 50%
CS	- Concentración Subumbral
DAG	- 1, 2 Diacilglicerol
EGTA	- ácido N,N,N,N-tetracético (etilen glicol-bis(β -aminoetil éter))
IP_3	- 1,4,5 Trifosfato de Inositol
iv	- Intravenoso
MLVA	- Músculo Liso de las Vías Aéreas
PDB	- Forbol 12,13 Dibutirato
PMA	-Forbol 12- Miristato 13-Acetato
RS	-Retículo Sarcoplásmico
vs	- Contra

RESUMEN

Recientemente se ha descartado al cartilago como fuente de calcio (Ca^{2+}) para la contracción sostenida del músculo liso de las vías aéreas (MLVA) inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} y se ha propuesto que el mecanismo responsable para que se lleve a cabo este fenómeno es la apertura de los canales de Ca^{2+} tipo L y el reciclado de Ca^{2+} intracelular, mecanismo que permite al Ca^{2+} ser reutilizado por la célula en vez de ser sacado de ella. Nuestro objetivo fue determinar si un factor humoral, la endotelina potente péptido constrictor, era capaz de generar el reciclado de Ca^{2+} intracelular para inducir contracción sostenida del MLVA producida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} . Como se sabe que la endotelina es un modulador de los canales de Ca^{2+} tipo L y de la activación de la cinasa C de proteína (CCP), nos propusimos también describir la participación de estos dos factores en la respuesta de contracción sostenida. Se utilizaron dos preparaciones de músculo liso de perro: la preparación de MLVA obtenida de la tráquea y la preparación de MLVA mas cartilago, epitelio y tejido conectivo obtenida del bronquio (preparación bronquial). Observamos que la preparación de MLVA estimulada con carbacol en un medio sin Ca^{2+} se contrajo transitoriamente a diferencia de la preparación bronquial cuya respuesta en estas condiciones fue sostenida. La contracción inducida por los ésteres de forbol, activadores de la CCP, dependió del tipo de éster de forbol más que del tipo de preparación. El forbol 12,13 dibutirato (PDB) produjo una respuesta de contracción más rápida y de mayor magnitud que el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). La especificidad del PMA como activador de la CCP fue mayor que la del PDB en estas preparaciones de MLVA, pues la calfofistina C, un inhibidor específico de CCP, bloqueó totalmente la respuesta de contracción del PMA, y sólo entre el 80 al 90% de la respuesta al PDB. Debido a que tanto la preincubación con PMA como con calfofistina C no modificó la respuesta de contracción de ambas preparaciones al carbacol en un medio sin Ca^{2+} , nosotros sugerimos que la activación de la CCP probablemente no está involucrada en la respuesta de contracción del MLVA inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} . Por otro lado, la preincubación con PDB bloqueó la respuesta de contracción inducida por carbacol en estas mismas condiciones. Esto se debe a que el PDB además de ser un activador de la CCP probablemente tenga otros efectos colaterales que involucran la inhibición de la contracción del MLVA, posiblemente al bloquear algún mecanismo relacionado con la formación de IP_3 . El vaciado de los almacenes de Ca^{2+} del reticulo sarcoplásmico con ácido ciclopiazónico, inhibidor de la bomba de Ca^{2+} , redujo al 50% la respuesta de contracción de la preparación bronquial inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} . Debido a que el inicio de esta respuesta fue de mayor magnitud en presencia de calfofistina C, nosotros sugerimos que probablemente la CCP inhibe el acceso del Ca^{2+}

membranal para la contracción de la preparación bronquial, y que este fenómeno se hace más evidente cuando no hay Ca^{2+} en los almacenes intracelulares. Por otro lado, nosotros determinamos que la respuesta generada por la endotelina en la preparación de MLVA dependió de la presencia de Ca^{2+} extracelular. La preincubación con endotelina a concentración efectiva 25% y subumbral redujo la contracción de la preparación de MLVA inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} . La presencia de BAYK 8644, agonista de los canales de Ca^{2+} tipo L, durante la preincubación con endotelina, incrementó la magnitud y la duración de la respuesta de contracción, aunque no fue de la magnitud y duración de la contracción bronquial sostenida inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} . En conclusión la endotelina no es el factor involucrado en la contracción bronquial sostenida inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} y posiblemente en este fenómeno estén involucrados otros factores.

INTRODUCCIÓN

El mecanismo que presentan en común algunos sistemas celulares para iniciar su respuesta fisiológica es el incremento en la concentración de calcio (Ca^{2+}) citoplasmático. De manera general, para la contracción del músculo liso de las vías aéreas (MLVA) producida por un agonista colinérgico es necesaria la movilización de Ca^{2+} hacia el citoplasma tanto de fuentes extracelulares como intracelulares ^{1,71,82,98}. El incremento de Ca^{2+} citoplasmático facilita la interacción del Ca^{2+} con la calmodulina y la cinasa de la cadena ligera de miosina, generando así la fosforilación de la cadena ligera de miosina 20 kDa ^{10,55,94}. Esta fosforilación permite a la actina activar a la ATPasa de miosina para iniciar la interacción de los puentes cruzados de miosina causando el desarrollo de la tensión muscular ^{71,83,86,94}.

Se ha determinado que durante el inicio de la contracción existe una relación lineal entre la cantidad de cadena ligera de miosina fosforilada y el desarrollo de la fuerza contráctil, pero esta relación se pierde pocos minutos después ⁷⁸. En este período bajan los niveles de Ca^{2+} intracelular, la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (20 kDa), y la actividad de la ATPasa de miosina dando como consecuencia una interacción lenta de los puentes cruzados de miosina. Este estado conocido como "latch-bridges" es probablemente el responsable del mantenimiento de la tensión muscular ^{55,78,83}.

• REGULACION DEL Ca^{2+} CITOPLASMÁTICO: PAPEL DEL IP_3

En ausencia de un estímulo, las células del MLVA se caracterizan por ser poco permeables al Ca^{2+} extracelular. El ingreso de este ion al citoplasma se produce cuando se activan canales catiónicos inespecíficos operados mediante receptor y canales de Ca^{2+} tipo L sensibles a cambios de voltaje ^{33,34,84}. En el MLVA de perro la acción de la

acetilcolina y probablemente de agonistas colinérgicos, como el carbacol, sobre los receptores muscarínicos M_3 , induce un incremento rápido y transitorio de Ca^{2+} intracelular lo que genera la apertura de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} produciendo una corriente salientes de K^+ . La apertura de los canales tipo L es consecuencia de la variación del voltaje por el intercambio iónico a través de la membrana citoplasmática ^{1,2,33,95}.

Recientemente se ha observado que la inhibición de los canales tipo L del MLVA de perro no modifica la respuesta inducida por un estímulo colinérgico ¹. Se ha sugerido que en este tejido la activación de los canales tipo L contribuye principalmente a mantener llenos los almacenes intracelulares de Ca^{2+} más que a participar directamente en el incremento del Ca^{2+} citoplasmático ^{6,34,82}.

Por otro lado, la interacción del agonista con su receptor de membrana provoca una cascada de eventos intracelulares regulados por segundos mensajeros. Después de la estimulación colinérgica del MLVA de bovino o de perro, se produce la hidrólisis de fosfoinosítoles generando dos segundos mensajeros, el 1,2-diacilglicerol (DAG), activador de la cinasa C de proteína (CCP), y el 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3). Este último mensajero está presente sólo durante la fase inicial de la contracción e induce la liberación del Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS). La salida de Ca^{2+} inducida por IP_3 termina por la inhibición de los receptores a IP_3 mediante una señal producida por el incremento de Ca^{2+} citoplasmático ^{1,32,80}.

Tanto los canales tipo L como los receptores sarcoplásmicos a IP_3 son sensibles a los cambios de Ca^{2+} , pues ambos se activan cuando las concentraciones de Ca^{2+} intracelular son bajas, y se inactivan cuando son altas ^{25,48}.

Existe otro mecanismo mediante el cual el Ca^{2+} almacenado en el RS sale hacia el citoplasma, y es por medio de canales dependientes del incremento de Ca^{2+} citoplasmático

activados también con rianodina y cafeína^{13,41,63,80,81}. Esta salida de Ca^{2+} por los canales de Ca^{2+} sensibles a Ca^{2+} así como los sensibles a IP_3 es dependiente del contenido de este ion dentro del almacén celular, y ambos canales contribuyen al incremento transitorio de Ca^{2+} citosólico al inicio de la contracción^{1,21}. Por lo tanto, tal parece que la contracción del MLVA, al menos en su fase inicial, se debe a la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares y a la entrada de Ca^{2+} a través de los canales operados mediante receptor.

· ALMACENES DE Ca^{2+} : RS Y CAVEOLAS

En 1986 Putney⁶⁵ propuso el modelo de *Entrada capacitativa de Ca^{2+}* para explicar la regulación del almacenamiento de Ca^{2+} en la célula. Según este modelo, el vaciado de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} , producido por un agonista, es la señal que induce la entrada de Ca^{2+} para rellenar los almacenes vacíos a través de un canal directo que une el almacén con el espacio extracelular. Algunos datos han modificado este modelo: En 1990 Putney adicionó al modelo la bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP de la membrana plasmática que se caracteriza por ser inhibida con vanadato. Esta bomba que saca Ca^{2+} del citoplasma contra los gradientes de concentración, manteniendo la homeostasis de Ca^{2+} en la célula, es homóloga a la bomba de Ca^{2+} del RS la cual puede ser inhibida por una micotoxina extraída de *Penicillium* y *Aspegillus*, el ácido ciclopiazónico (ACP)^{7,74}.

Se ha observado en células de músculo liso intestinal de ratón que la bomba de Ca^{2+} membranal se concentra principalmente en invaginaciones inmóviles de la membrana citoplasmática de aproximadamente 50-100 nm conocidas como caveolas^{12,18,20,88}. Así mismo se han encontrado receptores a IP_3 en estas invaginaciones¹⁷. La presencia de canales de liberación de Ca^{2+} (sensibles a IP_3) y de ATPasas de Ca^{2+} son características del RS, principal almacén intracelular de Ca^{2+} en las células de músculo liso^{17,18,65}. Se ha observado que existe gran cantidad de caveolas en las células de músculo liso

en comparación con otras células, y que éstas se encuentran principalmente en las vecindades del RS ²⁰. Aunado a que se ha observado que la concentración de Ca^{2+} en la membrana plasmática es alta, se ha sugerido que las caveolas juegan un papel importante en el almacenamiento extracelular de Ca^{2+} y muy probablemente, junto con el RS, estén involucradas en la regulación del Ca^{2+} intracelular del MLVA ⁵⁴.

· CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO EN UN MEDIO CON Ca^{2+}

Se ha sugerido que las dos fuentes de Ca^{2+} , esto es la intracelular y la extracelular, corresponden a los componentes bifásicos de la contracción ^{41,98}. Al inicio de la respuesta se presenta el *componente fásico* (1 minuto) de la contracción que es producida por la liberación transitoria de Ca^{2+} de los almacenes sensibles a IP_3 ³². Posteriormente se produce el *componente tónico* de la contracción que se caracteriza por el mantenimiento constante de la tensión hasta alcanzar la respuesta máxima. En esta fase sostenida los niveles de Ca^{2+} citoplasmático bajan lentamente y, como ejemplo, en el MLVA de perro se mantienen aproximadamente en 80% de la concentración máxima alcanzada en el componente fásico ⁹⁸. Se ha propuesto que el componente tónico de la contracción es mantenida por la entrada continua de Ca^{2+} extracelular mediante los canales tipo L inducida por la presencia del agonista ^{32,41,98}.

· CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO EN UN MEDIO SIN Ca^{2+}

En el MLVA de perro estimulado con carbacol en un medio sin Ca^{2+} presenta una contracción transitoria probablemente debida a la liberación de Ca^{2+} del RS ⁶. Sin embargo, en las preparaciones de MLVA de perro que conservan otras estructuras adyacentes a este tejido como epitelio, cartilago y tejido conectivo (bronquio), la respuesta al carbacol deja de tener solo el componente transitorio y se transforma en sostenida ^{53,54}.

Se ha sugerido que el cartílago actúe como un almacén extracelular de Ca^{2+} , y que probablemente el Ca^{2+} proveniente del cartílago llegue al MLVA para mantener la contracción^{16,24}. No obstante, recientemente Montañó y colaboradores⁵⁴ demostraron que el cartílago no es la fuente de Ca^{2+} responsable para producir la contracción bronquial sostenida, que este ion proviene del RS y probablemente de las caveolas del MLVA y que esta respuesta, como en el caso del músculo liso vascular de perro, es dependiente de la activación de los canales tipo L⁴¹.

Se han propuesto que los canales tipo L tienen contacto directo con un tipo de almacén sensible a altas concentraciones de EGTA (1mM), ácido N,N,N,N-tetracético (etilen glicol-bis(β -aminoetil éter), agente quelante de Ca^{2+} ^{23,41}. Se ha sugerido que este almacén, posiblemente la caveolas¹², y el almacén que no es sensible al EGTA, el RS, probablemente estén conectados e intercambien Ca^{2+} mediante los canales tipo L⁵⁴ (Fig. 1).

Actualmente se ha propuesto que el mecanismo involucrado en la contracción bronquial sostenida inducida por carbacol en ausencia de Ca^{2+} extracelular es el reciclado del Ca^{2+} del RS y las caveolas; es decir, una vez que el Ca^{2+} de los almacenes es liberado al citoplasma por activación de los canales sensibles a IP_3 , éste no es sacado totalmente de la célula por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ⁴⁹ sino que es recapturado por la caveolas mediante la bomba de Ca^{2+} y, a través de la activación de los canales tipo L llega al RS⁵⁴.

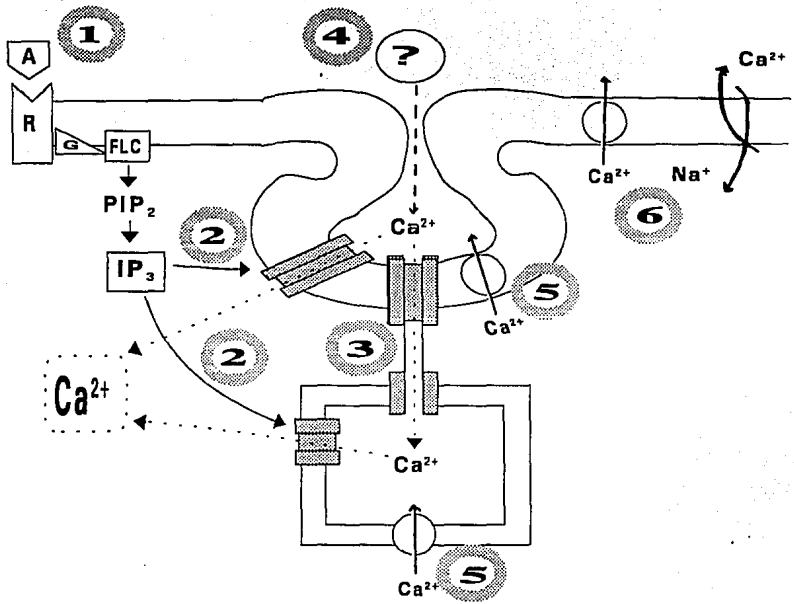


Figura 1. Modelo hipotético para el reciclado de Ca^{2+} intracelular durante la contracción sostenida de la MLVA inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} . 1: La interacción del carbacol con su receptor induce hidrólisis de fosfolípidos generando IP_3 , y 2: movilizándolo Ca^{2+} intracelular del RS y las cisternas para iniciar la contracción. 3: Después de que el Ca^{2+} fue liberado de los almacenes, los canales tipo L llenan los almacenes vacíos de Ca^{2+} . 4: Una sustancia endógena puede ser liberada durante la estimulación con carbacol para modular la apertura de los canales tipo L permitiendo el reciclado del Ca^{2+} . 5: El Ca^{2+} liberado al citoplasma es retornado por los almacenes en lugar de ser sacado de la célula (6). A= carbacol, G= proteína G, FLC= fosfolipasa C, PIP_2 = bifosfato de fosfolinositol. (Tomado de Montañó y col., 1994).

Un segundo mensajero ha sido fuertemente involucrado en la fase sostenida de la contracción del MLVA de bovinos ⁶⁴ y del músculo liso vascular de conejo ³⁵. Este mensajero, conocido como CCP, es capaz de mantener niveles sostenidos de Ca^{2+} libre intracelular mediante la activación de los canales tipo L ^{5,79} y la liberación de Ca^{2+} del RS al inducir el metabolismo de los fosfoinositoles ^{2,39} así como tener la habilidad de aumentar la sensibilidad de la maquinaria involucrada en la contracción al Ca^{2+} ¹. Por lo tanto se considera que la CCP es un posible candidato como factor involucrado en la contracción bronquial sostenida.

· PARTICIPACIÓN DE LA CCP

La CCP es una proteína que se encuentra libre en el citosol cuando está inactiva y se adhiere a la membrana plasmática si se encuentra activa ⁸. Para activarse la CCP necesita la presencia de Ca^{2+} , fosfolípidos (principalmente fosfatidilserina) y DAG ^{57,73,88}. Los agonistas sintéticos del DAG, los ésteres de forbol, son una familia de sustancias que por ser poco solubles en agua se difunden y metabolizan lentamente en la célula, prolongando su capacidad como activadores de la CCP aun en ausencia de Ca^{2+} extracelular, aunque con menor potencia ^{4,36,58,59,75,79,89,96}.

Aunque Vivaudou y colaboradores ⁹³ observaron que la acetilcolina modula corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje mediante la activación de la CCP en músculo liso de estómago de *Bufo marinus*, Montañó y colaboradores ⁵⁴ observaron que la adición de carbacol por sí solo no puede activar a los canales tipo L responsables del reciclado de Ca^{2+} ya que, cuando disecaron el MLVA de las preparaciones bronquiales, es decir, cuando le quitaron el cartilago, el epitelio y el tejido conectivo, este agonista colinérgico no fue capaz de inducir la contracción sostenida en un medio sin Ca^{2+} . Por lo tanto, nosotros creemos que se requiere de un factor endógeno adicional para que los canales

tipo L sean abiertos o modulados por este factor y de esta forma permitir que el carbacol induzca el reciclado del Ca^{2+} intracelular para producir la respuesta de contracción sostenida. Recientemente se ha postulado que la endotelina péptido descubierto en el endotelio vascular y que se ha localizado en epitelio bronquial ^{50,97}, es un modulador de los canales tipo L por lo que podría ser un posible candidato como factor endógeno responsable de la contracción sostenida bronquial en un medio sin Ca^{2+} .

• LA ENDOTELINA

Las endotelinas (ET_1 , ET_2 y ET_3) son una familia de péptidos en la cual la ET_1 (endotelina) es conocida como el broncoconstrictor más potente hasta ahora conocido en términos de su potencia molar ^{26,50,91,97}. Se ha observado que la contracción producida por la endotelina en MLVA de humano, cobayo y músculo liso vascular de conejo es de lento desarrollo y larga duración ^{50,60,91} probablemente por que este péptido tiene alta afinidad por su receptor ⁸⁷.

Por otro lado, se ha observado en cobayos *in vivo* e *in vitro* en cobayos que la respuesta a la endotelina es bloqueada por indometacina, lo que ha sugerido que los mecanismos de acción de éste péptido involucren la liberación de mediadores químicos como leucotrienos y tromboxano A_2 de las células cebadas adyacentes al MLVA ^{14,42,46}.

Se ha descrito que la estimulación de los receptores de endotelina en el MLVA de humano y músculo liso vascular de cerdo, rata y conejo activa varias vías de transducción de señales que culminan en la movilización de Ca^{2+} intracelular así como el influjo de Ca^{2+} extracelular ^{38,43,44,47,76}. Ambos mecanismos contribuyen a la contracción producida por endotelina.

Por un lado, la entrada de Ca^{2+} extracelular producida por la endotelina es un fenómeno controvertible. Algunos autores sugieren que el influjo de Ca^{2+} extracelular es

a través de los canales tipo L^{26,44,72,76,91,97}; mientras que otros postulan que es por canales de Ca²⁺ insensibles a cambios de voltaje^{27,42,47,60}.

Por otro, la movilización de Ca²⁺ intracelular producida por la endotelina ocurre mediante una cascada de eventos en los que se incluye la estimulación de una proteína G no sensible a pertussis, la activación de la fosfolipasa C^{56,70}, la formación de DAG, la subsecuente activación de CCP y la generación de IP₃^{44,47}. Se ha observado que la generación de IP₃ producido por la endotelina en músculo liso vascular no es transitoria, pues se ha llegado a obtener hasta 10 minutos después de la administración de endotelina⁷⁰ aunque también se ha indicado que el incremento de IP₃ producido por la endotelina dura menos de 5 minutos^{44,87}.

En ausencia de Ca²⁺ extracelular, la respuesta de contracción inducida por endotelina es sumamente dependiente de la activación de la CCP. Recientemente se ha demostrado que la inhibición del sitio regulador de la CCP con callostina C, una sustancia extraída de *Cladosporium cladosporioides*, produce relajación de la contracción sostenida generada por la endotelina, con o sin Ca²⁺ extracelular, en el músculo liso de la aorta^{38,44,76}. Por lo tanto se ha propuesto que el mecanismo de acción por medio del cual la endotelina produce sus diferentes efectos es a través de la activación de la CCP y la formación de IP₃^{9,22,62,70,77,87}.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Por todo lo anterior se hace evidente que las células del MLVA tienen la maquinaria necesaria para reutilizar el Ca^{2+} citoplasmático para la contracción sin agotar las fuentes intracelulares de este ion. Sin embargo, la adición de carbacol por sí solo no puede activar los mecanismos responsables del reciclado de Ca^{2+} ya que, cuando se disecciona el MLVA de las preparaciones bronquiales, es decir, cuando le quitan el cartilago, el epitelio y el tejido conectivo, este agonista colinérgico no es capaz de inducir la contracción sostenida en un medio sin Ca^{2+} . Por lo tanto, nosotros creemos que se requiere de un factor endógeno adicional para permitir que el carbacol induzca el reciclado del Ca^{2+} intracelular y así inducir una respuesta de contracción sostenida. El propósito del siguiente trabajo fue describir la participación de un factor, la endotelina, probablemente involucrado en la contracción del MLVA, mismo que podría tener una repercusión importante en la patogénesis del asma y en la búsqueda de nuevos enfoques terapéuticos para esta enfermedad.

HIPÓTESIS

Las hipótesis en que sustentamos este trabajo fueron las siguientes:

- 1. Durante la contracción sostenida inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} están presentes uno o varios factores endógenos responsables de que se genere el reciclado de Ca^{2+} en el interior de la célula.**
- 2. La endotelina es uno de estos factores endógenos.**
- 3. El mecanismo por medio del cual la endotelina favorece el reciclado del Ca^{2+} intracelular inducido por el carbacol es a través de la activación de los canales tipo L.**
- 4. La contracción sostenida del MLVA inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} depende de la activación de la CCP.**

OBJETIVOS GENERALES

1. Determinar si la endotelina es un factor involucrado en la contracción bronquial sostenida inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} .
2. Evaluar la participación de la CCP en la respuesta de contracción sostenida del MLVA y del bronquio inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} .

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar la respuesta de contracción del MLVA y del bronquio completo (MLVA más cartilago, epitelio y tejido conectivo) inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} .
2. Determinar la concentración efectiva máxima de dos ésteres de forbol [4β -forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) y 4β -forbol 12,13-dibutirato (PDB)] para las preparaciones de MLVA y bronquio.
3. Observar el efecto de los ésteres de forbol sobre las contracciones producidas por el carbacol en un medio sin Ca^{2+} en las preparaciones de MLVA y bronquio.
4. Determinar la concentración de la calfofostina C que no modifique la respuesta de contracción inducida por el KCl en las preparaciones de MLVA y de bronquio, pero sí bloquee la respuesta de los respectivos ésteres de forbol.
5. Determinar si la calfofostina C así como el ACP bloquean la contracción sostenida inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} en la preparación bronquial.
6. Determinar las concentraciones efectiva 25 (CE25) y subumbral (CS) de la endotelina para la contracción de la preparación de MLVA y de bronquio en un medio sin Ca^{2+} .
7. Determinar si la contracción transitoria de la preparación de MLVA inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} puede transformarse en sostenida previa incubación con endotelina (CE25 y CS) y BAYK 8644 (agonista de los canales tipo L).

MATERIAL Y MÉTODO

Preparación de MLVA y de Brónquio

Teniendo en cuenta que los mecanismos de contracción del MLVA podrían ser diferentes dependiendo del tipo de preparación *in vitro* empleada pues la interpretación de los estudios que emplean preparaciones de MLVA libre de tejidos adyacentes podría ser inadecuada para las condiciones que prevalecen *in vivo*, decidimos utilizar dos tipos de preparaciones: la preparación de MLVA y la de MLVA más cartílago, epitelio y tejido conectivo (preparación bronquial). Con este fin se sacrificaron perros criollos (12-20 Kg) mediante sobredosis de pentobarbital (100 mg/Kg iv) para de disecar la tráquea de la zona cercana a la carina y el lóbulo pulmonar superior izquierdo. La preparación de MLVA se obtuvo de la tráquea de donde es más fácil de extraer³¹. Con ayuda de un microscopio estereoscópico, el MLVA fue finamente disecado y limpiado del exceso de tejido conectivo para cortarse en tiras de aproximadamente 3 mm x 1 cm. Del pulmón se disecaron anillos bronquiales (preparación bronquial) a partir de bronquios de 3^{era} a 5^{ta} generación, los cuales se obtuvieron sin quitar las estructuras adyacentes al MLVA como el cartílago, el epitelio y el tejido conectivo.

Las preparaciones de MLVA y de bronquio fueron colocadas en cámaras de órganos aislados donde fueron incubadas en 10 ml de solución de Krebs bicarbonatada a un pH de 7.4 y 37°C, y fueron burbujeadas con una mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂. Se utilizaron dos tipos de solución de Krebs 1) Con Ca²⁺, cuya composición fue la siguiente (mM): NaCl 115, KCl 4.6, NaH₂PO₄·H₂O 1.2, MgSO₄·7H₂O 1.16, NaHCO₃ 22, CaCl₂ 2.5 y glucosa 11 y 2) Sin Ca²⁺, con la misma composición que la solución anterior, excepto por la falta de CaCl₂. Para asegurar que esta solución estuviera completamente

libre de Ca^{2+} se le añadió 0.1 mM de EGTA como agente quelante de este ion.

Todas las preparaciones fueron incubadas con 10^{-5} M de indometacina para suprimir la producción de prostaglandinas y su posible efecto sobre los mecanismos estudiados. La tensión isométrica fue registrada en un dinógrafo Beckman R612 a través de un transductor Gould Statham UC3. Las preparaciones se dejaron en reposo durante 30 minutos a una tensión de 1 a 1.5 g antes de iniciar los experimentos. Durante ese tiempo la solución de Krebs fue cambiada una sola vez.

Las preparaciones fueron estimuladas tres veces con KCl 60 mM en un medio con Ca^{2+} durante 20 minutos con el propósito de normalizar la respuesta. Las respuestas de contracción de todos los tratamientos farmacológicos que se describen posteriormente se expresaron como porcentaje de respuesta del tercer estímulo con KCl 60 mM.

Contracción Inducida por Carbacol en un Medio Sin Ca^{2+} en las Preparaciones de MLVA y Bronquio.

La sensibilidad de los almacenes intracelulares al carbacol fue evaluada indirectamente estimulando con la concentración efectiva 50% de carbacol ($\text{CE}_{50} = 0.42 \mu\text{M}$) durante 20 minutos en un medio sin Ca^{2+} en las dos preparaciones (MLVA y bronquio). En estas condiciones, la contracción máxima inducida por carbacol representó en forma indirecta, la cantidad total de Ca^{2+} intracelular disponible^{6,45,54}. Posteriormente esta estimulación se repitió las veces necesarias para vaciar los almacenes intracelulares de Ca^{2+} . Una vez vaciados estos almacenes, las preparaciones se incubaron nuevamente con solución de Krebs con Ca^{2+} 2.5 mM y se dió una última estimulación con carbacol para verificar si el vaciado de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} no había modificado la viabilidad del tejido.

• *Incubación con PMA y PDB*

Mediante curvas no acumulativas en un medio con Ca^{2+} (desde 1 nM a 5.6 μM) se obtuvieron las respuestas de contracción correspondientes a las concentraciones submáxima, máxima y supramáxima de las preparaciones de MLVA y bronquio al PMA y al PDB. Se incluyeron dos grupos controles, uno para demostrar que la concentración de DMSO utilizada (solvente de los ésteres de forbol) no produjo ninguna respuesta, y otro para observar el comportamiento temporal de la preparación.

• *Incubación con Calfofistina C*

Por otro lado, las preparaciones de MLVA y de bronquio se incubaron con calfofistina C 0.32 y 1 μM durante 1 hora en un medio con Ca^{2+} con el fin de inhibir la activación de la CCP, por que se ha reportado que a estas concentraciones inhibe los efectos de los ésteres de forbol sin producir colaterales ⁷⁷.

• *Incubación con Calfofistina C más PMA o PDB*

Posteriormente se hicieron 5 grupos experimentales por preparación y por concentración de calfofistina C para evaluar la dependencia de la CCP en la respuesta producida por los ésteres de forbol: a) PMA, concentración máxima, b) PMA, concentración supramáxima, c) PDB, concentración submáxima, d) PDB, concentración máxima y e) KCl 60 mM. El grupo e) nos indicaba si la respuesta producida por KCl, que no es dependiente de la activación de la CCP, era afectada por la calfofistina C y así detectar efectos inespecíficos de este fármaco ⁷⁷.

· *Incubación con Calfofina C más ACP*

Por último, se determinó si la inhibición de la CCP con calfofina C, y de la bomba de Ca^{2+} del RS con ACP ^{6,74} eran capaces de modificar el componente tónico de la contracción de la preparación bronquial producida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} . Se utilizó ACP 10 μM porque a esta concentración es capaz de inhibir al máximo la bomba de Ca^{2+} del RS ⁶. Cuando se utilizó ACP fue necesario producir la salida de Ca^{2+} del RS mediante la adición de carbacol para inducir su vaciado. La concentración 1 μM de calfofina C se utilizó por que fue la que inhibió 100% la respuesta producida por los ésteres de forbol y no produjo modificaciones de la respuesta al KCl. Las preparaciones bronquiales incubadas en Krebs sin Ca^{2+} fueron divididas en 4 grupos para someterlas a los siguientes tratamientos farmacológicos durante 1 hora: a) calfofina C, b) calfofina C + ACP, c) ACP y d) control. Al término del tiempo de incubación, se añadió carbacol y se evaluó la respuesta de contracción obtenida en presencia de ACP y calfofina C.

· *Incubación con Endotelina*

Se realizaron curvas acumulativas (desde 1 nM hasta 0.32 μM) a la endotelina en preparaciones de MLVA y de bronquio en Krebs con y sin Ca^{2+} . A partir de estas curvas concentración-respuesta se obtuvieron la CE25 y la CS para la endotelina.

· *Incubación con Endotelina más BAYK 8644*

Posteriormente en las preparaciones de MLVA se evaluó si la endotelina o un agonista de los canales tipo L, como el BAYK 8644 ⁸⁵, a 10 μM , concentración que induce el efecto máximo ⁶, o ambos podían transformar en sostenida la contracción transitoria inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} . Para esto, las preparaciones de MLVA se dividieron en 6 grupos de incubación en un medio sin Ca^{2+} con los siguientes fármacos: a) endotelina

CE25 (10 minutos), b) endotelina CS (10 minutos), c) BAYK 8644 (5 minutos) + endotelina CE25 (10 minutos), d) BAYK 8644 (5 minutos) + endotelina CS (10 minutos), e) BAYK 8644 (15 minutos) y f) control. Una vez terminado el tiempo de incubación, se dió un estímulo con carbacol en un medio sin Ca^{2+} y se evaluó la evolución de la respuesta de contracción.

· *Fármacos*

Con las excepciones indicadas, todos los fármacos fueron obtenidos de Sigma Chem. Co., San Luis, MO. Las sustancias fueron disueltas en agua desionizada, salvo los ésteres de forbol, que fueron disueltos inicialmente en DMSO. La calfstina C se disolvió totalmente en DMSO ⁷⁷. La concentración del DMSO en las cámaras de órganos aislados no excedió el 0.1%, pues se ha indicado que a esa concentración, el DMSO no produce ningún efecto ¹¹. La indometacina se disolvió en Na_2CO_3 1%.

· *Análisis de Resultados*

La evaluación de resultados se hizo mediante pruebas de comparación múltiple (análisis de varianza de una vía y pruebas de comparación múltiple de Bonferroni). En otras comparaciones se utilizó la prueba de t-student para muestras pareadas y no pareadas según se requirió. Los valores de $P < 0.05$ bimarginal fueron considerados como estadísticamente significativos. Los resultados que aparecen en el texto y las ilustraciones corresponden al promedio \pm el error estándar.

RESULTADOS

• Respuesta de Contracción Inducida por Carbacol en un Medio Sin Ca^{2+}

La estimulación sucesiva de las preparaciones de MLVA (n=6) y de bronquio (n=6) con carbacol en un medio sin Ca^{2+} produjo el vaciado de los almacenes intracelulares de este ion (fig.2). En el caso de la preparación de MLVA, el vaciado de los almacenes intracelulares se observó desde la primera estimulación en un medio sin Ca^{2+} ; mientras que, para la preparación bronquial, fueron necesarias al menos cuatro estimulaciones para reducir la contracción hasta un 17% (fig.3). Al final de este período, se regresó a la solución de Krebs con Ca^{2+} y se dió un estímulo con carbacol para demostrar que el vaciado de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} no modifica la maquinaria contráctil de la preparación (fig.3).

• Efecto de los Ésteres de Forbol en la Respuesta de Contracción del MLVA y Bronquio en un Medio Sin Ca^{2+}

La contracción inducida por los ésteres de forbol en las preparaciones de MLVA (n=6) y de bronquio (n=6) fue sostenida, de lento desarrollo y se prolongó hasta 4 horas (fig.4 y 5). Las contracciones máximas producidas por el PMA (1 μ M) en las preparaciones de MLVA y de bronquio correspondieron al 7.73 ± 2.35 y al 6.63 ± 1.37 respectivamente del porcentaje de respuesta producida por el KCl 60 mM (fig.6), mientras que para el PDB (3.2 μ M) los valores correspondientes a esta respuesta fueron 12.7 ± 2.52 y 14.23 ± 2.31 respectivamente (fig.6). El PMA produjo su respuesta máxima después de 2 horas en la preparación bronquial (fig.4), y a las 4 horas en el caso de la preparación de MLVA (fig.5); mientras que el PDB produjo su efecto máximo a las 2 horas para la preparación de MLVA (fig.5) y a las 3 horas en la preparación bronquial (fig.4).

· Influencia de los Ésteres de Forbol en la Contracción Producida por Carbacol en un Medio Sin Ca^{2+}

Las respuestas de contracción de las preparaciones de MLVA y de bronquio incubadas durante 1 hora con PMA 1 y 3.2 μ M (n=6 y 5 respectivamente), producidas por el carbacol en un medio sin Ca^{2+} , no fueron significativamente diferentes de las producidas por los controles (n=6) (fig.7); sin embargo, la incubación con PDB 1 y 3.2 μ M (n=6 y 5 respectivamente) produjo, en ambos casos, una inhibición significativa ($p < 0.01$) de la contracción generada por el carbacol (fig.7). Los valores correspondientes a las respuestas de la preparación de MLVA fueron: control (n=6) 68.01 ± 3.41 vs 1 μ M de PDB (n=6) 1.25 ± 0.7 y 3.2 μ M de PDB (n=6) 1.94 ± 0.8 respectivamente del porcentaje de respuesta producida por el KCl 60 mM; y para la preparación bronquial: control (n=6) 90.21 ± 5.97 vs 1 μ M de PDB (n=6) 9.81 ± 3.42 y 3.2 μ M de PDB (n=6) 3.6 ± 1.49 . Una estimulación posterior con KCl no mostró variaciones significativas de la respuesta de contracción en relación a la tercera respuesta al KCl obtenida al inicio del experimento (fig.8). Esta última respuesta nos indicó que no hubo daños por efectos inespecíficos en las preparaciones producidos después de la incubación con los ésteres de forbol.

· Efecto de la Calfofistina C en la Respuesta de Contracción Producida por los Ésteres de Forbol

La incubación con calfofistina C 0.32 y 1 μ M durante 1 hora inhibió la respuesta generada tanto por PMA como por PDB a la concentración de 1 μ M, de manera dependiente del tiempo y la concentración (fig. 9 y 10). En todas las preparaciones la máxima inhibición se observó a los 30 minutos con 1 μ M de calfofistina C. En el caso de las preparaciones de MLVA, la máxima inhibición producida por 1 μ M de calfofistina C fue del 97.37 ± 2.62 % de la respuesta producida por PMA (fig.9) y del 66 ± 15.82 % de la respuesta generada

por PDB (fig.10). Con respecto a las preparaciones bronquiales, la calfofostina C inhibió el 100 % de la respuesta producida por PMA (fig.9) y el 88.53 ± 11.46 % de la respuesta inducida por PDB (fig.10). Asimismo, observamos que, en ninguna de las preparaciones, la incubación con calfofostina C 0.32 y 1 μM modificó la respuesta producida por KCl con respecto a la tercera respuesta al KCl obtenida al inicio del experimento (fig.11).

· Influencia de la Calfofostina C y del ACP en la Contracción Sostenida Producida por Carbacol en la Preparación Bronquial en un Medio Sin Ca^{2+}

La incubación con calfofostina C 1 μM durante 1 hora en un medio sin Ca^{2+} no alteró el desarrollo de la respuesta producida por carbacol en la preparación bronquial ($n=6$), no obstante, la presencia de ACP 10 μM ($n=6$), inhibidor de la bomba de Ca^{2+} del RS, indujo un decremento significativo ($p<0.05$) en el desarrollo esta respuesta (fig.12). Asimismo, el ACP fue capaz de reducir significativamente ($p<0.05$) el inicio de la contracción en comparación con la producida por el control y la incubada con calfofostina C (fig.12).

· Respuesta de Contracción Mediada por Endotelina

La respuesta de contracción producida por la administración sucesiva de endotelina (desde 1 nM a 0.32 μM) en las preparaciones de MLVA y de bronquio fue dependiente de la presencia de Ca^{2+} extracelular pues, en ausencia de este ion, la curva de endotelina en ambas preparaciones se desplazó hacia la derecha (fig.13).

• ***Respuesta de Contracción Mediada por Endotelina y el BAYK 8644 Sobre la Contracción Transitoria del MLVA***

La incubación de las preparaciones de MLVA con endotelina CE25 (n=6) y CS (n=6) durante 10 minutos produjo un decremento significativo ($p<0.05$) de la respuesta al carbacol en un medio sin Ca^{2+} en comparación al control (n=6) (fig.14).

Las respuestas producidas por el carbacol en un medio sin Ca^{2+} en las preparaciones de MLVA que fueron incubadas con: a) BAYK 8644 (n=6), b) BAYK 8644 más endotelina CE25 (n=6) ó c) BAYK 8644 más endotelina CS (n=6), fueron significativamente ($p<0.05$) más sostenidas si se comparan con la respuesta control de la preparación de MLVA (fig.15). Sin embargo, las respuestas de contracción de las preparaciones antes mencionadas incubadas con BAYK 8644 fueron significativamente ($p<0.05$) menores que la respuesta de contracción sostenida de la preparación bronquial (fig.15).

MUSCULO LISO

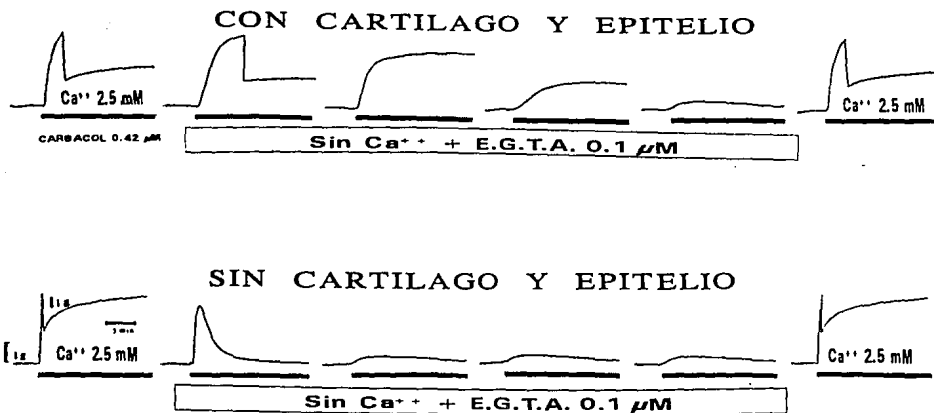


Figura 2. Representación esquemática de la contracción inducida por carbacol en la preparación de MLVA (parte superior) y la preparación bronquial (parte inferior) en un medio con y sin Ca^{2+} .

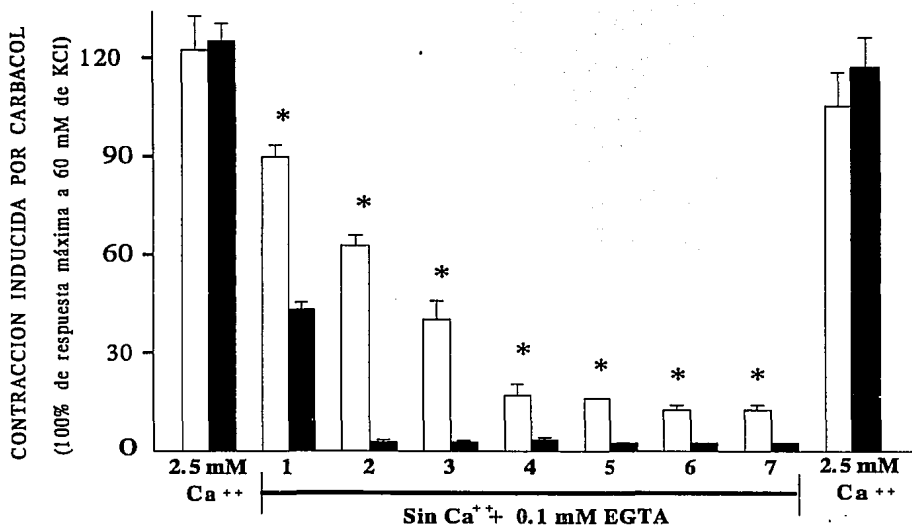


Figura 3. Respuesta de contracción al carbacol de las preparaciones de MLVA (n=6, barras negras) y bronquio (n=6, barras blancas) en un medio con Ca²⁺ (estimulaciones del 1 al 7). * Diferencias significativas (p<0.01) entre las preparaciones de MLVA y bronquio.

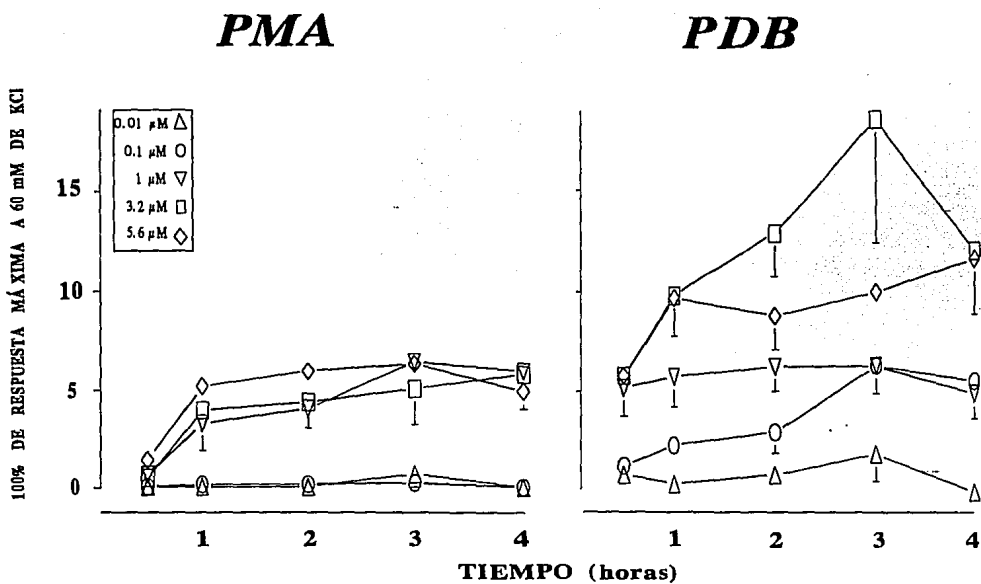


Figura 4. Curso temporal de las respuestas de contracción de la preparación bronquial a las diferentes concentraciones de ésteres de forbol. A la izquierda PMA (n=6) y a la derecha PDB (n=6).

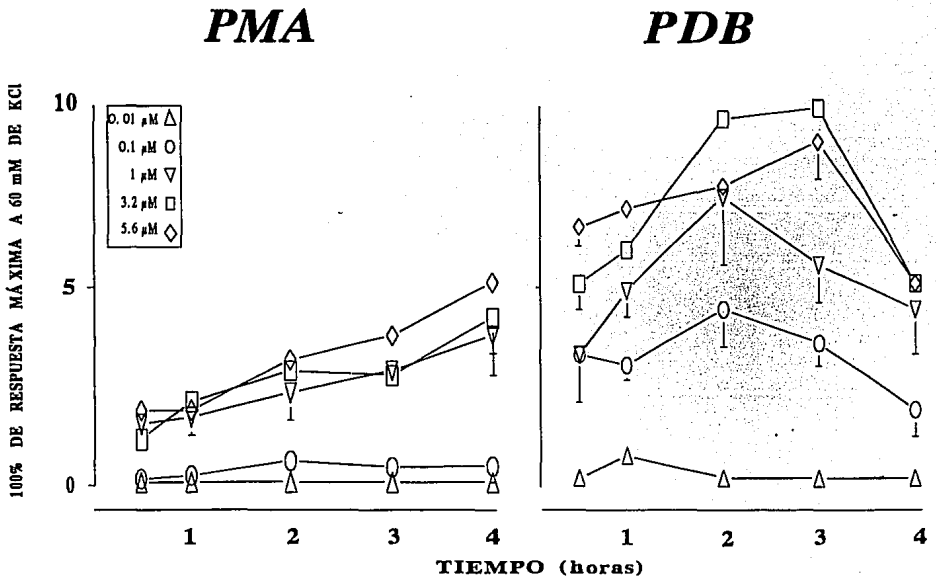


Figura 5. Curva temporal de las respuestas de contracción de la preparación de MLVA a las diferentes concentraciones de ésteres de forbol. A la izquierda PMA (n=6) y a la derecha PDB.

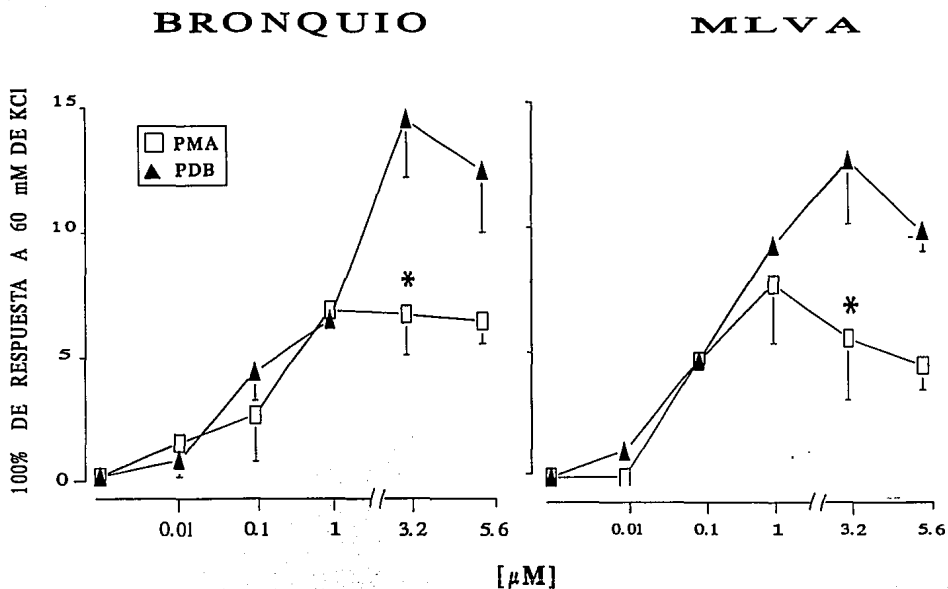


Figura 6. Respuesta de contracción máxima de las preparaciones de bronquio y de MLVA a los ésteres de forbol. PMA en cuadros (n=6) y PDB en triángulos (n=6). * Diferencias significativas entre grupos PMA y PDB.

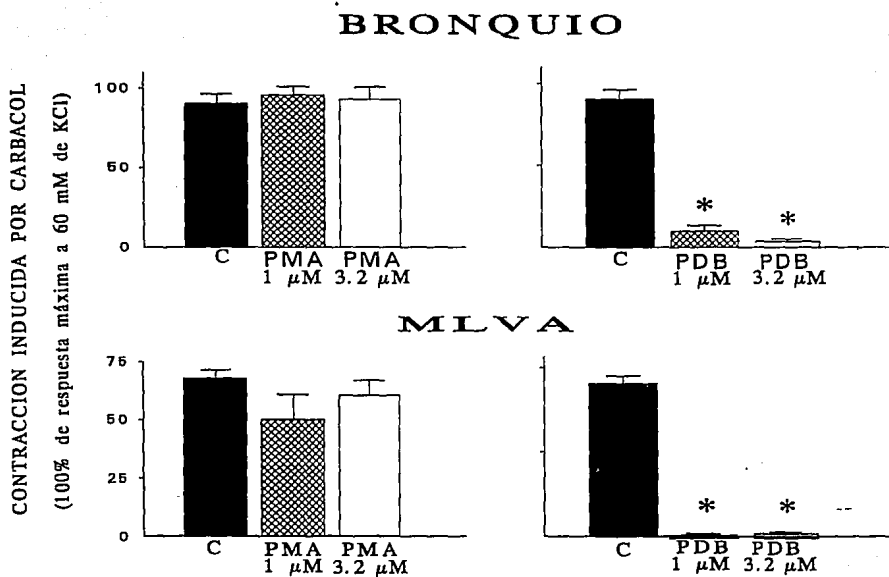


Figura 7. Efecto de la incubación durante 1 hora con los ésteres de forbol PMA (izquierda) y PDB (derecha) en la contracción producida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} en las preparaciones de MLVA ($n=6$) y bronquio ($n=6$). * Diferencias significativas ($p < 0.01$) con respecto al grupo control (C).

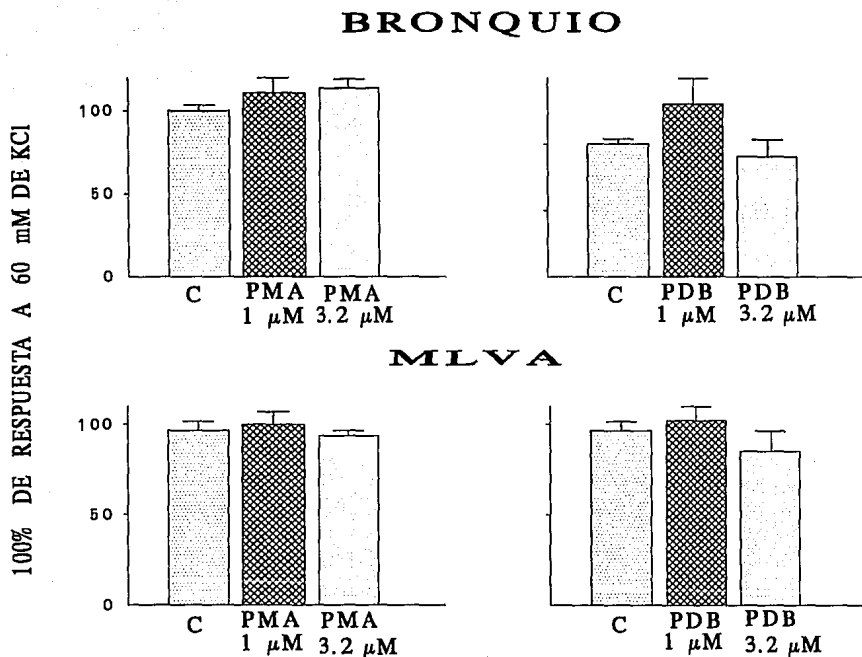


Figura 8. Respuesta de contracción producida por KCL 60 mM en un medio con Ca^{2+} posterior a la estimulación con carbacol en un medio sin Ca^{2+} en las preparaciones de MLVA (n=6) y bronquio (n=6) previamente incubadas con ésteres de forbol PMA (izquierda) y PDB (derecha). C=control.

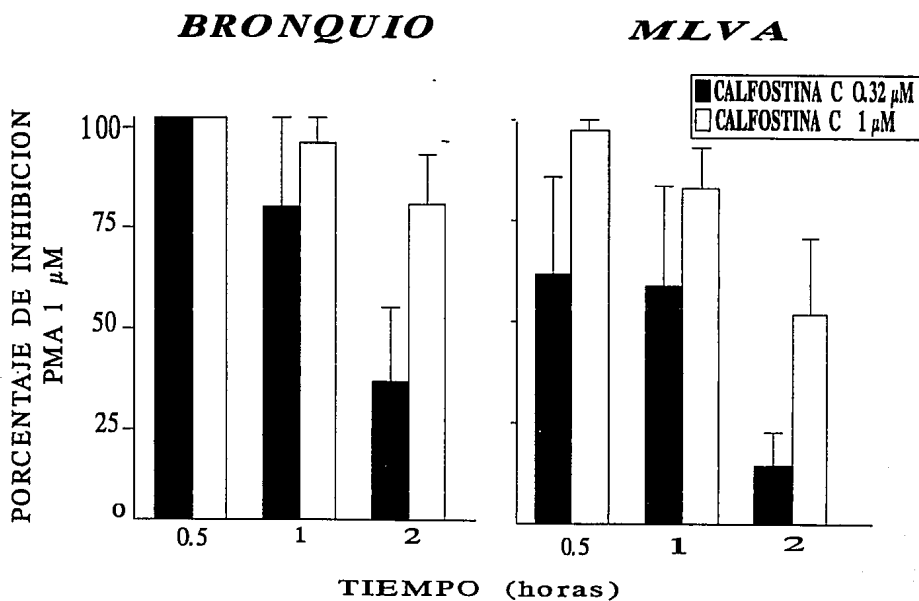


Figura 9. Curso temporal de la inhibición inducida por calfofostina C sobre la respuesta de contracción producida por PMA 1 μM en las preparaciones de bronquio (n=6) y MLVA (n=6).

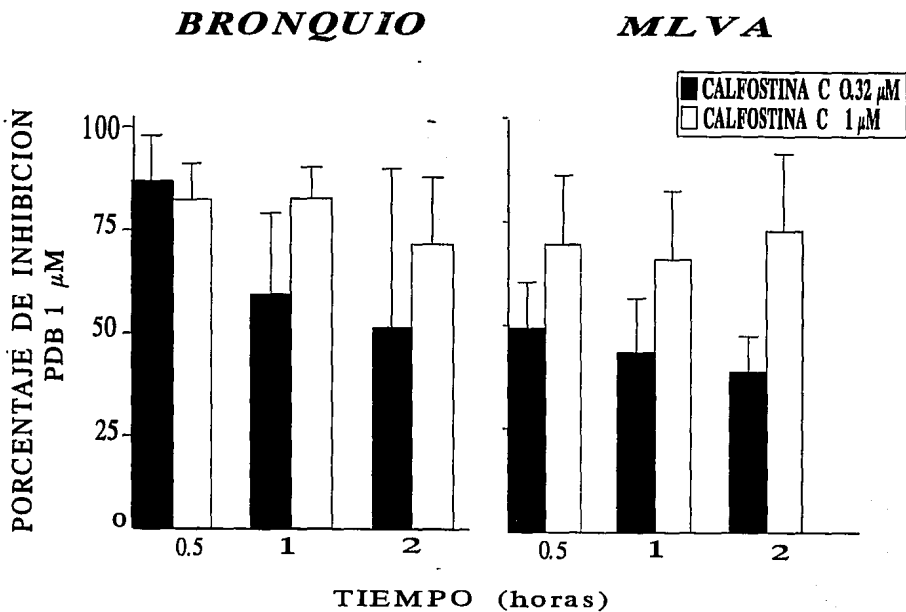


Figura 10. Curso temporal de la inhibición inducida por calfofistina C sobre la respuesta de contracción producida por PDB 1 μ M en las preparaciones de bronquio ($n=4$) y MLVA ($n=4$).

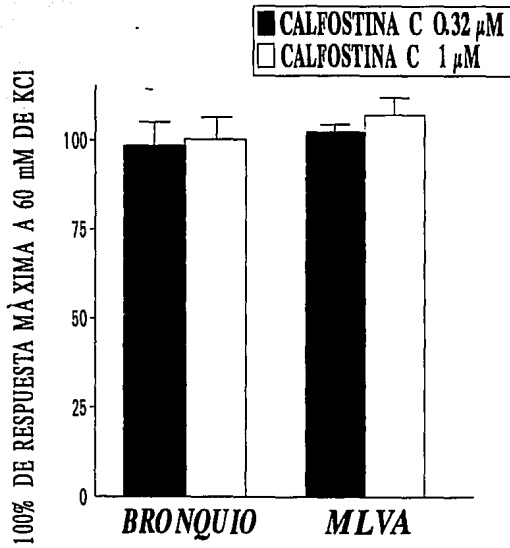


Figura 11. Respuesta de contracción producida por 60 mM de KCl en las preparaciones de MLVA (n=6) y bronquio (n=6) incubadas con calfofostina C.

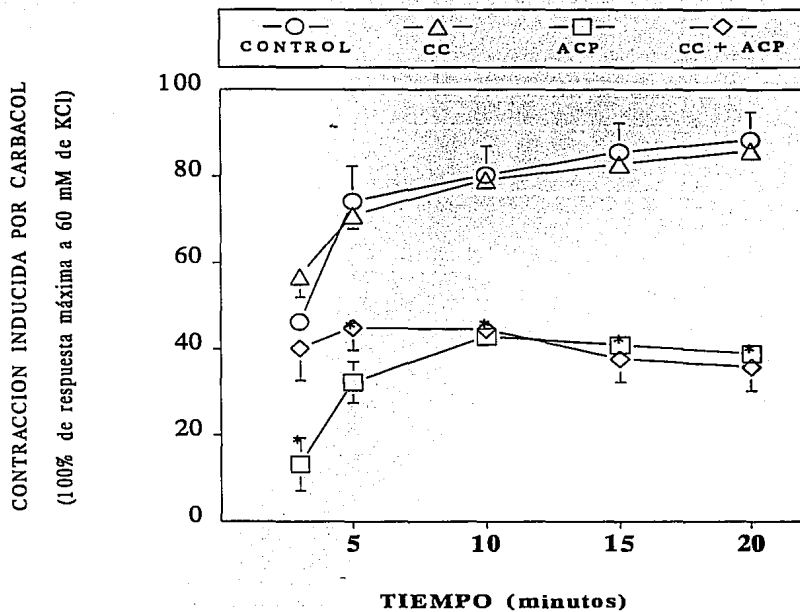


Figura 12. Curso temporal de las respuestas de contracción producida en la primera estimulación con carbacol de la preparación bronquial en un medio sin Ca^{2+} después de incubar 1 h con calyculina C, ACP ó ambos ($n=6$ en cada caso). * Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el grupos incubado con ACP y control. CC= calyculina C, ACP= ácido ciclopiazónico.

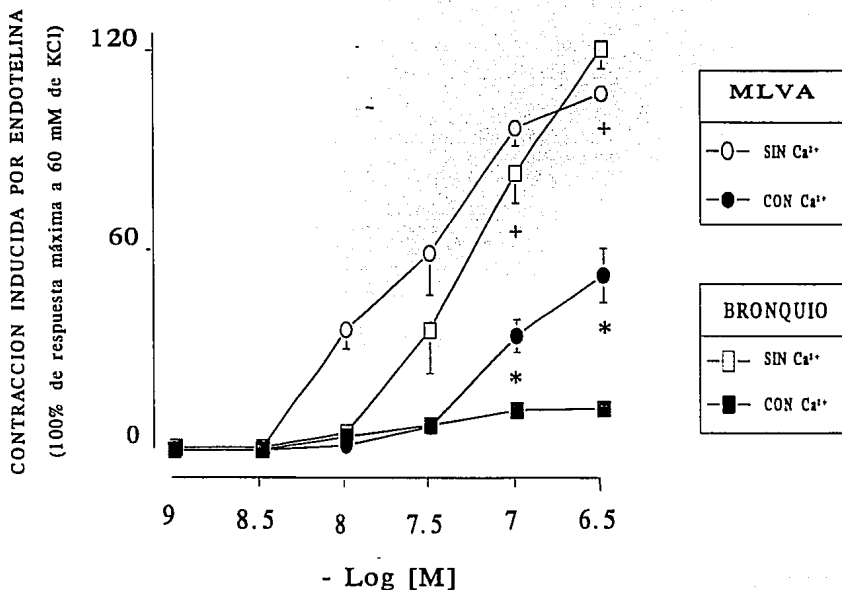


Figura 13. Curvas concentración-respuesta a endothelina en un medio con Ca²⁺ (figuras llenas) y en un medio sin Ca²⁺ (figuras vacías) (n=6 en cada caso). * Diferencias significativas (p<0.01) entre las respuestas de la preparación de MLVA y bronquio en un medio sin Ca²⁺. + Diferencias significativas (p<0.01) entre las preparaciones incubadas en un medio con Ca²⁺ y las en un medio sin Ca²⁺.

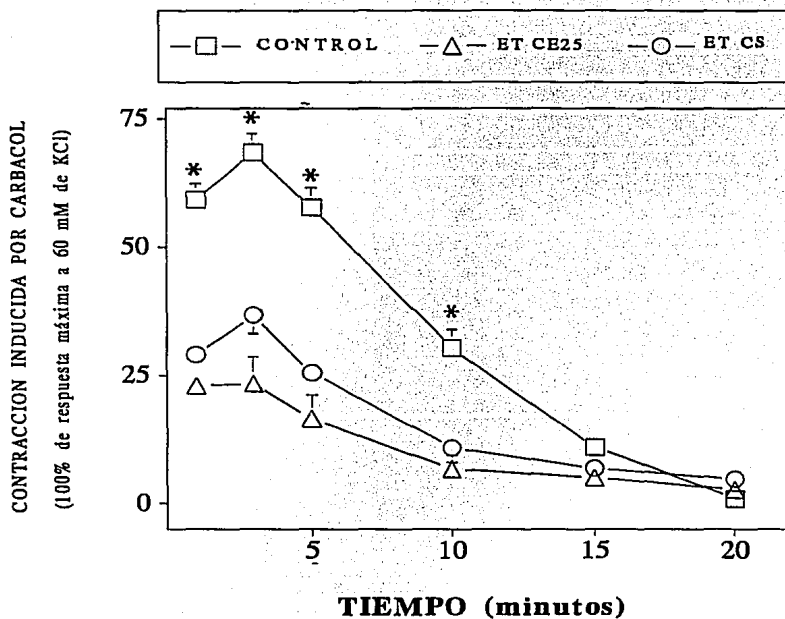


Figura 14. Curso temporal de la respuesta de contracción de la preparación de MLVA producida por la adición de carbacol en un medio sin Ca^{2+} después de la incubación durante 10 minutos con endotelina CE25 y endotelina CS ($n=6$ en cada caso). * Diferencias significativas ($p < 0.01$) en comparación al grupo control. ET=endotelina, CE25= concentración efectiva 25%, CS= concentración subumbral.

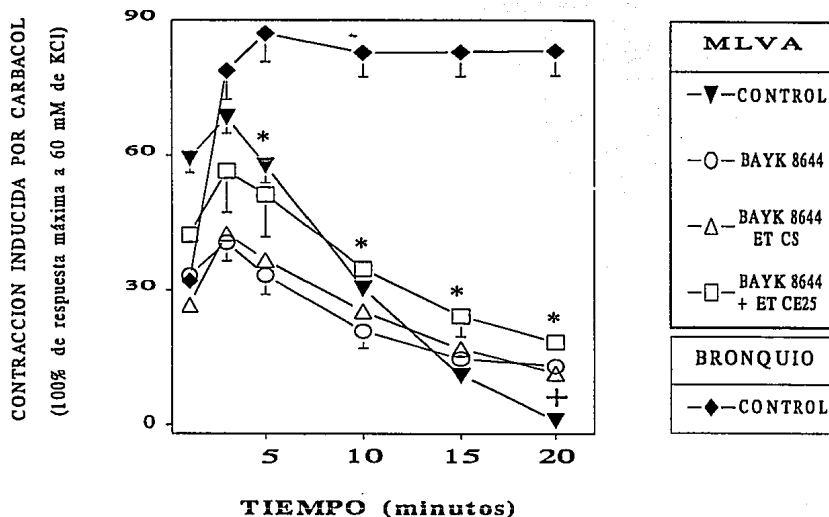


Figura 15. Curso temporal de la contracción bronquial inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} comparada con las respuestas inducidas por carbacol de las preparaciones de MLVA después de ser incubadas con BAYK 8644, BAYK 8644 más endotelina CS y BAYK 8644 más endotelina CE25 ($n=6$ en cada caso). *Diferencias significativas ($p < 0.01$) de todos los grupos vs control de la preparación bronquial. †Diferencia significativa ($p < 0.05$) de los grupos con BAYK 8644 vs control de la preparación de MLVA. ET=endotelina, CE25=concentración 25%, CS=concentración subumbral.

DISCUSIÓN

Algunos autores han propuesto que la remoción de epitelio y cartilago en el MLVA incrementa la sensibilidad a los estímulos colinérgicos al eliminar barreras de difusión al fármaco^{31,52}. Sin embargo, la contracción producida por acetilcolina en el MLVA obtenido de bronquio de perro no difiere de la respuesta observada en bronquio completo, esto es, MLVA más cartilago, epitelio y tejido conectivo⁵⁴. Asimismo bajo un estímulo eléctrico, el MLVA de perro obtenido de bronquio tiene un comportamiento de contracción similar al del MLVA obtenido de tráquea³¹. En este trabajo se encontró que la respuesta de contracción inducida por el carbacol en la preparación de MLVA obtenida de tráquea no es significativamente diferente de la respuesta obtenida en la preparación bronquial en un medio con Ca^{2+} . En cambio, en un medio sin Ca^{2+} las respuestas fueron diferentes: la contracción de la preparación de MLVA de perro además de que fue transitoria y desapareció a los 15 minutos, fue anulada con subsecuentes estimulaciones de este mismo agonista, mientras que la respuesta de la preparación bronquial siempre fue sostenida y necesitó al menos 4 estimulaciones para llegar a su mínima expresión.

La procedencia del Ca^{2+} que utilizan los diferentes agonistas contractores en el MLVA de perro, cobayo y conejo son variados e incluyen múltiples fuentes. Se ha observado que en comparación con la respuesta producida por KCl, serotonina e histamina, donde la respuesta depende del Ca^{2+} extracelular, la contracción del MLVA producida por un estímulo colinérgico necesita de una fuente adicional de Ca^{2+} , los almacenes intracelulares. Esta fuente de Ca^{2+} adicional es accesible a los agonistas colinérgicos porque la interacción con su receptor induce la producción de IP_3 , que, al actuar sobre sus receptores en el RS, libera el Ca^{2+} necesario para iniciar la contracción del tejido, mientras que la fase sostenida es mantenida por la entrada continua de este ion

desde el espacio extracelular mediante canales catiónicos inespecíficos ^{2,32,34,67,68,80}. Este mecanismo explicaría la respuesta de contracción transitoria de la preparación de MLVA observada tras la estimulación con carbacol en un medio sin Ca^{2+} , pero no la contracción sostenida de la preparación bronquial en las mismas condiciones.

Una diferencia fundamental entre los dos tipos de preparación es la presencia de estructuras adyacentes al MLVA como el cartilago, epitelio y tejido conectivo. En este contexto se ha sugerido que en alguna de estas estructuras adyacentes exista una fuente adicional de Ca^{2+} extracelular para la contracción sostenida del MLVA en un medio sin Ca^{2+} . En 1983 Foster y colaboradores ¹⁶ postularon que el cartilago de las vías aéreas de cobayo podía captar $^{45}\text{Ca}^{2+}$ del medio. Estudios subsecuentes postularon que el cartilago era la fuente de Ca^{2+} para la contracción cuando era estimulado por un agonista colinérgico en un medio sin Ca^{2+} ^{24,67,68}. Desde entonces y hasta la fecha existe un consenso general de que para los estudios que se realicen en un medio sin Ca^{2+} , las preparaciones de MLVA deben ser empleadas sin cartilago, ya que la presencia de este tejido podría alterar los resultados del experimento. No obstante, recientemente se ha descartado tanto la participación del cartilago como de otra estructura adyacente al MLVA como fuente de Ca^{2+} para la contracción sostenida en un medio sin Ca^{2+} ^{53,54}.

Se ha sugerido que la fuente de Ca^{2+} para la contracción sostenida del bronquio de perro en un medio sin Ca^{2+} inducida por un estímulo colinérgico proviene de dos almacenes del MLVA, uno el RS y el otro membranar sensible a altas concentraciones de EGTA, posiblemente las caveolas ^{12,54}. En este sentido, también se ha propuesto que durante la contracción bronquial sostenida el Ca^{2+} liberado de estos almacenes por la estimulación colinérgica es reciclado entre estos almacenes a través de los canales tipo L^{54} en lugar de ser expulsado hacia el líquido extracelular por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ o la bomba de Ca^{2+} membranar ^{7,40,49}.

El mecanismo de reutilización o reciclado de Ca^{2+} intracelular fue propuesto recientemente por Montañó y colaboradores ^{53,54} como el responsable de la contracción sostenida del MLVA inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} . Sin embargo, se ha visto que el estímulo colinérgico por si mismo no puede generar el reciclado de este ion en las preparaciones de MLVA ⁵⁴. Creemos que existen uno o varios factores humorales en alguna estructura de la preparación bronquial que modulan el reciclado de Ca^{2+} intracelular. Un fuerte candidato como factor podría ser la endotelina, péptido recientemente descubierto en endotelio vascular y localizado en epitelio bronquial ^{50,97}, conocida hasta ahora como el más potente broncoconstrictor ^{26,50,91} y probable modulador de los canales tipo L ^{26,44,72,76,91,97}.

Se sabe que la respuesta de contracción inducida por la endotelina es dependiente de la activación de la CCP ^{38,62,70,77,87}. Por lo tanto para evaluar la participación de la endotelina en la contracción bronquial sostenida en un medio sin Ca^{2+} inducida por un estímulo colinérgico, decidimos determinar primero el papel de la CCP en esta respuesta mediante la utilización de los ésteres de forbol PMA y PDB, conocidos activadores de la CCP ^{4,36,58,59,75,79,89,96}.

Existen cada vez más evidencias que indican que los mecanismos que desencadenan los ésteres de forbol para contraer al músculo liso dependen del tipo de tejido. Por ejemplo, se ha visto que en el MLVA de cobayo y bovino la contracción producida por los ésteres de forbol necesita la entrada de Ca^{2+} a la célula mediante la apertura de los canales tipo L inducida por despolarización de la membrana ^{2,37,51}. En contraste en el músculo liso vascular de ratas, cerdos y bovinos, se ha encontrado que la contracción inducida por el PDB y PMA no depende de la entrada de Ca^{2+} a la célula ^{19,79} ni de la activación de los canales tipo L ⁵.

Hemos observado que la respuesta de contracción producida por la administración

de PMA, prototipo de la familia de los ésteres de forbol, y de PDB para las preparaciones de MLVA y bronquio de perro fue sostenida y progresiva como la que previamente se había obtenido en el músculo liso vascular de conejo y MLVA de cobayo ^{2,4,15}. La respuesta máxima para ambas preparaciones inducida por el PMA y PDB se alcanzó alrededor de las 3 horas, a diferencia de lo que se ha visto en MLVA de bovino, donde la respuesta máxima para estos ésteres de forbol se alcanzó a los 90 minutos ³⁷. No obstante, si hubo diferencias sustanciales en el tipo de respuesta producida entre los dos tipos de éster de forbol que utilizamos. El PDB produjo una contracción de mayor magnitud que el PMA en ambas preparaciones, hecho que ya se había observado anteriormente en el MLVA de conejo ⁷³.

Se ha visto que la preincubación con PDB bloquea la contracción del MLVA de cerdo ² y de perro (este estudio) producida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} . La respuesta inhibitoria producida por el PDB puede ser atribuida a la fosforilación de receptores como en el caso del receptor α_1 -adrenérgico de aorta de conejo ⁹², y probablemente la inhibición de la respuesta colinérgica en un medio sin Ca^{2+} , que hemos observado en nuestras preparaciones, se deba a una inhibición de los receptores sensibles a carbacol. Sin embargo, Bazan y colaboradores ⁴ sugirieron que los efectos producidos por el PDB en aorta de conejo son producidos por la activación de la CCP y no por inactivación de receptores. Por otro lado, se ha observado que el PDB y el PMA inhiben la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares del MLVA de cerdo y perro al evitar la producción de IP_3 ^{2,39}. En este contexto, nosotros observamos que la presencia de PMA no modificó la respuesta producida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} . Sin embargo el PDB anuló completamente las contracciones sostenida y transitoria inducidas por carbacol en un medio sin Ca^{2+} .

En un estudio previo se determinó que la incubación con PMA en células de MLVA

de perro inhibió la liberación de Ca^{2+} intracelular producido por la histamina, probablemente por que este agonista libera Ca^{2+} mediante la activación de la CCP³⁹. Sin embargo, la ausencia de efecto del PMA sobre la contracción sostenida y transitoria indica que probablemente la producción de IP_3 inducida por el carbacol no es mediante la activación de la CCP, como en el caso de la histamina, sino que es producido directamente por la hidrólisis de fosfoinositoles mediante la activación de la fosfolipasa C. No obstante, se preguntaría por qué el PDB, que también es un activador de la CCP, bloqueó totalmente tanto la contracción sostenida como transitoria en ambas preparaciones en un medio sin Ca^{2+} . Una posible explicación a este fenómeno pudiera ser que el PDB estuviera inhibiendo la formación de IP_3 a través de una vía independiente de la CCP. Por todo lo anterior podríamos especular que la contracción bronquial sostenida inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} se debe a la liberación de Ca^{2+} generada por el IP_3 , hipótesis que nos proponemos evaluar en un futuro con más profundidad.

Es conocido que la CCP tiene dos dominios, el regulador y el catalítico. La mayoría de los inhibidores de la CCP como la esfingosina, la quercetina, el H-7 y la estaurosporina se unen principalmente al dominio catalítico de la CCP para inducir sus efectos inhibitorios. Se sabe que este dominio catalítico es común de otras cinasas de proteínas, por lo cual la actividad de estos inhibidores no es específica⁵⁸. Recientemente se ha descubierto una sustancia conocida como calfofina C que tiene alta especificidad de inhibición a la CCP al bloquear el sitio regulador de esta proteína⁴⁴.

La calfofina C inhibió la respuesta inicial de los ésteres de forbol en el MLVA de perro pero su efecto fue disminuyendo con el tiempo. Esta inhibición fue más evidente en las preparaciones bronquiales que en las de MLVA, y más potente con PMA que con PDB. Podemos especular que probablemente la eficacia de la calfofina C como inhibidor de la CCP se pierda con el tiempo, ya que es muy inestable a la luz. Asimismo nuestros

resultados muestran que el PDB no es un activador tan específico de la CCP, como lo es el PMA especialmente en las preparaciones de MLVA, por lo que creemos que el PDB pueda tener otros efectos además de ser activador de la CCP. Aparentemente estos efectos inespecíficos producidos por el PDB se pueden deber a la fosforilación de algunas proteínas contráctiles^{55,61,69,79,86}, aunque estas fosforilaciones no son capaces de modificar la actividad contráctil del músculo liso vascular de cerdo y MLVA de bovino^{19,86}.

Nosotros observamos que la inhibición de la CCP con calfofostina C no modificó la contracción bronquial sostenida inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} . Se ha establecido que la CCP es la responsable de la contracción sostenida del MLVA de bovino en un medio con Ca^{2+} ⁶⁴. Sin embargo, nuestros resultados con calfofostina C confirman que la activación de esta proteína no está involucrada en la movilización del Ca^{2+} celular inducida por carbacol para llevar a cabo la contracción bronquial sostenida en un medio sin Ca^{2+} .

La administración del ACP, inhibidor de la bomba de Ca^{2+} ^{41,74}, disminuyó la magnitud de la respuesta de contracción sostenida de la preparación bronquial producida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} . Estos resultados refuerzan la hipótesis de que el Ca^{2+} necesario para llevar a cabo la respuesta sostenida en un medio sin Ca^{2+} proviene de los almacenes intracelulares y no de fuentes extracelulares.

Nuestros resultados indican que la inhibición simultánea de la CCP y de la bomba de Ca^{2+} del RS facilita la liberación de Ca^{2+} de la fase inicial de la contracción producida con carbacol. Proponemos que, aunque hemos sugerido que la CCP no participa en la contracción bronquial sostenida bronquial, sí participa en la inhibición del acceso del Ca^{2+} de los almacenes sensibles a la presencia de EGTA de la membrana plasmática que no fueron vaciados totalmente con ACP⁵⁴, posiblemente de las caveolas¹².

Por otro lado, se ha observado que en músculo liso vascular de rata la activación

de la CCP con PMA no modifica la respuesta inducida con endotelina ^{30,77}, pero la presencia de PDB decrementa la respuesta de este péptido; por lo que se ha propuesto que la respuesta producida por endotelina es regulada por alguna proteína diferente a la CCP, pero sensible a los mecanismos que desencadena el PDB ³⁰.

Se ha postulado que el papel de la endotelina en la contracción del músculo liso es incrementar la sensibilidad de los mecanismos de movilización de Ca^{2+} intracelular ⁴³. Nuestros resultados muestran que la respuesta inducida por endotelina en el MLVA es dependiente del Ca^{2+} extracelular ya que, en un medio sin Ca^{2+} , la endotelina sólo produce una mínima respuesta y, además, la contracción producida por este péptido fue transitoria pero de mayor duración que la producida en las mismas condiciones con carbacol (datos no mostrados). Por otro lado, en la preparación bronquial se observó que la contracción inducida por endotelina requiere tanto de Ca^{2+} extracelular como intracelular.

Se ha observado que la potencia de la endotelina depende del tejido y de la especie debido a la variabilidad de receptores a este péptido. Hasta ahora se conocen dos tipos de receptores a endotelina en las células de MLVA de cobayo y rata, el ET_A y el ET_B . Estos receptores coexisten en la misma célula pero se encuentran distribuidos en diferente proporción ^{3,27,29}. La contracción inducida por endotelina necesita la participación cooperativa de ambos receptores ²⁹, y se ha visto que la contracción producida por la estimulación de los diferentes tipos de receptores con endotelina induce contracción mediante diferentes mecanismos de transducción de señales. El receptor ET_A esta asociado con la fosfolipasa C, la generación de fosfatos de inositol y la liberación de Ca^{2+} intracelular; mientras que el receptor ET_B esta asociado con el flujo de Ca^{2+} extracelular por un canal insensible a dihidropiridinas ^{27,28}.

Un hecho sorprendente es que la fase sostenida de la contracción del MLVA de cobayo y músculo liso vascular de cerdo y rata a bajas concentraciones de endotelina

dispara los mecanismos de movilización de Ca^{2+} extracelular, mientras que a altas concentraciones, se ha observado que se lleva a cabo la liberación de Ca^{2+} intracelular^{38,72,76}. Aunque se desconoce actualmente el tipo de receptores presente en las células del MLVA de perro, nosotros observamos que, independientemente de la concentración de endotelina, la contracción de la preparación de MLVA siempre fue dependiente de Ca^{2+} extracelular, pero no así en la preparación bronquial. Una posible explicación sería la presencia de diferentes receptores a endotelina en este tejido, es decir, que en la preparación bronquial predominen los receptores ET_A , mientras que en la preparación traqueal sean los ET_B . Sin embargo esta diferencia puede deberse también a que posiblemente se esté observando el fenómeno de reciclado de Ca^{2+} como ocurrió con el carbacol.

Por otro lado encontramos que la preincubación del MLVA con endotelina, además de que no modificó la contracción transitoria inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} , produjo una reducción de esta respuesta probablemente porque ambos agonistas utilizan mecanismos similares para inducir contracción. Estos resultados sugieren que este péptido no está involucrado en la contracción sostenida inducida por carbacol en un medio sin Ca^{2+} .

La presencia de un agonista de los canales tipo L, el BAYK 8644, en las preparaciones de MLVA provocó que la respuesta fuera ligeramente sostenida en comparación con el control, pero no reprodujo la contracción sostenida observada en las preparaciones bronquiales.

Previamente se había determinado la participación de los canales tipo L en la contracción sostenida del bronquio de perro en un medio sin Ca^{2+} al inhibir con nifedipina la respuesta sostenida^{53,54}, lo cual sugiere que no basta activar estos canales para reproducir la contracción sostenida, sino que probablemente estén involucrados otros

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

factores.

En **conclusión** los resultados de este estudio demuestran que:

1. La **endotelina** no es el **factor endógeno** responsable de este fenómeno.
2. La **CCP** tampoco participa en esta **contracción sostenida**
3. La **contracción sostenida** inducida por **carbacol** en un medio sin **Ca²⁺** es probablemente un fenómeno dependiente de **IP₃**.

REFERENCIAS

1. **Al-Hassani M.H., J.G. García y S.J. Gunst** (1993) Different Ca^{2+} Mobilization by Muscarinic Agonist in Tracheal Smooth Muscle *Am. J. Physiol.* 264 (*Lung Cell. Mol. Physiol.* 8):L53-L59.
2. **Baba K., C.B. Baron y R.J. Coburn** (1989) Phorbol Ester Effects on Coupling Mechanisms During Cholinergic Contraction on Swine Traqueal Smooth Muscle. *J.Physiol.* 412:23-42.
3. **Batistini B., M. Germain, A. Fournier y P. Sirois** (1993) Structure-Activity Relationships of ET-1 and Selected Analogues in the Isolated Guinea Pig Trachea: Evidence for the Existence of Different ET_B receptors subtypes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22(supl. 8):219-224.
4. **Bazan E., A.K. Campbell y R.M. Rapoport** (1993) Effects of Phorbol Esters on Contraction and Protein Kinase C Activation in Rabbit Aorta. *Life Sci.* 54:29-33
5. **Boonen H.C.M. y J.G.R. De Mey** (1991) Effects of a Phorbol Ester and Staurosporine on Electro- and Pharmacomechanical Coupling in a Resistance Artery. *Eur. J. Pharmacol.* 202:25-32.
6. **Bourreau J.P., A.P. Abela, C.Y. Kwan y E.E. Daniel** (1991) Refilling of Ach-Sensitive Internal Ca^{2+} Store Directly Involves a Dihydropyridine Sensitive Ca^{2+} -Channel in Dog Trachea. *Am. J. Physiol.* (Cell Physiol. 30): C497-C505.

7. **Carafoli E. y T. Stauffer** (1994) The Plasma Membrane Calcium Pump: Functional Domains, Regulation of the Activity, and Tissue Specificity of Isoform Expression. *J. Neurobiol.* 25(3):312-324.
8. **Castagna M., Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa y Y. Nishizuka** (1982) Direct Activation of Calcium-Activated, Phospholipid-Dependent Protein Kinase by Tumor-Promoting Phorbol Esters. *J. Biol. Chem.* 257(13): 7847-7851.
9. **Chabrier P.E., M. Auguet, P. Roubert, M.O. Lonchamp, V. Gillard, J-M. Guillon, S. Delaflotte y P. Braquet** (1989) Vascular Mechanism of Action of Endothelin-1: Effect of Ca^{2+} Antagonists. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 13(Suppl 5), s32.
10. **Cheung W.Y.** (1980) Calmodulin Plays a Pivotal Role in Cellular Regulation. *Science* 207:19-27.
11. **Dale M.M. y A. W. Obiame** (1987) 4 β -PDBu Contracts Parenchymal Strip and Synergises with Raised Cytosolic Calcium. *Eur. J. Pharmacol.* 141:23-32.
12. **Debbas G., L. Hoffman, E.J. Landon y L. Hurwitz** (1975) Electron Microscopic Localization of Calcium in Vascular Smooth Muscle. *Anat. Rec.* 182:447-472
13. **Duncan R.A., J.J. Krzanowski, J.S. Davis, J.B. Polson, R.G. Coffey, T. Shimoda y A. Szentivanyi** (1987) Poliphosphoinositide Metabolism in Canine Smooth Muscle (CTSM) in Response to a Cholinergic Stimulus. *Biochem. Pharmacol.* 36(3):307-310.

14. **Filep J.G., B. Battistini y P. Sirois** (1991) Pharmacological Modulation of Endothelin- Induced Contraction of Guinea-Pig Isolated Airways and Thromboxane Release. *Br. J. Pharmacol.* 103:1633-1640.
15. **Forder J., A. Scriabine y H. Rasmussen** (1985) Plasma Membrane Calcium Flux, Protein Kinase C Activation and Smooth Muscle Contraction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 235(2):267-273.
16. **Foster R.W., R.C. Small y A.H. Weston** (1983) The Spasmogenic Action of Potassium Chloride in Guinea-Pig Trachealis. *Br. J. Pharmacol.* 80:553-559.
17. **Fujimoto T., S. Nakade, A. Miyawaki, K. Mikoshiba y K. Ogawa** (1992) Localization of Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor-like Protein in Plasmalemma Caveolae. *J. Cell Biol.* 119(6):1507-1513.
18. **Fujimoto T.** (1993) Calcium Pump of the Plasma Membrane is Localized in Caveolae. *J. Cell Biol.* 120(5):1147-1157.
19. **Fulginiti III J., H.A. Singer y R.S. Moreland** (1993) Phorbol Ester-Induced Contractions of Swine Carotid Artery are Supported by Slowly Cycling Crossbridges which are not Dependent on Calcium or myosin light Chain Phosphorylation. *J. Vasc. Res.* 10:315-322.

20. **Gabella G.** (1981) Structure of Smooth Muscles. *En: Smooth Muscle: An Assessment of Current Knowledge*, editores: E. Bulbring, A.F. Brading, A.W. Jones y T. Tomita. Edward, Arnold, Londres pp. 1-46.
21. **Grégoire G., G. Loirand y P. Pacaud** (1993) Ca^{2+} and Sr^{2+} Entry Induced Ca^{2+} Release from the Intracellular Ca^{2+} Store in Smooth Muscle Cells of Rat Portal Vein. *J. Physiol.* 472:483-500.
22. **Griendling K.K., S.E. Rittenhouse, T.A. Brock, L.S. Ekstein, M.A. Gimbrone y R.W. Alexander** (1986) Sustained Diacylglycerol Formation from Inositol Phospholipids in Angiotensin II-Stimulated Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* 261:5901-5906.
23. **Guan Y.Y., C.Y. Kwan y E.E. Daniel** (1988) The Effects of EGTA on Vascular Smooth Muscle Contractility in Calcium-Free Medium. *Can J. Physiol. Pharmacol.* 66:1053-1056.
24. **Gupta P., A. Markham y M. Morgan** (1991) Ca^{2+} Ion Sequestration by Guinea-Pig Tracheal Cartilage: Its Influence on Trachealis Reactivity to KCl. *Br. J. Pharmacol.* 104:123-127.
25. **Haak J.A. y R.L. Rosenberg** (1994) Calcium-Dependent Inactivation of L-Type Calcium Channels in Planar Bilayers. *Biophys. J.* 66:1051-1060.

26. **Hay D.W.P., W.C. Hubbard y B.J. Undem** (1993) Endothelin- Induced Contraction and Mediator Release in Human Bronchus. *Br. J. Pharmacol.* 110:392-398.
27. **Henry P.J.** (1993) Endothelin-1 (ET-1) Induced Contractions in Rat Isolated Trachea: Involvement of ET_A and ET_B Receptors and Multiple Signal Transduction Systems. *Br. J. Pharmacol.*
28. **Hu S., H.S. Kim, R.W. Lappe y R.L. Webb** (1993) Coupling of Endothelin Receptors to Ion Channels in Rat Glomerular Mesangial Cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22(Supl. 8):S149-S153.
29. **Inui T., A.F. James, Y. Fujitani, M. Takimoto, T. Okada, T. Yamamura y Y. Urade** (1994) ETA and ETB Receptors on Single Smooth Muscle Cells Cooperate in Mediating Guinea Pig Tracheal Contraction. *Am. J. Physiol.* 266 (*Lung Cell. Mol. Physiol.* 10): L113-L124.
30. **Itoh H., H. Higuchi, N. Hiraoka, M. Ito, T. Konishi, T. Nakano y K. Lederlis** (1991) Contraction of Rat Thoracic Aorta Strips by Endothelin-1 in the Absence of Extracellular Ca²⁺. *Br. J. Pharmacol.* 104:847-852.
31. **Jiang H. y N.L. Stephens** (1990) Contractile Properties of Bronchial Smooth Muscle with and without Cartilage. *J. Appl. Physiol.* 69(1):120-126.

32. **Kajita J. y H. Yamaguchi** (1993) Calcium Mobilization by Muscarinic Cholinergic Stimulation in Bovine Single Airway Smooth Muscle. *Am. J. Physiol.* 264 (*Lung Cell. Mol. Physiol.* 8): L496-L503.
33. **Kamishima T., M.T. Nelson y J.B. Patlak** (1992) Carbachol Modulates Voltage Sensitivity of Calcium Channels in Bronchial Smooth Muscle of Rats. *Am. J. Physiol.* 263(*Cell Physiol.* 32):C69-C77.
34. **Kannan M.S., C. Davis, A.R.C. Ladenius y L. Kannan** (1986) Agonist Interactions at the Calcium Pools in Skinned and Unskinned Canine Tracheal Smooth Muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65:1780-1787.
35. **Khalil R.A. y C. van Breemen** (1988) Sustained Contraction of Vascular Smooth Muscle: Calcium Influx or C-Kinase Activation?. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 244(2):537-542.
36. **Kikkawa U., Y. Takai, Y. Tanaka, R. Miyake y Y. Nishizuka** (1983) Protein Kinase C as a Possible Receptor Protein of Tumor-Promoting Phorbol Esters. *J. Biol. Chem.* 258(19):11442-11445.
37. **Knox A.J., D.R. Baldwin, E.J. Cragoe y P. Ajao** (1993) The Effect of sodium Transport and Calcium Channel Inhibitors on Phorbol Ester-Induced Contraction of Bovine Airway Smooth Muscle. *Pulmonary Pharmacol.* 6:241-246.

38. Kodama M., H. Kanaide, S. Abe, K. Hirano, H. Kai y M. Nakamura (1989) Endothelin-Induced Ca-independent Contraction of the Porcine Coronary Artery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160(3):1302-1308
39. Kotlikoff M.I., R.K. Murray y E.E. Reynolds (1987) Histamine-Induced Calcium Release and Phorbol Antagonism in Cultured Airway Smooth Muscle Cells. *Am. J. Physiol.* 253 (Cell Physiol. 22): C561-C566.
40. Lipp P. y E. Niggli (1993) Microscopic Spiral Waves Reveal Positive Feedback in Subcellular Calcium Signaling. *Biophys. J.* 65:2272-2276
41. Low A.M., C.Y. Kwan y E.E. Daniel (1992) Evidence for Two Types of Internal Ca^{2+} Stores in Canine Mesenteric Artery with Different Refilling Mechanisms. *Am. J. Physiol.* 262 (Hearth Circ. Physiol. 31): H31-H37.
42. Macquin-Mavier I., M. Levame, N. Istin y A. Harf (1989) Mechanisms of Endothelin-Mediated Bronchoconstriction in the Guinea Pig. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250(2):740-745.
43. Marsault R, P. Vigne y C. Frelin (1990) The Effect of Extracellular Calcium on the Contractile Action of Endothelin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171(1):301-305.
44. Marsden P.A., N.R. Danthuluri, B.M. Brenner, B.J. Ballermann y T.A. Brock (1989) Endothelin Action on Vascular Smooth Muscle Involves Inositol Triphosphate and Calcium Mobilization *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158(1):86-93.

45. **Marthan R., J.P. Savineau y J. Mironeau** (1987) Acetylcholine-Induced Contraction in Human Isolated Bronchial Smooth Muscle: Role of an Intracellular Calcium Store. *Resp. Physiol.* 127-135
46. **Matsuda H., Beppu S., Ohmori F. y K. Miyatake** (1993) Different Modes of Endothelin-1 Action in Pressor Response In Vivo and in Pulmonary Parenchymal Contraction In vitro in Guinea Pig. *Prostaglandins* 46:476-482.
47. **Mattoli S., M. Soloperto, M. Mezzetti y A. Fasoli** (1991) Mechanisms of Calcium Mobilization and Phosphoinositide Hydrolysis in Human Bronchial Smooth Muscle Cells by Endothelin 1. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 5:424-430.
48. **Mauger J.P., J.P. Lièvremon, F. Piétri-Rouxel, M. Hilly y J.F. Coquil** (1994) The Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor: Kinetic Properties and Regulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 98:133-139.
49. **McCarron J.G., J.V. Walsh y F.S. Fay** (1994) Sodium/Calcium Exchange Regulates Cytoplasmic Calcium in Smooth Muscle. *Pflügers Arch.* 426:199-205.
50. **McKay K.O., J.L. Black y C.L. Armour** (1991) The Mechanism of Action of Endothelin in Human Lung. *Br. J. Pharmacol.* 102:422-428.
51. **Menkes H., J.M. Baraban y S.H. Snyder** (1986) Protein Kinase C Regulates Smooth Muscle Tension in Guinea-Pig Trachea and Ileum. *Eur. J. Pharmacol.* 122:19-27.

52. **Mitchell H.W. y M.P. Sparrow** (1994) Increased Responsiveness to Cholinergic Stimulation of Small Compared to Large Diameter Cartilaginous Bronchi. *Eur. Respir. J.* 7:298-305.
53. **Montaño L.M., G.L. Jones, P.M. Ó'Byrne y E.E. Daniel** (1993) Effect of Ozone Exposure *in vivo* on Response of Bronchial Rings *in vitro*: Role of Intracellular Ca^{2+} . *J. Appl. Physiol.* 75(3):1315-1322.
54. **Montaño L.M., E.E. Daniel y C. Barajas-López** (1994) Bronchial Sustained Contraction in Ca^{2+} Free Medium: Role of Cartilage as a Source of Ca^{2+} and Recycling on Intracellular Ca^{2+} . *Am. J. Appl. Physiol.* (en prensa)
55. **Moussavi R.S., C.A. Kelley y R.S. Adelstein** (1993) Phosphorylation of Vertebrate Nonmuscle and Smooth Muscle Myosin Heavy Chains and Light Chains. *Mol. Cell. Biochem.* 127/128:219-227.
56. **Mugrage B., J. Moliterni, L. Robinson, R.L. Webb, S.S. Shetty, K.E. Lipson, M.H. Chin, R. Neale y C. Cioffi** (1993) CGS 27830, A Potent Nonpeptide Endothelin Receptor Antagonist. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 3(10):2099-2104.
57. **Murakami K. y A. Routtenberg** (1985) Direct Activation of Purified Protein Kinase C by Unsaturated Fatty Acids (Oleate and Arachidonate) in the Absence of Phospholipids and Ca^{2+} . *FEBS Letts.* 192(2):189-193.

58. Nakadate T., AY. Jeng y P.M. Blumberg (1988) Comparison of Protein Kinase C Functional Assays to Clarify Mechanisms of Inhibitor Action. *Biochem. Pharmacol.* 37(8):1541-1545.
59. Niedel J.E., L.J. Kuhn y G.R. Vanderbark (1983) Phorbol Diester Receptor Copurifies with Protein Kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:36-40
60. Ninomiya H., Y. Uchida, M. Saotome, A. Nomura, H. Ohse, H. Matsumoto, F. Hirata y S. Hasegawa (1992) Endothelins Constrict Guinea Pig Tracheas by Multiple Mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 262(2):570-576.
61. Nishikawa M., J.R. Sellers, R.S. Adelstein y H. Hidaka (1984) Protein Kinase C Modulates *in Vitro* Phosphorylation of the Smooth Muscle Heavy Meromyosin by Myosin Light Chain Kinase. *J. Biol. Chem.* 254(14):8808-8814.
62. Nishikawa M., S. Shirakawa y R.S. Adelstein (1985) Phosphorilation of Smooth Muscle Myosin Light Chain Kinase by Protein Kinase C. *J. Biol. Chem.* 260(15):8978-8983.
63. Nishizuka Y.(1984) The Role of Protein Kinase C in Cell Surface Signal Transduction and Tumour Promotion. *Nature* 308:693-697.
64. Park S. y H. Rasmussen (1985) Activation of Tracheal Smooth Muscle Contraction and Synergism between Ca^{2+} and activators of Protein Kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:8835-8839.

65. Putney J.W. Jr. (1986) A Model for Receptor-Regulated Calcium Entry. *Cell Calcium* 7:1
67. Raeburn D., I.W. Rodger, W.P.H. Douglas y J.S. Fedan (1986) The Dependence of Airway Smooth Muscle on Extracellular Ca^{2+} for Contraction is Influenced by the Presence of Cartilage. *Life Sci.* 38:1499-1505.
68. Raeburn D., D.W.P. Hay, S.G. Farmer y J.S. Fedan (1987) Influence of Cartilage on Reactivity and on the Effectiveness of Verapamil in Guinea pig Isolated Airway Smooth Muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 242(2):450-454.
69. Rembold C.M. y R.A. Murphy (1988) $[Ca^{2+}]$ -Dependent Myosin Phosphorylation in Phorbol Diester Stimulated Smooth Muscle Contraction. *Am. J. Physiol.* 255(Cell Physiol. 24): C719-C723.
70. Resink T.J., T. Scott-Burden y F.R. Buhler (1988) Endothelin Stimulates Phospholipase C in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157:1360.
71. Rodger W. (1985) Excitation-Contraction Coupling and Uncoupling in Airway Smooth Muscle. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 20:255S-266S.
72. Sarriá B., E. Naline, E. Morcillo, J. Cortijo, J. Esplagues y C. Advenier (1990) Calcium Dependence of the Contraction Produced by Endothelin (ET-1) in Isolated Guinea-Pig Trachea. *Europ. J. Pharmacol.* 187:445-453.

73. **Schramm C.M. y M.M. Grunstein** (1989) Mechanisms of Protein Kinase C Regulation of Airway Contractility. *J. Appl. Physiol.* 66(4):1935-1941.
74. **Seidler N.W., I. Jona, M. Vegh y A. Martonosi** (1989) Cyclopiazonic Acid is a Specific Inhibitor of the Ca^{2+} -ATPase of Sarcoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* 264(30):17816-17823.
75. **Sharkey N.A., K.L. Leach y P.M. Blumberg** (1984) Competitive Inhibition by Diacylglycerol of Specific Phorbol Ester Binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:607-610.
76. **Shimamoto H., C.Y. Kwan y E.E. Daniel** (1992a) Pharmacological Assessment of Ca^{2+} Dependence of Endothelin-1-Induced Response in Rat Aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 216:225-233.
77. **Shimamoto H., Y. Shimamoto, C. Kwan y E.E. Daniel** (1992b) Participation of Protein Kinase C in Endothelin-1-Induced Contraction in Rat Aorta: Studies with a New Tool, Calphostin C. *Br. J. Pharmacol.* 216:282-287.
78. **Silver P.J. y J.T. Stull** (1984) Phosphorylation of Myosin Light Chain and Phosphorylase in Tracheal Smooth Muscle in response to KCl and Carbachol. *Mol. Pharmacol.* 25:267-274.

79. **Singer H.A.** (1990) Phorbol Ester-Induced Stress and Myosin Light Chain Phosphorylation in Swine Carotid Medial Smooth Muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252(3):1068-1074.
80. **Sneyd J. y L.V. Kalachev** (1994) A Profile Analysis of Propagating Calcium Waves. *Cell Calcium* 15:289-296.
81. **Socci R., A. Chu, P. Reinach y L.G. Mészáros** (1993) *In Situ* Ca^{2+} -Induced Ca^{2+} Release from a Ryanodine-Sensitive Intracellular Ca^{2+} Store in Corneal Epithelial Cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B(4):793-797.
82. **Somlyo A.P. y B. Hoffer** (1989) Cell Calcium and its Regulation in Smooth Muscle. *FASEB J.* 3:2266-2276.
83. **Somlyo A.P. y A.V. Somlyo** (1994) Smooth Muscle: Excitation-Contraction Coupling, Contractile Regulation, and the Cross-Bridge Cycle. *Alcoholism Clin. Exp. Res.* 18:138-143.
84. **Spedding M. y R. Paoletti** (1992) Classification of Calcium Channels and the Sites of Action of Drugs Modifying Channel Function. *Pharmacol. Rev.* 44(3):363-376.
85. **Strübing C., S. Hering y H. Glossmann** (1993) Evidence for an External Location of the Dihydropyridine Agonist Receptor Site on Smooth Muscle and Skeletal Muscle Calcium Channels. *Br. J. Pharmacol.* 108:884-891.

86. Stull J.T., L. Hsu, M.G. Tansey y K.E. Kamm (1990) Myosin Light Chain Kinase Phosphorylation in Tracheal Smooth Muscle. *J. Biol. Chem.* 265(27):16683-16690.
87. Sugiura M., T. Inagami, G.M.T. Hare y J.A. Johns (1989) Endothelin Action: Inhibition by a Protein Kinase C Inhibitor and Involvement of Phosphoinositols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158(1):170-176.
88. Takai Y., A. Kishimoto, Y. Iwasa, Y. Kawahara, T. Mori y Y. Nishizuka (1979) Calcium-Dependent Activation of a Multifunctional Protein Kinase by Membrane Phospholipids. *J. Biol. Chem.* 254(10):3692-3695.
89. Tohmatsu T., H. Hattori, S. Nagao, K. Ohki y Y. Nozawa (1986) Reversal by Protein Kinase C Inhibitor of Suppressive Actions of Phorbol-12-Miristate-13-Acetate on Poliphosphoinositide Metabolism and Cytosolic Ca^{2+} Mobilization in Thrombin-Stimulated Human Platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134(2):868-875.
90. Travis J. (1993) Cell Biologists Explore "Tiny Caves". *Science* 262:1208-1209.
91. Uchida Y., H. Ninomiya, M. Saotome, A. Nomura, M. Ohtsuka, M. Yanagisawa, K. Goto, T. Masaki y S. Hasegawa (1988) Endothelin, a Novel Vasoconstrictor Peptide, as Potent Bronchoconstrictor. *Europ. J. Pharmacol.* 154:227-228.
92. Villalobos-Molina R., V. Ransanz, M.E. Torres-Márquez, E. Hong y A. García-Sáinz (1990) Contrasting Effects of Phorbol Dibutyrate and Phorbol Myristate Acetate in Rabbit Aorta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171(2):618-624.

93. **Vivaudou M.B., L.H. Clapp, J.V. Walsh y J.J. Singer** (1988) Regulation of One Type of Ca^{2+} Current in Smooth Muscle Cells by Diacylglycerol and Acetylcholine. *FASEB J.* 2:2497-2504.
94. **Vyas T.B., S.U. Mooers, S.R. Narayan, M.J. Siegman y T.M. Butler** (1994) Cross-Bridge Cycling at Rest and During Activation. *J. Biol. Chem.* 269(10):7316-7322.
95. **Wade R.G. y S.M. Sims** (1993) Muscarinic Stimulation of Tracheal Smooth Muscle Cells Activates Large-Conductance Ca^{2+} -Dependent K^{+} Channel. *Am. J. Physiol.* 265(*Cell Physiol.* 34): C658-C665.
96. **Wang S., G.W.A. Milne, M.C. Nicklaus, V.E. Marquez, J.Lee y P.M. Blumberg** (1994) Protein Kinase C. Modeling of the Binding Site and Prediction of Binding Constants. *J. Med. Chem.* 24:1326-1338.
97. **Yanagisawa M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yasaki, K. Goto y T. Masaki T.** (1988) A Novel Potent Vasoconstrictor Peptide Produced by Vascular Endothelial Cells. *Nature* 332:411.
98. **Yang C.M., Y.L. Yo, y Y.Y. Wang** (1993) Intracellular Calcium in Canine Cultured Tracheal Smooth Muscle Cells is Regulated by M_3 Muscarinic Receptors. *Br. J. Pharmacol.* 110: 983-998.