

11281

3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

CARACTERIZACION DE LOS MECANISMOS DE
MOVILIZACION DE CALCIO INTRACELULAR EN EL
MUSCULO LISO DE LAS VIAS AEREAS

TESIS CON LA CUAL
BLANCA MARGARITA BAZAN PERKINS
SUSTENTARA EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS
ORIENTACION EN FARMACOLOGIA

CIUDAD DE MEXICO.

ENERO DEL 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La presente tesis

**CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE MOVILIZACIÓN DE
CALCIO INTRACELULAR EN EL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS**

Se realizó en los Departamentos de Investigación en Asma del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Bajo la dirección del:

Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez

la asesoría de los miembros del comité tutorial:

Dr. Carlos Barajas López

Dra. María G. Campos Lara

Dr. Marco González Martínez

Dr. Agustín Guerrero Hernández

y defendida ante el Jurado formado por:

Dr. Fermín Valenzuela Gómez-Gallardo

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez

Dr. Moisés Selman Lama

Dr. Luis Vaca Domínguez

Dr. Rafael Villalobos Molina

Dr. Marco González Martínez

Financiada con apoyos de:

Fundación UNAM

CONACYT 5076A1

El Instituto Mexicano del Seguro Social

La Dirección General de Asuntos del Personal Académico DGAPA IN201995

La Coordinación General de Estudios de Posgrado, Facultad de Medicina PADEP-012304

El Programa Universitario de Investigación en Salud PUIS-UNAM 394-446/17-V-94

El Departamento de Fisiología de la Universidad de Massachusetts

DEDICATORIA

A Edgar y a mi pequeña y hermosa Mariana

A mis padres Marilyn y Sergio

A Víctor, Beto y Dale

A David Bazán, David Sánchez, Stefy y Any

Al Dr. Yamaguchi (q.e.p.d.)

A María Gracia Bellman, Angélica, Eduardo y Diego García, Lucrecia Gallegos, Jacqueline Blando, Vero López, Paty Campos, Lala y Mimi de Anda.

A los miembros del Departamento de Investigación en Asma del INER:

Jaime, José Luis, Luis, Mario, Paty, Pitis y Vero.

*Si el Señor no construye la casa,
de nada sirve que trabajen los constructores;
si el Señor no protege la Ciudad,
de nada sirve que la vigilen los centinelas.
De nada sirve trabajar de sol a sol
y comer un pan ganado con dolor,
cuando Dios lo da a sus amigos mientras duermen.*

Salmo 127.1-2

AGRADECIMIENTOS

A Dios, mi padre espiritual y principal asesor científico.

A los perritos que me dieron lo más valioso.

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

Al Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez por su disposición durante mi formación como Doctor y por su amistad.

A los Doctores María G. Campos, Carlos Barajas, Marco González, Agustín Guerrero, Fernán Valenzuela, Ignacio Camacho, Moisés Selman, Luis Vaca, Rafael Villalobos e Hiroshi Yamaguchi (†) les agradezco la orientación y las valiosas sugerencias aportadas durante el desarrollo del presente trabajo.

A Edgar por ser un excelente discipulador, asesor, amigo, técnico, colega y pareja.

A Mariana Sánchez Bazán por portarse tan bien mientras compartimos el trabajo de laboratorio.

A la Pitis, Jamito y Lala por preocuparse por mí y estar dispuestos a aconsejarme, a Vero por su inapreciable ayuda técnica y a la Paty y José Luis por su contagiante buen humor.

Al Sr. Eligio Torres y al personal de Transporte del INER por el suministro de las tráqueas de bovino, y al personal del Bioterio por su ayuda técnica.

ÍNDICE

	Página
I. LISTA DE FIGURAS.....	I
II. LISTA DE TABLAS.....	III
III. LISTA DE ABREVIATURAS.	IV
IV. RESUMEN.....	VI
V. ABSTRACT.....	VIII
INTRODUCCIÓN.....	1
1. EL Ca^{2+} EN LAS CÉLULAS DE MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS (MLVA)	2
El Ca^{2+} extracelular..	2
Entrada capacitativa de Ca^{2+}	3
El Ca^{2+} intracelular.....	4
Regulación de las $[Ca^{2+}]_i$	5
Decremento de las $[Ca^{2+}]_i$ después de retirar a los agonistas que movilizan Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS): El <i>undershoot</i> ..	6
2. LA CONTRACCIÓN DEL BRONQUIO COMPLETO Y DE LAS TIRAS DE MLVA.....	7
La contracción sostenida en el MLVA.....	7
La contracción sostenida en el MLVA en un medio sin Ca^{2+}	8
Los canales tipo L en la contracción sostenida del MLVA en un medio sin Ca^{2+}	8
HIPOTESIS.....	10
OBJETIVOS..	11
MÉTODOS.....	12
ESTUDIOS EN CÉLULAS AISLADAS DE MLVA DE BOVINO.....	12
Obtención de miocitos traqueales	12
Determinación del Ca^{2+} citosólico.	13
A) Fura-2.....	13
B) Determinación de las $[Ca^{2+}]_i$ con Fura-2	14
C) Experimentos.....	15
ESTUDIOS <i>in vitro</i> EN MLVA DE BOVINO Y PERRO.....	17
Preparación del tejido de bovino, mediciones simultáneas de contracción y Ca^{2+} intracelular	17
Preparación del tejido de perro.....	18
Contracción producida por el carbacol y la histamina en un medio sin Ca^{2+}	19
Efecto de los inhibidores de la PKC en la contracción sostenida en medio sin Ca^{2+}	21
Análisis estadístico	22
Fármacos	22
1. Acetilcolina	22
2. Ácido ciclopiazónico	23

3 Benzamil amilorida.....	23
4 Cafeína.....	24
5 Calfostina C.....	24
6 Cheliritrina.....	25
7 Estaurosporina.....	25
8. Forskolina.....	26
9. Histamina.....	26
10. Metoxiverapamil.....	27
11. Nifedipina.....	27
RESULTADOS.....	28
ESTUDIOS EN CÉLULAS AISLADAS DE ML TRAQUEAL DE BOVINO.	28
Efecto del contenido de Ca ²⁺ del RS en la basal de Ca ²⁺ citosólico.....	28
Contenido de Ca ²⁺ en el RS durante la incubación con cafeína.....	29
El <i>undershoot</i> producido después de retirar la cafeína.....	31
Efecto del Ca ²⁺ extracelular en el <i>undershoot</i>	32
Papel de los canales tipo L y el intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ en el <i>undershoot</i>	33
Efecto del magnesio, lantano y níquel en el <i>undershoot</i>	35
Efecto del contenido de Ca ²⁺ del RS en la entrada de Ca ²⁺ extracelular	38
Efecto del magnesio, lantano y níquel en la entrada de Ca ²⁺ extracelular en células con el RS vacío.....	40
ESTUDIOS <i>in vitro</i> EN EL ML TRAQUEAL DE BOVINO.....	42
Registro simultáneo de los cambios en el Ca ²⁺ citosólico y la contracción de tiras de ML de bovino.....	42
ESTUDIOS <i>in vitro</i> EN LAS TIRAS DE ML Y ANILLOS BRONQUIALES DE PERRO.....	44
Respuestas de las tiras de ML y de los anillos bronquiales al carbacol y la histamina.....	44
Efecto de la PKC en la contracción de los anillos bronquiales inducida por carbacol y por histamina en medio sin Ca ²⁺	47
DISCUSIÓN.....	48
Parte I: Regulación de las [Ca²⁺]_i en las células aisladas de MLVA.....	48
La recuperación del <i>undershoot</i>	50
Regulación de la entrada de Ca ²⁺ por el contenido de Ca ²⁺ del RS.....	53
Parte II: Almacenes membranales de Ca²⁺.....	56
PERSPECTIVAS.....	62
REFERENCIAS.....	64
ANEXO I Artículo. Involvement of different Ca²⁺ pools during the canine bronchial sustained contraction in Ca²⁺ free medium. Lack of effect of PKC inhibition.....	74
ANEXO II Artículo. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ depletion by caffeine and changes of [Ca²⁺]_i during refilling in bovine smooth muscle cells.....	75

I. LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1	Moléculas de Fura-2/AM y Fura-2 ácido..... 14
Figura 2	Molécula de carbacol 22
Figura 3	Molécula de ácido ciclopiazónico. 23
Figura 4	Molécula de benzamil amilorida..... 23
Figura 5	Molécula de cafeína..... 24
Figura 6	Molécula de calfofostina C..... 24
Figura 7	Molécula de cheleritrina..... 25
Figura 8	Molécula de estaurosporina..... 25
Figura 9	Molécula de forskolina..... 26
Figura 10	Molécula de histamina..... 26
Figura 11	Molécula de metoxiverapamil..... 27
Figura 12	Molécula de nifedipina..... 27
Figura 13	Dependencia del contenido de Ca^{2+} del RS en el decremento de las $[Ca^{2+}]_i$ basales de células aisladas de ML traqueal de bovino incubadas en medio sin Ca^{2+} 28
Figura 14	Registro original del efecto del vaciado de los almacenes de Ca^{2+} sensibles a cafeína en la respuesta carbacol en una célula aislada de ML traqueal de bovino..... 29
Figura 15	Registros originales del efecto de la cafeína y la forskolina en la respuesta de contracción inducida por KCl en tiras de ML traqueal y en la movilización de Ca^{2+} de células de ML traqueal estimuladas con carbacol. 30
Figura 16	Registro original del efecto de la cafeína en los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ de células aisladas de ML traqueal de bovino..... 31
Figura 17	Efecto del Ca^{2+} extracelular en la recuperación del <i>undershoot</i> y en la respuesta a cafeína de células aisladas de ML traqueal de bovino..... 32
Figura 18	Registro original del efecto del benzamil amilorida en el incremento de las $[Ca^{2+}]_i$ producida por la reversión del intercambiador Na^+/Ca^{2+} en células aisladas de ML traqueal de bovino. 33
Figura 19	Registro original del efecto del magnesio en el <i>undershoot</i> generado por el lavado de cafeína en células aisladas de ML traqueal de bovino 35
Figura 20	Efecto del lantano en el <i>undershoot</i> generado por el lavado de

	cafeína en células aisladas de ML traqueal de bovino	36
Figura 21	Curso temporal de efecto del níquel en la basal de $[Ca^{2+}]_i$ en una célula aislada de ML traqueal de bovino.....	37
Figura 22	Efecto del níquel en la respuesta a cafeína y el <i>undershoot</i> en células aisladas de ML traqueal de bovino.....	38
Figura 23	Efecto del contenido de Ca^{2+} del RS en la recuperación de los niveles basales de $[Ca^{2+}]_i$ en células aisladas de ML traqueal de bovino.....	39
Figura 24	Efecto del magnesio y el lantano en la entrada de Ca^{2+} extracelular después de vaciar el contenido de Ca^{2+} del RS con estimulaciones con cafeína en medio sin Ca^{2+} en células de ML traqueal de bovino	40
Figura 25	Efecto del níquel en la recuperación de los niveles basales de $[Ca^{2+}]_i$ después de incubar en medio sin Ca^{2+} a células aisladas de ML traqueal de bovino.....	41
Figura 26	Trazos representativos de las respuestas producidas por carbacol en una célula aislada y una tira de ML traqueal de bovino	42
Figura 27	Trazos representativos de las respuestas producidas por histamina en una célula aislada y una tira de ML traqueal de bovino.....	43
Figura 28	Estimulaciones repetidas con carbacol o histamina en los anillos bronquiales y en tiras de ML de perro en medio sin Ca^{2+}	44
Figura 29	Efecto del Ca^{2+} del RS en las respuestas al carbacol y la histamina, y el Ca^{2+} membranaral en las respuestas de histamina en el bronquio de perro.....	45
Figura 30	Efecto de la preincubación con nifedipina en la contracción sostenida de los anillos bronquiales inducida por histamina en medio sin Ca^{2+}	46
Figura 31	Efectos de la calfostina C, la estaurosporina y la chelentrina en la contracción sostenida de los anillos bronquiales inducida por carbacol e histamina en medio sin Ca^{2+}	47

II. LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Efecto de la estimulación sucesiva con histamina de los anillos bronquiales de perro.....	20
Tabla 2	Efecto de la preincubación de los inhibidores de la PKC en la respuesta a KCl 60 mM en medio con Ca^{2+}	21
Tabla 3	Efecto de la inhibición de los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje y de la reversión del intercambiador Na^+/Ca^{2+} en el <i>undershoot</i> generado al lavar cafeína en células de ML traqueal de bovino..	34
Tabla 4	Efecto de la inhibición del intercambiador Na^+/Ca^{2+} con benzamil amilorida en el <i>undershoot</i> generado al lavar cafeína..	34

III. LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca ²⁺] _i	Concentración de calcio libre intracelular
μM	Micromolar
ACP	Ácido ciclopiazónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Ácido desoxirribonucleasa
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclica
ATP	Adenosintrifosfato
ATPasa	Adenosintrifosfatasa
BASA	Barrera superficial amortiguadora de calcio
Ca ²⁺	Calcio
CaCl ₂	Cloruro de calcio
Cal	Calfofina C
Cch	Carbacol
CE ₅₀	Concentración efectiva 50%
Che	Chelentrina
cm	Centímetro
CO ₂	Bióxido de carbono
D600	Metoxiverapamil
DV	Canales de calcio dependientes de voltaje
EGTA	Etilen glicol-bis(β-aminoetil eter) N,N,N',N' ácidotetraacético
Fig.	Figura
Fura-2/AM	Fura-2 con grupo acetoximetilo
g	Gramos
h	Hora
His	Histamina
IC	Concentración inhibitoria
I _{CRAC}	Corriente de Ca ²⁺ activada por el vaciado del retículo sarcoplásmico (<i>Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current</i>)
IP ₃	Inositol 1,4,5 trifosfato
iv	Intravenoso
KCl	Cloruro de potasio
K _d	Constante de disociación
kDa	Kilodatos
Kg	Kilogramo
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio monobásico
KRH	Krebs-Ringer-Henseleit
M	Molar
mg	Miligramo
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado

min	Minutos
ml	Mililitro
ML	Músculo liso
MLVA	Músculo liso de las vías aéreas
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Na ⁺	Sodio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	Fosfato de sodio monobásico y monohidratado
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
Nif	Nifedipina
nM	Nanomolar
nm	Nanómetros
OR	Canales catiónicos inespecíficos operados por receptor
PDB	4-β-forbol 12,13-dibutirato
PKC	Cinasa de proteína C
PMCA	Bomba de calcio de la membrana plasmática (<i>Plasma membrane calcium ATPase</i>)
PTI	<i>Photon Technology International</i>
R	Cociente 340nm/380nm
R _{max}	Cociente 340nm/380nm en presencia de calcio saturante y ionomicina.
R _{min}	Cociente 340nm/380nm en ausencia de calcio + EGTA
RS	Retículo sarcoplásmico
s	Segundos
SERCA	Bomba de calcio del retículo sarcoplásmico (<i>Sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase</i>)
St	Estaurosporina
U	Unidades de proteína

IV. RESUMEN

El Ca^{2+} es uno de los principales mensajeros celulares de la contracción del músculo liso de las vías aéreas (MLVA). Este catión se almacena primordialmente en el retículo sarcoplásmico (RS). Recientemente se ha descrito que cuando se vacía el contenido de Ca^{2+} del RS, se induce la entrada de este catión a la célula hasta llenar el almacén. Este fenómeno es conocido como "Entrada capacitativa de Ca^{2+} ". Una maniobra que permite el vaciado del Ca^{2+} del RS en el MLVA es la adición de cafeína. Se ha observado que cuando se retira esta xantina del medio, se decreta transitoriamente la concentración de Ca^{2+} libre intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Este decremento transitorio es denominado *undershoot*. Nuestro objetivo inicial fue determinar si durante la fase de recuperación de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante el *undershoot* se producía la entrada capacitativa de Ca^{2+} en las células de MLVA. Se utilizaron células de músculo liso traqueal de bovino disgregadas por digestión enzimática. El Ca^{2+} intracelular de las células aisladas se determinó mediante la técnica de microfluorescencia utilizando Fura-2/AM como marcador fluorescente. La adición de cafeína (10 mM) produjo un incremento transitorio de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y en presencia de esta xantina el carbacol (10 μM) no indujo respuesta. Comprobamos que este bloqueo se debió principalmente a que el RS se encontraba vacío. El lavado de la cafeína indujo siempre un decremento transitorio de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$, i.e. un *undershoot*. La recuperación de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basales durante el *undershoot* fue inhibida en medio sin Ca^{2+} . Adicionalmente, el *undershoot* no fue modificado cuando las células fueron depolarizadas con alto KCl, ni cuando se inhibieron los canales tipo L con D600 (30 μM) o el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ con benzamil amilorida (25 μM), ni con la adición de lantano (200 μM) o magnesio (4 mM). Con respecto al níquel (1 mM), este metal produjo un decremento de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hasta crear un nuevo estado basal de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y del RS. En estas condiciones, el níquel inhibió la fase de recuperación de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del *undershoot*.

Por otro lado, la incubación de las células con medio sin Ca^{2+} produjo un decremento pasivo de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y fue mayor cuando se incubó previamente con cafeína (10 mM). Adicionalmente, los registros con níquel (1 mM) mostraron que, durante el reposo, en estas células se produce una importante entrada pasiva de Ca^{2+} . Después de incubar en medio sin Ca^{2+} , la reincorporación de este catión al medio de perfusión generó la recuperación de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basales, y la velocidad de esta recuperación no dependió del contenido de Ca^{2+} en el RS. Sin embargo cuando el RS se encontraba vacío, esto es cuando la célula no producía respuesta (10 min en medio sin Ca^{2+}), la recuperación fue más rápida. Esta recuperación rápida no fue inhibida con lantano (0.2 mM) ni con magnesio (1 mM) o por la despolarización de las células con alto KCl. De esta primera parte del trabajo

se sugiere que el contenido de Ca^{2+} del RS no regula la velocidad del flujo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática; sin embargo este flujo es incrementado solo cuando el RS estaba prácticamente vacío. Adicionalmente se propone que los canales involucrados en la entrada capacitativa de Ca^{2+} en estas células son insensibles al lantano y al magnesio

Con respecto a la recuperación del *undershoot*, se observó que no depende de los canales dependientes de voltaje ni del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, ni es sensible al lantano ni al magnesio pero es sensible al níquel.

En una segunda parte del proyecto, exploramos la funcionalidad de un posible almacén membranar de Ca^{2+} . Este proyecto se llevó a cabo evaluando la contracción en anillos bronquiales de perro, ya que no fue posible obtenerlos de bovino. La contracción producida en anillos de bronquios de tercera generación y en tiras de músculo liso de bronquios de primera generación de perro fueron sostenidas en medio con Ca^{2+} (2.5 mM). En medio sin Ca^{2+} se observaron dos patrones de contracción: uno sostenido en los anillos bronquiales, aunque de menor magnitud que en medio con Ca^{2+} y otro transitorio en las tiras de músculo liso. En los anillos bronquiales, observamos que después del vaciado de los almacenes sensibles a histamina (10 μM) en medio sin Ca^{2+} , el carbacol (0.42 μM) aún produjo una respuesta sostenida cercana al 50% de su respuesta inicial y fue inhibida con un bloqueador de la bomba de Ca^{2+} del RS, el ácido ciclopiazónico (10 μM , ACP). La primer contracción sostenida inducida por histamina en los anillos bronquiales en medio sin Ca^{2+} fue inhibida con nifedipina (1 μM) y por altas concentraciones de EGTA (1 mM). Ninguna de las respuestas al carbacol o la histamina en medio sin Ca^{2+} fue afectada por los inhibidores de la cinasa de proteína C (PKC), chelentrina, estaurosporina o calfofina C. Con estos resultados se concluyó que la contracción bronquial sostenida en medio sin Ca^{2+} es independiente de la actividad de la PKC, y el Ca^{2+} necesario para la respuesta inducida por carbacol proviene de dos fuentes. la sensible al ACP, el RS, y una fuente de la membrana plasmática sensible a 1 mM de EGTA, posiblemente las caveolae y el glicocalix. La histamina aparentemente sólo moviliza Ca^{2+} de la fuente de Ca^{2+} de la membrana plasmática, a través de los canales de Ca^{2+} tipo L. Finalmente, en este proyecto no se pudo corroborar la posible existencia de un almacén de membrana que pudiese participar durante el *undershoot* en las células disgregadas de bovino, pues este almacén pierde su funcionalidad cuando se disecan las estructuras adyacentes al músculo liso como el cartilago y el tejido conectivo.

V. ABSTRACT

Ca^{2+} is an essential messenger involved in airway smooth muscle (ASM) contraction. This cation is mainly stored in the sarcoplasmic reticulum (SR) from the cell. Recently, it has been described that when the SR- Ca^{2+} content was empty, a Ca^{2+} entry pathway is opened until the store is refilled. This phenomenon is known as "Capacitative Ca^{2+} entry". Caffeine removes Ca^{2+} from SR and the xantine washout generates a fast decrease in the intracellular free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) followed by a slow recovery to resting values, this phenomenon is known as "undershoot". The first objective of this work was to evaluate if capacitative Ca^{2+} entry is involved in the Ca^{2+} undershoot induced by caffeine washout. ASM cells from fresh bovine trachea were disgregated by enzymatic digestion. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ from isolated cells were recorded by microfluorescence with Fura-2 AM as fluorescence dye. Caffeine (10 mM) produced a transient increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and blocked the carbachol (10 μM) response. This blockade is a consequence of SR- Ca^{2+} depletion. The caffeine washout always induced a Ca^{2+} undershoot. The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ recovery during the undershoot was inhibited by Ca^{2+} -free medium. Additionally, Ca^{2+} undershoot was not modified by high KCl-induced depolarization, neither by the inhibition of the L-type channels with D600 (30 μM) or the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger with benzamil amiloride (25 μM), nor with lanthanum (0.2 mM) or magnesium (4 mM). Nickel (1 mM) induced a decrease of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ until a new cytosolic Ca^{2+} baseline was reached. In these conditions, nickel inhibited the Ca^{2+} undershoot recovery.

On the other hand, Ca^{2+} -free medium induced a passive decrease of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ that was accelerated by a previous caffeine (10 mM) incubation. Additionally, nickel (1 mM) reduced the basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ showing that an important passive Ca^{2+} entry exists in ASM cells. After Ca^{2+} -free medium incubation, Ca^{2+} back (2 mM) generates the recovery of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ baseline. This recovery rate did not depend on SR- Ca^{2+} content, but when the SR was depleted of its Ca^{2+} content by incubating the cells in Ca^{2+} -free medium for 10 min, the Ca^{2+} undershoot recovery was accelerated. This accelerated recovery was not modified by lanthanum (0.2 mM) neither by magnesium (1 mM) nor

by depolarization with high KCl. This first part of the study suggests that SR- Ca^{2+} content does not regulate the Ca^{2+} influx rate. However, Ca^{2+} influx increases only when the SR was empty. Additionally, the capacitative Ca^{2+} entry is not sensitive to lanthanum or magnesium in these cells

In relation to Ca^{2+} undershoot recovery, this phenomenon was independent of the voltage operated Ca^{2+} channels and the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger; also it was insensitive to lanthanum and magnesium but was sensitive to nickel.

In the second part of the project, it was explored the possible existence of a membrane Ca^{2+} store. In this study we measured contraction in canine bronchial rings. The contraction of third order bronchial rings and smooth muscle strips from first order bronchial were always sustained in Ca^{2+} containing medium. There were two patterns of contraction in Ca^{2+} -free medium: a sustained response in bronchial rings and a transient contraction in smooth muscle strips. In bronchial rings, after depleting the histamine ($10\ \mu\text{M}$) sensitive Ca^{2+} stores in Ca^{2+} -free medium, carbachol ($0.42\ \mu\text{M}$) still induced a sustained contraction that reached 50% of the initial response in Ca^{2+} -free medium; this response was inhibited by the SR- Ca^{2+} pump blocker cyclopiazonic acid ($10\ \mu\text{M}$, ACP). Also, nifedipine ($1\ \mu\text{M}$) and high levels of EGTA ($1\ \text{mM}$) inhibited the first sustained contraction induced by histamine in Ca^{2+} -free medium. Protein kinase C (PKC) inhibitors, chelethryne ($0.66\ \mu\text{M}$), staurosporine ($10\ \text{nM}$) and calphostine C ($1\ \mu\text{M}$) did not modify the first response to carbachol or histamine in Ca^{2+} -free medium. In conclusion, the bronchial rings sustained contraction in Ca^{2+} -free medium is independent of PKC activity; carbachol mobilizes Ca^{2+} from two different sources: from ACP-sensitive one, the SR, and an additional source from extracellular membrane stores sensitive to high EGTA concentrations, the caveolae. Histamine only mobilizes Ca^{2+} from the extracellular membrane store and this source is L-type Ca^{2+} channels dependent. Finally, it was not possible to evaluate if the extracellular membrane Ca^{2+} store participates in Ca^{2+} undershoot after caffeine washout because its functionality was lost when ASM was dissected from adjacent structures as cartilage and epithelium

INTRODUCCIÓN

Hace más de un siglo Sidney Ringer demostró la importancia del calcio (Ca^{2+}) como regulador de la contracción muscular cardíaca. Desde entonces se ha descubierto que este catión participa como mensajero en los procesos fisiológicos de las células, incluyendo al **músculo liso de las vías aéreas (MLVA)**. Este músculo, constituyente de la tráquea y los bronquios, mantiene bajas **concentraciones de Ca^{2+} libre intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)** en reposo (Kajita y Yamaguchi, 1993). Cuando el MLVA es estimulado por agonistas que inducen contracción, las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se incrementan induciendo la interacción de la calmodulina con la subunidad catalítica de la cinasa de la cadena ligera de miosina. La formación del complejo Ca^{2+} -calmodulina-cinasa de la cadena ligera de miosina permite la fosforilación de la cadena ligera de miosina en la serina 19. Esta fosforilación produce una cadena de eventos que inician con la activación de la adenosintrifosfatasa (ATPasa) de miosina, facilitando la interacción de los filamentos de actina y miosina, iniciando el desarrollo de tensión muscular (Giembycz y Raeburn, 1992; Rodger, 1985). Cuando el Ca^{2+} disminuye, la cinasa de la cadena ligera de miosina se inactiva, la miosina se desfosforila y el músculo se relaja. El Ca^{2+} es entonces un mensajero capaz de iniciar las señales en cascada involucradas en la contracción del MLVA y en este trabajo se mostrarán los resultados de la investigación sobre algunos mecanismos que regulan a este ión en tres preparaciones de MLVA y provenientes de dos especies diferentes.

1. EL Ca^{2+} EN LAS CÉLULAS DE MLVA

En 1994 Somlyo y Somlyo propusieron dos mecanismos de ensamble entre las diferentes fuentes de Ca^{2+} y la contracción muscular conocidos como acoples fármaco- y electromecánicos. El acople **farmacomecánico** depende de mecanismos de señalización celular que involucra a los segundos mensajeros, mientras que el **electromecánico** obedece a cambios en el potencial de membrana que generan la entrada de Ca^{2+} a la célula. Ambos acoples coinciden en el incremento de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para inducir contracción.

EL Ca^{2+} EXTRACELULAR

En las células de MLVA el gradiente de Ca^{2+} es 20,000 veces mayor en el medio extracelular en comparación al intracelular. Este gradiente facilita la entrada de Ca^{2+} cuando canales como los catiónicos inespecíficos **operados por receptor (OR)** y los canales de Ca^{2+} tipo **L (alto umbral, i.e., se activan a -35 mV)** y **T (bajo umbral, i.e., se activan a -60 mV) dependientes de voltaje (DV)** se abren (Kotlikoff, 1988; Janssen, 1997). En el MLVA los diferentes tipos de canales OR están acoplados, en su mayoría, a un sistema de segundos mensajeros y sus principales agonistas son la acetilcolina, la histamina, los leucotrienos y los tromboxanos (Barnes, 1998; Cuthbert y col., 1994). Los canales DV, L y T, se activan cuando las células se despolarizan y se desactivan por repolarización o hiperpolarización. Los tipo L también se inactivan cuando las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se incrementan (Wade y col., 1996). Janssen (1996) observó que el potencial de membrana del MLVA en el perro depende de la permeabilidad al potasio y el decremento de la conductancia de este ion facilita la despolarización.

Las corrientes de potasio y cloro pueden activarse por el incremento de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante la excitación del MLVA (Janssen y Sims, 1993) y se ha observado que ambas corrientes son hiperpolarizantes e inhiben a la excitación del MLVA (Janssen, 1996; Janssen y col., 1998). Adicionalmente, existen otras subpoblaciones de canales de potasio como el activador tardío que se activa transitoriamente durante la despolarización y que también

juega un papel importante en la disminución de la excitabilidad del MLVA (Waldron y col., 1998).

ENTRADA CAPACITATIVA DE Ca^{2+}

En células no excitables hay canales que se abren al vaciar los almacenes intracelulares de Ca^{2+} produciendo el fenómeno conocido como **entrada capacitativa de Ca^{2+}** (Putney, 1986). Por analogía con un capacitor en un circuito eléctrico, en la entrada capacitativa los almacenes intracelulares de Ca^{2+} previenen el ingreso de este ión cuando están llenos y promueven su entrada tan pronto como los almacenes se descargan. La entrada capacitativa, conocida actualmente como "Modelo de entrada de Ca^{2+} operada por los depósitos de Ca^{2+} ", fue descrita recientemente por Amrani y colaboradores (1995) en el MLVA de humano. Recientemente Gibson y colaboradores (1998) propusieron que la entrada capacitativa de Ca^{2+} puede jugar un papel importante en la regulación del tono del ML.

La entrada capacitativa de Ca^{2+} ha sido estudiada mediante diferentes protocolos donde se induce el vaciado de los almacenes intracelulares y coinciden en que todos activan corrientes de Ca^{2+} virtualmente idénticas (Berridge, 1995, Parekh y Penner, 1997). Estas corrientes, conocidas como I_{CRAC} (*Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current*), fueron observadas por primera vez por Hoth y Penner en 1993 y desde entonces se han descrito en muchos tipos celulares, especialmente no excitables (Vaca y Kunze, 1994), pero a la fecha no se han estudiado estas corrientes en ningún músculo liso (ML). Las corrientes I_{CRAC} no se activan por voltaje y son inhibidas de manera no específica por: lantano > zinc > cadmio > berilio = cobalto = manganeso > níquel > estroncio > bario (Hoth y Penner, 1993). Adicionalmente Yoshimura y colaboradores (1996) observaron en ML vascular que el magnesio (5 mM) bloquea la entrada capacitativa de Ca^{2+} .

Por otro lado, se ha propuesto que los canales TRP (*Transient receptor potential*), pudiesen estar involucrados en la entrada capacitativa de Ca^{2+} (Vaca y col., 1994,

Birnbaumer y col., 1996). Estos canales comparten muchas similitudes con los canales DV, pero no tienen el sensor de potencial del segmento S4 de los DV (Harteneck y col., 2000). Actualmente no se ha encontrado ninguna relación entre los canales TRP y las corrientes I_{CRAC} , lo que ha creado mucha controversia (Birnbaumer y col., 1996, Putney, 1999). Los canales TRP fueron observados por primera vez en el fotoreceptor de *Drosophila* y posteriormente se determinaron 7 subtipos en mamíferos, de los cuales el TRP1, el TRP3, el TRP4 y el TRP5 se expresan en células excitables (Philip y col., 1998; Harteneck y col., 2000). Se ha observado que solo los subtipos del TRP1 al TRP5 pudiesen participar en la entrada capacitativa de Ca^{2+} (Harteneck y col., 2000).

EL Ca^{2+} INTRACELULAR

En el **retículo sarcoplásmico (RS)** de las células de MLVA se depositan altas concentraciones de Ca^{2+} . Se ha determinado que en el lumen del RS las concentraciones de Ca^{2+} libre están en el rango de 5 a 10 mM (Edes y Kranias, 1998). Este ión se libera al citoplasma mediante dos tipos de receptor-canal catiónicos no selectivos (Taylor y Traynor, 1995). Uno es sensible al inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3), un mensajero que se forma por la activación de un receptor de membrana acoplado a una proteína G_q (insensible a la toxina de *B. pertussis*) activando a la fosfolipasa $C\beta$ que hidroliza al fosfatidilinositol 4,5 bifosfato en IP_3 y 1,2 diacilglicerol (Berridge, 1993, Challis y col., 1993).

El otro receptor-canal es sensible a la rianodina, un alcaloide neutral de la raíz de *Ranunculus speciosus*. Este receptor se activa fisiológicamente cuando las $[Ca^{2+}]_i$ se incrementan alrededor de 1 μM (Iino, 1989, Zucchi y Ronca-Testoni, 1997). Farmacológicamente los receptores sensibles a rianodina se pueden manipular con **cafeína** que los sensibiliza para que se abran a niveles de Ca^{2+} citosólico donde normalmente no se activan (Iino, 1989, Iino, 1990; Pessah y col., 1987).

Basándose en la clonación del ADN complementario en varios tejidos, se han aislado tres isoformas del receptor de IP_3 . Este receptor es un homotetramero de ~310 kDa

por subunidad (Parys y col., 1996), y los tres subtipos se pueden expresar en el mismo tejido (De y col., 1994; Morgan y col., 1996) De manera similar, existen tres isoformas del receptor sensible a rianodina, que también es un tetrámero de ~560 kDa por subunidad, y la subunidad Ryr3 se ha observado en el ML (Ogawa, 1994). Ambos receptores son similares, están modulados por ATP, y la salida de Ca^{2+} termina con la inhibición de los receptores debido al incremento de las concentraciones de Ca^{2+} (Al-Hassani y col., 1993; Kajita y Yamaguchi, 1993; Sneyd y Kalachev, 1994; Zucchi y Ronca-Terstoni, 1997, Clapham, 1995).

REGULACIÓN DE LAS $[\text{Ca}^{2+}]_i$

El Ca^{2+} citosólico no puede ser metabolizado como otros segundos mensajeros, por lo que su regulación en el MLVA depende no sólo de proteínas amortiguadoras de Ca^{2+} como la calreticulina, la calsequestrina o la calbidina (Clapham, 1995), sino también de tres sistemas: Las bombas de Ca^{2+} plasmática y del RS y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

La **bomba plasmática de Ca^{2+}** es un sistema de baja capacidad pero de gran afinidad al Ca^{2+} que funciona continuamente permitiendo la salida de una mol de Ca^{2+} por molécula de ATP hidrolizada (Edes y Kranias, 1998). Esta bomba permite mantener un estado estacionario con respecto al contenido total de Ca^{2+} , contrarrestando la entrada de este. Se han descrito 4 isoformas de la bomba, conocidas como PMCA (*Plasma membrane calcium ATPase*), de las cuales se encuentran expresadas en pulmón la PMCA1, -2 y -4 (Carafoli y Stauffer, 1994) Se le considera una bomba electroneutra por permitir que por cada ión de Ca^{2+} se introduzcan dos protones (Carafoli y Stauffer, 1994).

El **intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$** es un sistema de transporte de la membrana plasmática, también electroneutro, con baja afinidad pero alta capacidad para transportar Ca^{2+} , y cuya funcionalidad parece no contribuir mucho en la homeostasis de Ca^{2+} de las células del MLVA (Janssen y col., 1997) Se ha propuesto que el intercambiador permite la

entrada de dos iones de sodio por ión de Ca^{2+} que sale, aunque puede actuar bidireccionalmente dependiendo de los gradientes electroquímicos de sodio (Bridge, 1998)

Finalmente, la **bomba de Ca^{2+} del RS**, considerado como uno de los sistemas más importantes de transporte de Ca^{2+} , es la proteína más grande de la membrana de este organelo (Edes y Kranias, 1998). Utilizando ADN recombinante se ha descrito una familia de bombas de Ca^{2+} del RS conocidas como SERCA (*Sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*). En el MLVA se expresa la isoforma SERCA2b (Amrani y col., 1995). Esta bomba electrogénica transporta 2 moles de Ca^{2+} por mol de ATP hidrolizado hacia el interior del RS a cambio de protones y iones potasio (Carafoli y Stauffer, 1994).

DECREMENTO DE LAS $[\text{Ca}^{2+}]_i$ DESPUÉS DE RETIRAR A LOS AGONISTAS QUE MOVILIZAN Ca^{2+} DEL RS: EL UNDERSHOOT

Desde 1992 se ha descrito que después de remover a los agonistas que movilizan Ca^{2+} del RS en células excitables, como la acetilcolina y la cafeína, se produce un decremento abrupto en las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Friel y Tsien, 1992; Ganitkevich e Isenberg, 1992; Baró y col., 1993; Yoshikawa y col., 1996; Kimball y col., 1996; Sims y col., 1996). Este fenómeno conocido como *undershoot* ha sido documentado en células de ganglio simpático de sapo (Friel y Tsien, 1992), ML vascular y ventricular de rata (Baró y col., 1993), en neuronas mientéricas (Kimball y col., 1996), ML de vejiga urinaria (Ganitkevich e Isenberg, 1992; Yoshikawa y col., 1996) y MLVA de cobayos (Sims y col., 1996). Algunos de estos autores concluyeron que el *undershoot* es resultado de la captura de Ca^{2+} por el RS (Friel y Tsien, 1992; Baró y col., 1993; Ganitkevich e Isenberg, 1992; Sims y col., 1996), lo que sugiere que antes de iniciarse el *undershoot* el RS contiene poco Ca^{2+} . Uno de los objetivos de este trabajo es describir los mecanismos involucrados en la recuperación de la basal de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante el *undershoot*, en especial la posible participación de la entrada capacitativa de Ca^{2+} en este fenómeno.

2. LA CONTRACCIÓN DEL BRONQUIO COMPLETO Y DE LAS TIRAS DE MLVA

Por otro lado, el estudio de la contracción del MLVA nos permite conocer, de manera indirecta, algunos mecanismos involucrados en la movilización del Ca^{2+} citosólico. En este sentido, los mecanismos de movilización de Ca^{2+} entre el bronquio completo (ML bronquial con todas sus estructuras adyacentes) y las tiras de ML (solo ML), pudiesen variar debido a la interacción de diferentes estructuras que han sido respetadas en el primero. A continuación se describen algunos hallazgos experimentales relacionados a las diferencias funcionales que pueden existir entre ambas preparaciones.

LA CONTRACCIÓN SOSTENIDA EN EL MLVA

Las respuestas inducidas por agonistas colinérgicos e histaminérgicos inician con un incremento transitorio de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Este incremento permite una relación lineal entre la cantidad de cadena ligera de miosina fosforilada y el desarrollo de la contracción (Barnes, 1998; Silver y Stull, 1984). Posteriormente, los niveles de Ca^{2+} disminuyen lentamente, hasta en un 50% (Kajita y Yamaguchi, 1993), pero la tensión se mantiene hasta alcanzar su respuesta máxima (Rodger, 1985; Ganitkevich e Isenberg, 1992; Bourreau y col., 1991). Se ha propuesto que el mantenimiento de la contracción a bajas $[\text{Ca}^{2+}]_i$ podría ser resultado de dos mecanismos. Por un lado, se propone que durante la contracción sostenida existe una interacción lenta de los filamentos de miosina y actina, estado conocido como "latch-bridges" lo que permite que esta respuesta se mantenga (Somlyo y Somlyo, 1994; Moussavi y col., 1993; Silver y Stull, 1984). Por otro lado se ha observado que la contracción sostenida es resultado del aumento en la sensibilidad de la maquinaria contráctil al Ca^{2+} producida por la **cinasa de proteína C (PKC)** (Rasmussen y col., 1987; Al-Hassani y col., 1993). En este sentido, se ha observado la participación de la PKC en la fase sostenida de la contracción del MLVA de bovinos (Park y Rasmussen, 1985; Kajita y Yamaguchi, 1993; Zerthoffer, 1991; Rossetti y col., 1995; Roux y col., 1995) y en el ML vascular de conejos (Khalil y van Breemen, 1988). La PKC normalmente se encuentra libre cuando está inactiva

y se adhiere a la membrana plasmática al activarse con el 1,2-diacilglicerol que se forma durante la hidrólisis de los fosfoinositoles (Castagna y col., 1982, Schramm y Grunstein, 1989; Takai y col., 1979) Existen varias isoenzimas de la PKC y se sabe que se expresan en el MLVA las PKC- β I, - β II, - δ , - ϵ , - θ y - ζ (Donnelly y col., 1995).

LA CONTRACCIÓN SOSTENIDA DEL MLVA EN UN MEDIO SIN Ca^{2+}

Aunque el mantenimiento de la contracción sostenida del MLVA no requiere de altos niveles de Ca^{2+} es inhibida si el medio extracelular no contiene este ión (Montaño y col., 1996) Un hallazgo interesante es que si se conservan los tejidos adyacentes al MLVA como el epitelio, tejido conjuntivo y el cartilago, i.e. bronquio completo, la contracción en un medio sin Ca^{2+} es sostenida (Raeburn y col., 1986, 1987, Foster y col., 1983, Montaño y col., 1996). Recientemente se demostró, en el MLVA de perro, que ninguno de esos tejidos adyacentes es capaz de proporcionar el Ca^{2+} necesario para la respuesta sostenida en un medio sin Ca^{2+} (Montaño y col., 1996). Los mecanismos involucrados en la contracción sostenida de la preparación bronquial en un medio sin Ca^{2+} no se conocen con precisión por lo que uno de los objetivos de esta tesis fue investigar dichos mecanismos.

LOS CANALES TIPO L EN LA CONTRACCIÓN SOSTENIDA DEL MLVA EN UN MEDIO SIN

Ca^{2+}

La adición de BAYK 8644, agonista de los canales tipo L, durante el estímulo con acetilcolina en medio sin Ca^{2+} , hace que la contracción transitoria del MLVA de perro sea más prologada (Montaño y col., 1996). Se ha propuesto que esta respuesta prolongada podría ser resultado del reciclado de Ca^{2+} entre un compartimento localizado en la membrana plasmática y el RS a través de canales tipo L y dependiente de la actividad de la bomba de Ca^{2+} del RS (Montano y col., 1996) Sustenta más esta hipótesis el hecho de que recientemente se han descrito invaginaciones de la membrana plasmática, conocidas como vesículas, donde se observan gran cantidad de canales de Ca^{2+} tipo L. Al pasas de Ca^{2+} de

la membrana plasmática y receptores a IP_3 (Fujimoto y col., 1992; Schnitzer y col., 1995; Darby y col., 1996). Darby y colaboradores (2000) encontraron proteínas que unen Ca^{2+} como la calreticulina y calsequestrina dentro de las caveolae por lo que estas invaginaciones contienen todos los elementos necesarios para ser considerados almacenes de Ca^{2+} . Finalmente Isshiki y Anderson (1999) y Shaul y Anderson (1998) recientemente propusieron que las caveolae parecen estar involucradas en la regulación de señales de Ca^{2+} en la superficie celular. Es probable que esta señalización se active con la histamina y el carbacol durante la contracción sostenida en un medio sin Ca^{2+} . En este sentido, el presente trabajo pretende explorar si ambos agonistas pudieran estar movilizando Ca^{2+} de estos compartimentos. Adicionalmente se estudió si la PKC pudiese estar involucrada en la contracción sostenida en un medio sin Ca^{2+} inducida por el carbacol o la histamina y, para el caso de la histamina, se determinará si los canales tipo L también participan en esta contracción.

HIPÓTESIS

1. Si el contenido de Ca^{2+} del RS puede regular la entrada de Ca^{2+} de las células de MLVA entonces existirá una relación directa entre el contenido de Ca^{2+} de este almacén y el contenido de Ca^{2+} en el citoplasma.
2. Después del vaciado de Ca^{2+} del RS se induce la entrada capacitativa de Ca^{2+} hasta llenar al almacén. Esto podría pasar en el caso de *undershoot* producido después de lavar cafeína, pues el RS se encuentra vacío al iniciarse este fenómeno.
3. Durante la recuperación del *undershoot*, esto es cuando las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se incrementan hasta alcanzar la basal, podrían participar los canales DV o el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, pues ambos mecanismos son conocidos por su participación en la regulación del Ca^{2+} citosólico.
4. La contracción bronquial sostenida inducida por histamina en medio sin Ca^{2+} pudiese depender del contenido de Ca^{2+} del compartimiento de la membrana plasmática y los canales tipo L.
5. La contracción sostenida de los anillos bronquiales inducida por carbacol en medio sin Ca^{2+} pudiese depender tanto del contenido de Ca^{2+} del RS así como del compartimiento de la membrana plasmática.
6. La contracción sostenida de los anillos bronquiales inducida por carbacol o histamina en un medio sin Ca^{2+} pudiese depender de la activación de la PKC pues esta enzima ha sido involucrada en la contracción sostenida en un medio con Ca^{2+} .

OBJETIVOS

1. En células aisladas de MLVA de bovino determinar si la cafeína vacía el contenido de Ca^{2+} del RS.
2. Evaluar si en el rellenado del RS, vaciado por la cafeína, intervienen los canales DV, la entrada capacitativa de Ca^{2+} y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
3. Explorar el efecto del contenido de Ca^{2+} del RS en la entrada de este ión a la célula.
4. Comparar los cambios en las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ entre células aisladas y las tiras de MLVA de bovino estimuladas con histamina y carbacol.
5. Examinar las diferencias entre la contracción de las tiras de MLVA y los anillos bronquiales de perro estimulados con histamina y carbacol
6. Determinar si en la contracción sostenida de los anillos bronquiales en un medio sin Ca^{2+} inducida por histamina participan el Ca^{2+} del RS y los canales tipo L.
7. Explorar si durante la contracción sostenida de los anillos bronquiales en un medio sin Ca^{2+} inducida por la histamina y el carbacol participa el compartimento de Ca^{2+} de la membrana plasmática.
8. Estudiar la participación de la PKC en la contracción sostenida de los anillos bronquiales en un medio sin Ca^{2+} inducida por carbacol e histamina.

MÉTODOS

ESTUDIOS EN CÉLULAS AISLADAS DE MLVA DE BOVINO

OBTENCION DE MIOCITOS TRAQUEALES

Se trabajó con tráqueas de bovinos machos jóvenes, recién sacrificados del rastro de Milpa Alta del Distrito Federal. Se transportaron al laboratorio de Investigación en Asma del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias en solución de Krebs-Ringer-Henseleit (KRH) saturada con carbógeno a un pH de 7.4 y a 8°C. La solución de KRH tuvo la siguiente composición (mM): 118 de NaCl, 25 de NaHCO₃, 4.6 de KCl, 1.2 de KH₂PO₄, 1.2 de MgSO₄, 11 de glucosa y 2 de CaCl₂. En el laboratorio se eliminó la fascia superficial para seccionar la tráquea dorsalmente a lo largo de su eje. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico se quitaron las capas de mucosa, epitelio, serosa y vasos sanguíneos hasta obtener tiras de ML de 5 mm de largo y 0.5 mm de ancho. Se experimentó con varios métodos de disgregación celular hasta obtener células relajadas que respondieran a cambios en la concentración de Ca²⁺. El método óptimo de disgregación fue el siguiente:

Aproximadamente 200 mg de tiras de ML traqueal se incubaron en 5 ml de una mezcla de KRH sin Ca²⁺ con colagenasa tipo D con baja actividad de tripsina (≤ 0.1 U/mg) y lostripaína (≤ 1.5 U/mg), y elastasa grado II, ambas de Boehringer Mannheim. La temperatura de incubación (37°C) se mantuvo utilizando un baño María donde el tejido seagitó con una barra magnética (9 mm) a 2 revoluciones/s. En estas condiciones se incubó el tejido dos veces, de 15 min cada una, usando dos fracciones de 2.5 ml de la solución enzimática. En la segunda fracción se adicionó ADNasa I (Boehringer Mannheim) para

evitar aglomerados de células. Posteriormente se transfirieron las piezas de tejido a KRH sin enzimas y se agitó hasta disgregar a las células.

La apariencia de las células en medio sin Ca^{2+} era alargada y relajada, con contenido citoplasmático evidente. En medio con Ca^{2+} (2 mM) se eligieron células contraídas, con membrana con aspecto de acordeón.

DETERMINACIÓN DEL Ca^{2+} CITOSÓLICO

A) Fura-2

El Fura-2 es un marcador fluorescente de la segunda generación que permite el registro de cambios en el Ca^{2+} citosólico por desplazamiento en su espectro de excitación cuando se une al Ca^{2+} libre. La absorción máxima del Fura-2 ocurre a los 362 nm cuando se encuentra como anión libre y a los 335 nm cuando forma complejo con el Ca^{2+} . Su emisión máxima ocurre entre 512 a 518 nm para el anión libre y entre 505 a 510 nm para el complejo con Ca^{2+} .

La molécula de Fura-2 consiste en un fluoróforo, anillos de estilbena, unido a un grupo tetracarboxilo con alta afinidad al Ca^{2+} ($K_d = \sim 0.1 \mu\text{M}$). Este grupo es capaz de coordinar la unión con un átomo de Ca^{2+} . La afinidad del Fura-2 por el Ca^{2+} es $\sim 100,000$ veces mayor que el magnesio (Grynkiewicz y col., 1985)

Debido a la naturaleza hidrofílica del Fura-2, se utilizó la forma acetoximetilica de este compuesto (Fura-2/AM) para permitir que la molécula fuera permeable a la célula (Fig. 1, Grynkiewicz y col., 1985). Se sabe que, en el interior de la célula, esterazas endógenas hidrolizan el enlace éster de Fura-2/AM dejando a la molécula en su forma activa lista para unirse con iones bivalentes.

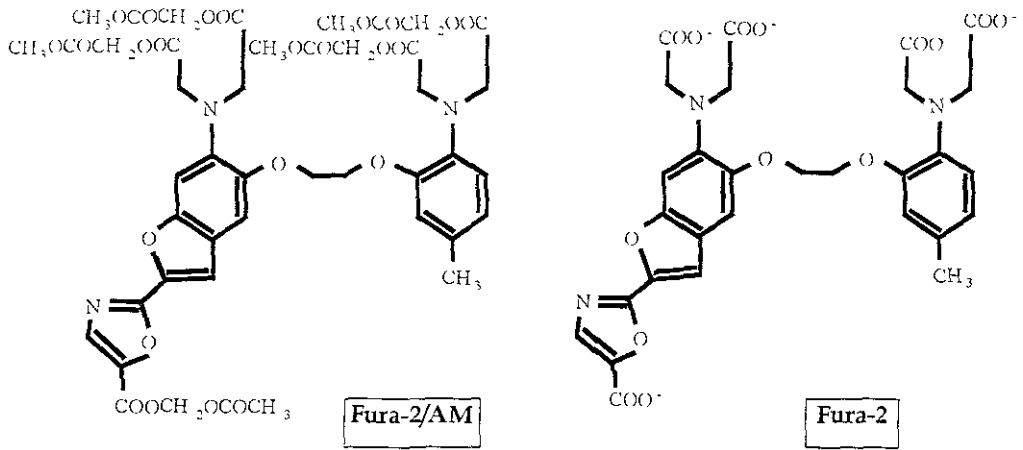


Fig. 1 Moléculas de Fura-2/AM y Fura-2 ácido

B) Determinación de las $[Ca^{2+}]_i$ con Fura-2

A la suspensión de células de tráquea de bovino se añadió 2 μ M de Fura-2/AM, y se mantuvo en la oscuridad por 30 min a temperatura ambiente para permitir la incorporación del fluoróforo. Posteriormente, las células fueron colocadas por otros 30 min en una cámara de registro para que se sedimentaran y pegaran a la base de vidrio de la cámara. Esta cámara se montó en un microscopio invertido (Nikon, Diaphot 200) y las células adheridas se perfundieron continuamente (2 a 2.5 ml/min) con medio con Ca^{2+} a 37°C, pH 7.4 y burbujado con carbógeno.

La fluorescencia se registro con un microfluorómetro de *Photon Technology International* (PTI) modelo RF-F3010. Para determinar la cantidad aproximada de Ca^{2+} intracelular se utilizó la ecuación derivada por Grynkiewicz y colaboradores (1985)

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \beta ((R-R_{min})/(R_{max}-R))$$

donde **R_{max}** y **R_{min}** (11.7 y 0.5 respectivamente, *n*=11 células), se obtuvieron en presencia de Ca²⁺ saturante (10 mM) + ionomicina 10 μM y en ausencia de Ca²⁺ + EGTA 1.11 mM, respectivamente. β fue igual a 7.6 y se calculó a partir del cociente de la fluorescencia observada a 380 nm en ausencia de Ca²⁺ y en presencia de Ca²⁺ saturante. **R** se calculó como el cociente de fluorescencia 340/380 nm. La **K_d** del Fura-2, 386 nM, fue obtenida en células disgregadas de ML traqueal de bovino en una solución con la misma fuerza iónica que utilizamos en los experimentos (Yamaguchi y col., 1995). Durante los registros se seleccionaron células vivas que se encontraban aisladas, descartando a las agrupadas y la adición de los diferentes agonistas fue mediante perfusión continua.

C) Experimentos

Para conocer el grado de vaciado de Ca²⁺ del RS producido por la cafeína (10 mM), administramos carbacol (10 μM) 2 min después de haber iniciado el estímulo con esta xantina. Para corroborar que la respuesta a carbacol no estuviera afectada por la acumulación del AMPc inducida por la cafeína, se evaluó por separado el efecto de la forskolina (IC₅₀= 32 μM) en la respuesta al carbacol.

Posteriormente nos enfocamos a investigar la naturaleza de la recuperación de la basal de Ca²⁺ del *undershoot*, después del abrupto decremento de las [Ca²⁺]_i al quitar la cafeína. Durante la recuperación del *undershoot* estudiamos el efecto de bloqueadores de los canales de Ca²⁺ como el lantano (0.2 mM), el magnesio (4 mM), el níquel (1 y 0.2 mM) y de canales tipo L como el metoxiverapamil (D600, 30 μM). Utilizamos 0.2 mM de lantano por que se sabe que a concentraciones menores a 0.25 mM, el lantano no entra en la célula

y concentraciones sobre 0.05 mM inhiben la entrada de Ca^{2+} en el MLVA (Shibuya y Douglas, 1992, Yang, 1998; Hoth y Penner, 1993). Por otro lado, Yoshimura y colaboradores (1996) determinaron que concentraciones de magnesio por arriba de 1 mM inhiben la entrada capacitativa de Ca^{2+} en el ML vascular de ratas. Hoth y Penner (1993) demostraron que 1 μM de níquel inhibe alrededor del 30% de las corrientes de los canales activados por la entrada capacitativa de Ca^{2+} en las células cebadas de rata. Nosotros observamos que 30 μM de D600 es suficiente para bloquear de manera reversible la respuesta a KCl 60 mM en las células de MLVA. En los experimentos con magnesio se redujo la cantidad de Ca^{2+} a 1 mM en el medio para evitar cambios en la osmolaridad. Los efectos del lantano, magnesio, níquel y D600 sobre la recuperación del *undershoot* se compararon con sus respectivos controles.

Por otro lado estudiamos el efecto de un inhibidor del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, el benzamil amilorida (25 μM), sobre el *undershoot*. Para los experimentos con benzamil amilorida fue necesario preincubar a las células durante 8 min con el inhibidor. La concentración de benzamil amilorida utilizada fue suficiente para bloquear la respuesta generada por la inversión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, inducida por la sustitución del NaCl del KRH por 143 mM de cloruro de colina. Finalmente, evaluamos tanto el efecto de un medio depolarizante, substituyendo en el KRH 118 mM NaCl por 122.6 mM de KCl, así como el uso de un medio sin Ca^{2+} en la recuperación del *undershoot*.

Se compararon las velocidades de recuperación a los niveles basales de Ca^{2+} de células con el RS parcial o totalmente vacío. Para el vaciamiento del RS se incubó a las células en medio sin Ca^{2+} por 2, 4, o y 10 min y se observó la recuperación de la basal inicial al añadir 2 mM de Ca^{2+} al medio. Previamente habíamos observado que la

incubación en medio sin Ca^{2+} , de las células de MLVA, produce el decremento de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En otras células, se comprobó el contenido de Ca^{2+} en el RS a los 2, 4, 6 y 10 min con estímulos de cafeína y se comparó esta respuesta con la obtenida con cafeína una vez recuperada la basal inicial en presencia de 2 mM de Ca^{2+} . Por último, en células con RS vacío (10 min), se observó el efecto del níquel (1 mM), el magnesio (4 mM) y el lantano (0.2 mM) durante la recuperación de la basal de Ca^{2+} .

ESTUDIOS *in vitro* EN MLVA DE BOVINO Y PERRO

PREPARACIÓN DEL TEJIDO DE BOVINO

MEDICIONES SIMULTÁNEAS DE CONTRACCIÓN Y Ca^{2+} INTRACELULAR

De las tráqueas de bovino mencionadas se obtuvieron tiras de ML a las cuales se les retiró el tejido conectivo adyacente. El tejido fue incubado (3.5 h a 37°C, burbujeado con carbógeno), en KRH con Ca^{2+} y 20 μM de Fura-2/AM más 1 mM de probenecid y 0.01% de ácido plurónico para facilitar la incorporación del colorante. Posteriormente, las tiras fueron colocadas en un fluorómetro marca PTI y se mantuvieron a una tensión continua de 1-1.5 g durante 30 min. Cada cámara contenía 3 ml de solución KRH a 37°C, con un pH de 7.4 y fue burbujeada continuamente con carbógeno. La tensión isométrica fue registrada simultáneamente con los cambios de fluorescencia en una computadora a través de un transductor *Experimetria FSG-01*. La medición de la fluorescencia fue similar a lo descrito brevemente para las células únicas.

Con el propósito de normalizar las respuestas de contracción, las tiras de ML fueron estimuladas con KCl 60 mM en medio con Ca^{2+} durante 20 min (Montano y col., 196). Posteriormente se estimularon con carbacol (10 μM , 20 min) o histamina (10 μM , 10

min), primero en medio con Ca^{2+} y a continuación sin Ca^{2+} . En el caso de la histamina, para evitar la taquifilaxia, los estímulos se administraron con 1 h de intervalo. Para asegurar que el medio sin Ca^{2+} estuviera completamente libre de este ión, se adicionó 0.1 mM de EGTA como agente quelante. La adición de 0.1 mM de EGTA al medio sin Ca^{2+} mantiene concentraciones menores a 10 nM de Ca^{2+} (Montaño y col., 1996).

PREPARACIÓN DEL TEJIDO DE PERRO

Se sacrificaron perros criollos (20-25 Kg) mediante una sobredosis con pentobarbital sódico (100 mg/Kg, i.v.) para diseccionar el lóbulo pulmonar superior izquierdo. De esta estructura se obtuvieron dos preparaciones: a) **Tiras de ML** bronquial constituida por bandas transversales (0.2 mm ancho por 1 cm largo) de ML proveniente de los bronquios de primer orden y b) Los **anillos bronquiales** del tercer orden con una longitud de 0.5 mm que se extrajeron sin eliminar el cartílago y el epitelio. Ambas preparaciones se diseccionaron con la ayuda de un microscopio estereoscópico Nikon SWZ-10 que facilitó la eliminación del parénquima y del tejido conectivo.

Durante los experimentos se utilizaron dos tipos de soluciones: a) **Medio con Ca^{2+}** , con la siguiente composición (mM). NaCl 115, KCl 4.6, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.16, NaHCO_3 22, CaCl_2 2.5 y glucosa 11 y, b) **Medio sin Ca^{2+}** , con la misma composición que la anterior pero sin CaCl_2 . Para asegurar que el medio sin Ca^{2+} estuviera completamente libre de este ión se adicionó 0.1 mM de EGTA.

Las tiras de ML y los anillos bronquiales se colocaron en cámaras de órganos aislados y se mantuvieron a una tensión continua de 1-1.5 g durante 30 min. Cada cámara contenía 10 ml de medio a 37°C, con un pH de 7.4 y burbujeada continuamente con

carbógeno. La tensión isométrica fue registrada en un dinógrafo *Beckman* R612 a través de un transductor *Gould Statham* UC3.

Con el propósito de normalizar las respuestas de contracción, las preparaciones fueron estimuladas tres veces con KCl 60 mM en medio con Ca^{2+} durante 20 min cada una (Montaño y col., 1996). La magnitud de la contracción con todos los tratamientos farmacológicos que se describen más adelante se expresó como porcentaje de la respuesta al tercer estímulo con KCl 60 mM.

Para comprobar que durante el proceso de disección de las tiras ML bronquial no se daña al tejido, se compararon las curvas concentración-respuesta al carbacol de fragmentos de bronquios de primer orden con cartilago y epitelio contra tiras de ML bronquial con estas estructuras disecadas. No se encontraron diferencias significativas en los valores de la concentración efectiva 50 (CE_{50}) obtenida: 0.28 ± 0.034 y $0.34 \pm 0.025 \mu\text{M}$ ($n=4$), respectivamente.

CONTRACCION PRODUCIDA POR EL CARBACOL Y LA HISTAMINA EN UN MEDIO SIN

Ca^{2+}

La capacidad de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} para liberar el Ca^{2+} necesario para la contracción fue evaluada, indirectamente, estimulando con la CE_{50} del carbacol ($0.34 \mu\text{M}$) y con $10 \mu\text{M}$ de histamina (concentración submáxima), durante 20 y 10 min respectivamente en medio sin Ca^{2+} . En estas condiciones la contracción máxima inducida por estos agonistas representó la cantidad total de Ca^{2+} intracelular disponible (Marthan y col., 1987, Bureau y col., 1991, Montano y col., 1996)

En un primer experimento, ambas preparaciones fueron estimuladas en medio sin Ca^{2+} con carbacol o histamina, las veces necesarias hasta no encontrar respuesta. En el caso de las tiras de ML traqueal de perro, determinamos que el intervalo de tiempo mínimo para llevar a cabo los estímulos con histamina en las tiras de ML y los anillos bronquiales de perro eran de 1 h (Tabla 1). Algunos anillos bronquiales que ya no respondían a la histamina en medio sin Ca^{2+} , fueron estimulados con carbacol. Adicionalmente, algunos anillos bronquiales fueron incubados inicialmente con ácido ciclopiazónico (ACP) $10 \mu\text{M}$ antes de estimularlos con carbacol o histamina.

Por otro lado, a otros anillos bronquiales que se encontraban en medio sin Ca^{2+} se le añadió EGTA 1 mM por 30 min para quelar el Ca^{2+} unido extracelularmente y después se mantuvieron en medio sin Ca^{2+} por 10 min para estimularse finalmente con histamina. Otros anillos bronquiales fueron incubados con $1 \mu\text{M}$ de nifedipina para luego estimularlos con histamina en medio sin Ca^{2+} .

Al final de cada experimento todas las preparaciones se incubaron nuevamente en medio con Ca^{2+} y se estimularon con KCl para verificar si el vaciado de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} no había modificado la viabilidad del tejido. Las respuestas obtenidas con este último estímulo no fueron significativamente diferentes de las observadas al inicio del protocolo.

TABLA 1. Efecto de la estimulación sucesiva (cada hora) con histamina de los anillos bronquiales en medio con Ca^{2+} . Los resultados están expresados como el porcentaje de la contracción a KCl 60 mM ($n=10$).

ESTIMULACIÓN (h)	1	2	3	4
HISTAMINA $10 \mu\text{M}$	99.48 ± 4.83	91.65 ± 5.00	97.26 ± 7.16	91.00 ± 6.07

EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LA PKC EN LA CONTRACCIÓN SOSTENIDA EN MEDIO SIN Ca²⁺

Los efectos de la calfofostina C y la cheleritrina, inhibidores específicos de la PKC (Kobayashi y col., 1989; Herbert y col., 1990) y de un inhibidor inespecífico y reversible, la estaurosporina (Rüegg y Burgess, 1989), fueron evaluados en la primera respuesta de los anillos bronquiales al carbacol o la histamina en medio sin Ca²⁺. La concentración de calfofostina C requerida para inhibir a la PKC (1 µM) se determinó en cada anillo por la capacidad de este inhibidor para bloquear la respuesta máxima inducida por 1 µM de 4-β-forbol 12,13-dibutirato (PDB) y de 4-β-forbol 12-miristato 13-acetato en medio con Ca²⁺ (Bazán-Perkins, 1994). Con respecto a los otros dos inhibidores, se ha determinado que 10 nM de estaurosporina inhibe la contracción generada por 1 µM de PDB en arterias coronarias porcinas, mientras que 0.66 µM de cheleritrina es la concentración inhibidora 50% de la PKC en cerebro de rata (Herbert y col., 1990; Kageyama y col., 1991). Ninguna de las concentraciones que se utilizó con estos inhibidores (cheleritrina, estaurosporina y calfofostina C) modificó la respuesta al KCl 60 mM (Tabla 2).

Finalmente, los anillos bronquiales fueron incubados durante 1 h con calfofostina C (1 µM), estaurosporina (10 nM) y cheleritrina (1 µM) en medio sin Ca²⁺ para luego ser estimulados con carbacol o histamina. Todos los experimentos con los inhibidores de la PKC y nifedipina fueron realizados en oscuridad por su sensibilidad a la luz.

ABLA 2. Efecto de la preincubación con los inhibidores de la PKC en la respuesta de los anillos bronquiales al KCl 60 mM en medio con Ca²⁺. Los resultados están expresados como el porcentaje de la contracción a KCl 60 mM.

INHIBIDOR DE LA PKC	Calfofostina C 1 µM (n = 5)	Cheleritrina 1 µM (n = 5)	Estaurosporina 10 nM (n = 4)
	100.2 ± 0.2%	95.95 ± 3.32%	103 ± 3.38%

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se evaluaron mediante análisis de varianza de una vía y la significancia estadística entre los grupos se obtuvo con pruebas de comparación múltiple de Dunnet o Bonferroni según fuera el caso. Para otras comparaciones se utilizó la prueba t de Student para muestras pareadas y no pareadas según se requiriera. Consideramos el 100% de la recuperación cuando las $[Ca^{2+}]_i$ alcanzaron el valor inicial en reposo. La pendiente de cada curva de recuperación a los niveles basales de $[Ca^{2+}]_i$ se obtuvo mediante regresión lineal. Cada célula funcionó como $n=1$ independientemente que fuera del mismo individuo, mientras que para los tejidos fue $n=1$ por cada individuo. Los valores de $p < 0.05$ bimariginal fueron considerados como estadísticamente significativos. Los resultados que aparecen en el texto y las figuras corresponden al promedio \pm el error estándar.

FÁRMACOS

1. ACETILCOLINA

Los nervios colinérgicos son una de las principales inervaciones excitatorias del MLVA. El carbacol es un agonista de los receptores colinérgicos nicotínicos y muscarínicos resistente

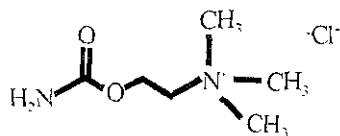


Fig. 2 Molécula de Carbacol

a la acción de la acetilcolinesterasa (Fig. 2). Los receptores colinérgicos muscarínicos están divididos en 5 tipos, del M_1 al M_5 , de los cuales en el MLVA se han observado el M_2 y el M_3 , que están acoplados a proteínas G_o/G_i y G_q , respectivamente. La estimulación de los

subtipos M_1 , M_3 y M_5 generan IP_3 , movilizándolo Ca^{2+} del RS, mientras que los subtipos M_2 M_4 , aunque producen IP_3 inhiben a la adenilato ciclasa disminuyendo al AMPc.

intracelular y favoreciendo la contracción (Sankary y col., 1988; Felder, 1995; Wang y col., 1997). Adicionalmente, los receptores M_2 producen la apertura de canales catiónicos inespecíficos (Wang y col., 1997). Estos canales catiónicos permiten la entrada de Ca^{2+} durante las respuestas sostenidas y para su activación es necesario el incremento transitorio de las $[Ca^{2+}]_i$ que se produce por la liberación del Ca^{2+} del RS por la activación de los receptores M_3 (Kajita y Yamaguchi, 1993; Wang y col., 1997).

2. ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO (ACP)

El ACP (Fig. 3) derivado del ácido indole tetrámico, es una micotoxina obtenida de *Aspergillus flavus* y *Penicillium cyclopium* que inhibe específica y reversiblemente a la ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplásmico y sarcoplásmico. Su efecto inhibitorio lo ejerce al competir con el sitio de unión al ATP. Bloquea completamente a la ATPasa de Ca^{2+} en el rango 1-2 mM ($IC_{50} \sim 300-500$ nM para la bomba del RS) (Bourreau y col., 1991; Darby y col., 1996; Suzuki y col., 1992; Seidler y col., 1988).

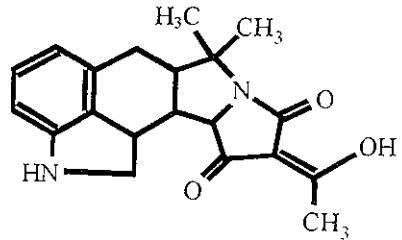


Fig. 3 Molécula de ACP

3. BENZAMIL AMILORIDA

El benzamil amilorida (5-N(N-(4-metoxibenzoyl)-2,4-dimetil benzamil, Fig. 4), derivado de la amilorida, inhibe selectivamente al intercambiador

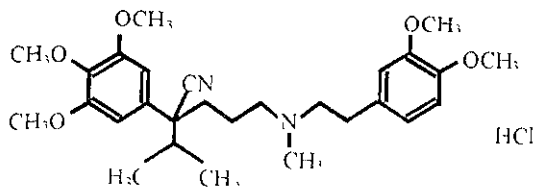


Fig. 4 Molécula de Benzamil amilorida

Na⁺/Ca²⁺ La ventaja del benzamil sobre su precursor es su especificidad, pues la amilorida tiene efectos también sobre la PKC y los canales de Ca²⁺ DV (Knox y Ajao, 1994).

4. CAFEÍNA

La cafeína (1,3,7-trimetil xantina; Fig. 5) es un alcaloide ampliamente conocido por su capacidad como estimulante del sistema nervioso central. En el músculo esquelético se ha

visto que la cafeína produce la liberación de Ca²⁺ del

RS al incrementar la probabilidad de apertura del

receptor-canal (Rousseau y col., 1988). Este mismo

efecto se ha observado en muchas otras células,

incluyendo al MLVA (Janssen, 1996). Entre otros

efectos, la cafeína también inhibe de manera no

selectiva a las fosfodiesterasas nucleótido cíclicas, por

lo que incrementa al AMPc, lo que facilita la entrada de Ca²⁺ al RS e inhibe a la maquinaria

de contracción (Beavo y Reifsnnyder, 1990; Daly, 1982).

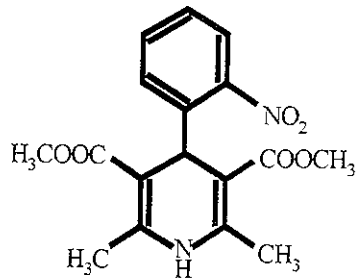


Fig. 5 Molécula de Cafeína

CALFOSTINA C

La calfoestina C (Fig. 6) es un inhibidor

altamente específico de la PKC (IC₅₀ = 50 nM)

que es permeable a la célula e interactúa con

el dominio regulador de la PKC al competir

por el sitio de unión del 1,2-diacilglicerol y los

residuos de torbol. A altas concentraciones

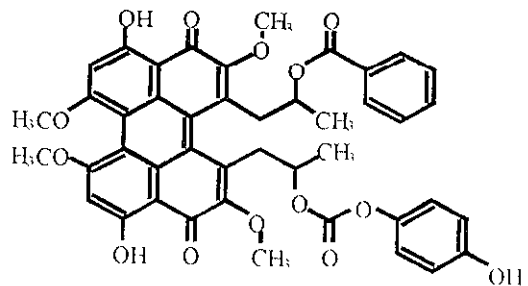


Fig. 6 Molécula de Calfoestina C

inhibe la cinasa de la cadena ligera de miosina ($IC_{50} > 5 \mu M$), la cinasa de proteína A ($IC_{50} > 50 \mu M$) y la cinasa de proteína G ($IC_{50} > 25 \mu M$). No compete con Ca^{2+} ni fosfolípidos. Es sensible a la luz (Shimamoto y col., 1992; Kobayashi y col., 1989).

6. CHELERITRINA

La cheleritrina (Fig. 7) es un alcaloide permeable a la célula que inhibe selectivamente a la PKC ($IC_{50} = 660 \text{ nM}$). Actúa sobre el dominio catalítico

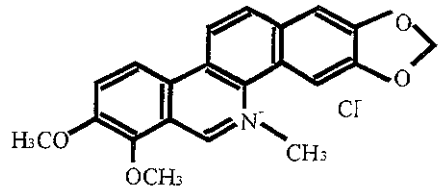


Fig. 7 Molécula de Cheleritrina

independientemente de la unión del dominio regulador. Inhibe la formación de tromboxanos y el metabolismo de fosfoinosítoles en plaquetas (Herbert y col., 1990; Kageyama y col., 1991).

7. ESTAUROSPORINA

La estaurosporina (Fig. 8) es obtenida del *Streptomyces actuosus* y es conocida por unirse de manera reversible al sitio catalítico de unión al ATP. Es un potente inhibidor de las cinasas de proteína entre las que se encuentran la cinasa de la cadena ligera de miosina ($IC_{50} = 1.3 \text{ nM}$), la cinasa de proteína A ($IC_{50} = 7 \text{ nM}$), la cinasa de proteína G ($IC_{50} = 8.5 \text{ nM}$) y la PKC ($IC_{50} = 0.7 \text{ nM}$) (Hidaka y

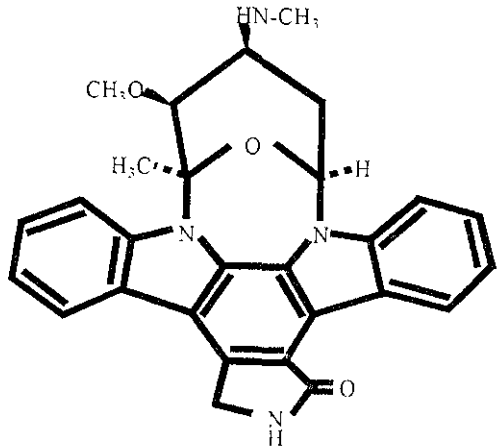


Fig. 8 Molécula de Estaurosporina

Kobayashi, 1992)

8. FORSKOLINA

La forskolina fue aislada de la planta de la India *Coleus forskolii*. Es un activador específico de rápida acción y de efectos reversibles de la adenilato ciclasa ($EC_{50} = 4 \mu M$)

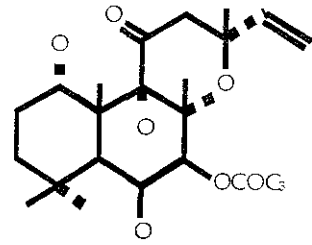


Fig. 9 Molécula de Forskolina

9. HISTAMINA

La histamina (2-(4-imidazolyl) etilamina; Fig. 10) se forma en el organismo por la descarboxilación de la L-histidina mediante la enzima L-histidinodescarboxilasa. La histamina se sintetiza y se libera en células cebadas,

basófilos y en otras células de la mucosa de las vías aéreas. Existen 3 subtipos de receptores a histamina, H_1 , H_2 y H_3 . La histamina es un agonista para la

contracción del MLVA por estimulación de los

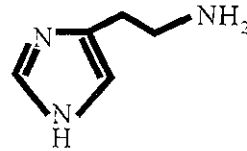


Fig. 10 Molécula de Histamina

receptores H_1 (Barnes, 1998). Estos receptores están acoplados a una proteína G_q , involucrada en la formación de IP_3 (Challis y col., 1993; Janssen y Sims, 1993; Kotlikoff y

col., 1987). En el MLVA de humano y bovino, la histamina produce la formación de IP_3 , aunque de menor magnitud con respecto al carbacol, pero en el MLVA de perro la

histamina no genera IP_3 (Carbajal, 1998, Challis y col., 1993; Daykin y col., 1993), por lo que la contracción inducida por este agonista en esta especie parece depender en gran medida

del Ca^{2+} extracelular (Kannan y col., 1986)

10. METOXIVERAPAMIL

El D600 ((±)-Metoxiverapamil, Fig. 11) es un derivado del verapamil que funciona como bloqueador de canales de Ca^{2+} tipo L (Soergel y col., 1992).

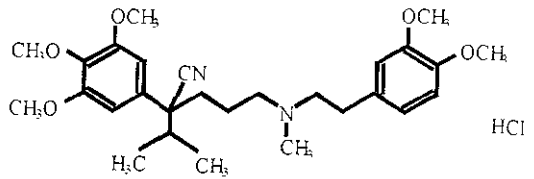


Fig. 11 Molécula de D600

11. NIFEDIPINA

La nifedipina (Fig. 12) es un conocido vasodilatador de la familia de las dihidropiridinas que bloquea selectivamente a los canales de Ca^{2+} tipo L DV. Es muy sensible a la luz llegándose a inactivar con luz ultravioleta (Kohlhardt y Fleckenstein, 1977).

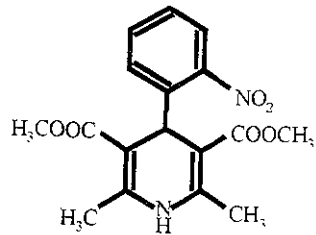


Fig. 12 Molécula de Nifedipina

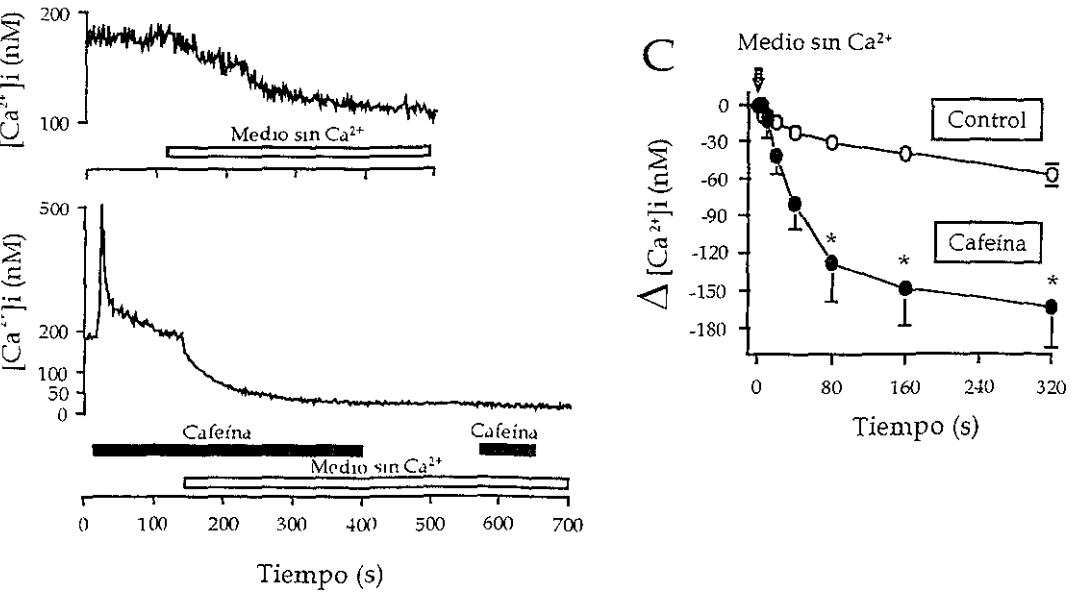
Todos los fármacos, salvo los que se indican adelante, se obtuvieron de Sigma (Saint Louis, Mo., USA MO) La indometacina y el EGTA fueron disueltos previamente en 1% de Na_2CO_3 (concentración final de Na_2CO_3 0.001%). La calfoestina C, la chelerritrina (RBI, Natick, Mass, USA) el Fura-2/AM, el ACP, la ionomicina y la estaurosporina fueron disueltos en dimetil sulfóxido (concentración final < 0.1 %) En experimentos control, el uso del dimetil sulfóxido no generó efectos

RESULTADOS

ESTUDIOS EN CÉLULAS AISLADAS DE ML TRAQUEAL DE BOVINO

EFFECTO DEL CONTENIDO DE Ca^{2+} DEL RS EN LA BASAL DE Ca^{2+} CITOSÓLICO

Los niveles basales de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de las células de ML de tráquea de bovino perfundidas con 2 mM de Ca^{2+} , fue de 153 ± 10 nM ($n=55$). La incubación de las células de ML traqueal con medio sin Ca^{2+} generó un lento decremento de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fig. 13A); y este decremento fue significativamente más rápido en células previamente estimuladas con cafeína ($p<0.05$,

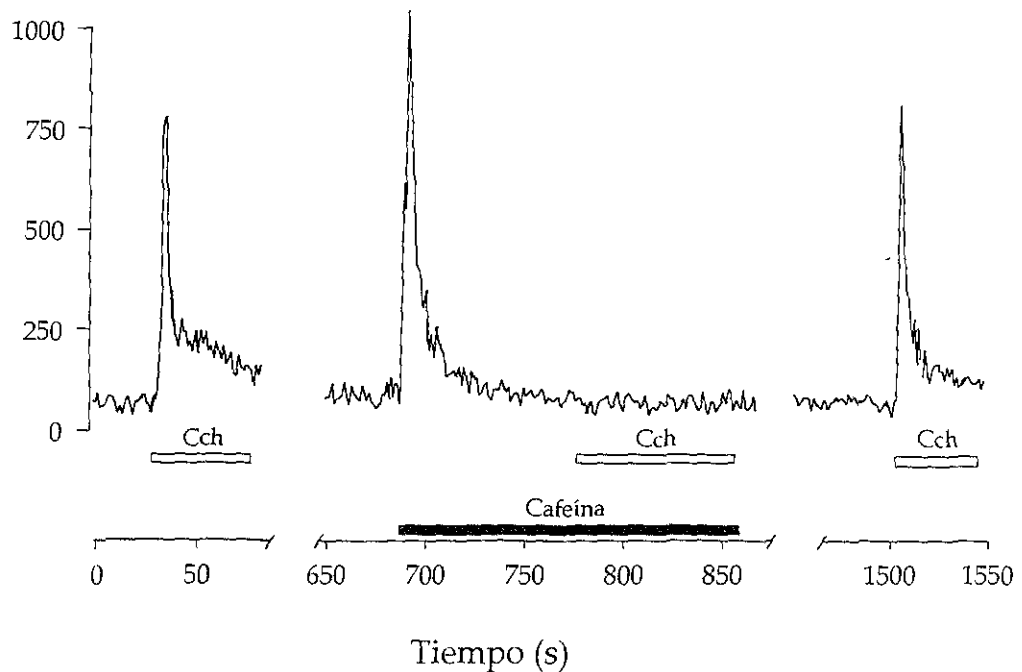


13. Dependencia del contenido de Ca^{2+} del RS en el decremento de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basales de células de músculo liso (ML) traqueal de bovino incubadas en medio sin Ca^{2+} . Registros originales presentando: A) miocitos incubados en medio sin Ca^{2+} y, B) miocitos estimulados con cafeína (10 mM) e incubados en medio sin Ca^{2+} . C) Curso temporal del decremento de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de las células incubadas en medio sin Ca^{2+} sin estímulo ($n=7$, círculos blancos) y las estimuladas con cafeína ($n=9$, círculos negros) ($p<0.05$).

21 ± 0.05 y 0.52 ± 0.09 nM/s respectivamente; Fig. 13B y C). El decremento máximo alcanzado en 320 s en las células no estimuladas fue del $38.9 \pm 4.6\%$ ($n=7$) y en las estimuladas con cafeína del $85.6 \pm 2.3\%$ ($n=9$). La viabilidad de las células no estimuladas con cafeína se determinó con una respuesta a KCl 60 mM al inicio de cada experimento.

CONTENIDO DE Ca^{2+} EN EL RS DURANTE LA INCUBACIÓN CON CAFEÍNA

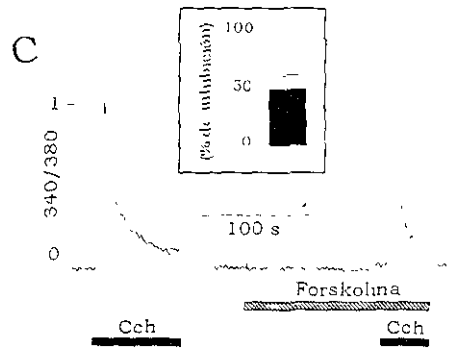
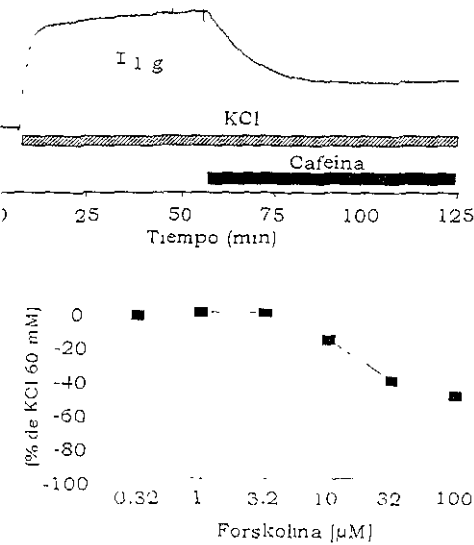
La adición de carbacol (10 μ M) indujo un incremento transitorio de las $[Ca^{2+}]_i$ de 627 ± 90 nM que se mantuvieron en 253 ± 20 nM ($n=39$; Fig. 14). Durante el estímulo con cafeína, la



14. Registro original del efecto del vaciado de los almacenes sensibles a cafeína (10 mM) en la respuesta a carbacol (Cch, 10 μ M) en una célula de ML traqueal

adición de carbacol no produjo ninguna respuesta. Esta inhibición fue reversible ($n=7$; Fig. 14).

La cafeína (10 mM) y la forskolina (curva concentración-respuesta, 0.32-100 μM) indujeron la relajación de la contracción máxima producida por KCl (60 mM) en tiras de ML traqueal de bovino ($n=3$; Fig. 15A y B). La IC_{50} de la forskolina fue $14.48 \pm 1.04 \mu\text{M}$ ($n=3$). La incubación con 32 μM de forskolina (IC_{50} , 2 min) redujo en un $48.64 \pm 11.24\%$ la respuesta del carbacol 10 μM en las células aisladas de ML traqueal de bovino ($n=3$, Fig. 15C).



. Registros originales del efecto de la cafeína y la forskolina en la respuesta de contracción inducida por 60 mM en tiras de ML traqueal y en la movilización de Ca^{2+} de células de ML traqueal estimuladas por carbacol. A) Efecto de la cafeína (10 mM) en la respuesta de contracción máxima al KCl 60 mM. B) Curva concentración-respuesta de la forskolina sobre la respuesta máxima al KCl 60 mM ($n=3$). C) Efecto de la incubación de forskolina 32 μM (IC_{50}) en la respuesta al carbacol (10 μM , Cch) en una célula de ML traqueal.

EL UNDERSHOOT PRODUCIDO DESPUÉS DE RETIRAR LA CAFEÍNA

La incubación con cafeína (10 mM) incrementó transitoriamente las $[Ca^{2+}]_i$ en células de ML traqueal de bovino (604 ± 42 nM, $n=41$). El lavado de cafeína indujo una disminución transitoria en las $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 16). Este decremento de las $[Ca^{2+}]_i$ es conocido en la literatura como *undershoot* (Friel y Tsien, 1992; Ganitkevich e Isenberg, 1992, Baró y col., 1993, Sims y col., 1996, Yoshikawa y col., 1996, Kimball y col., 1996) y alcanzó un valor mínimo de 70 ± 5 nM ($n=41$) que fue seguido por una lenta recuperación a la basal inicial (Fig. 16). La

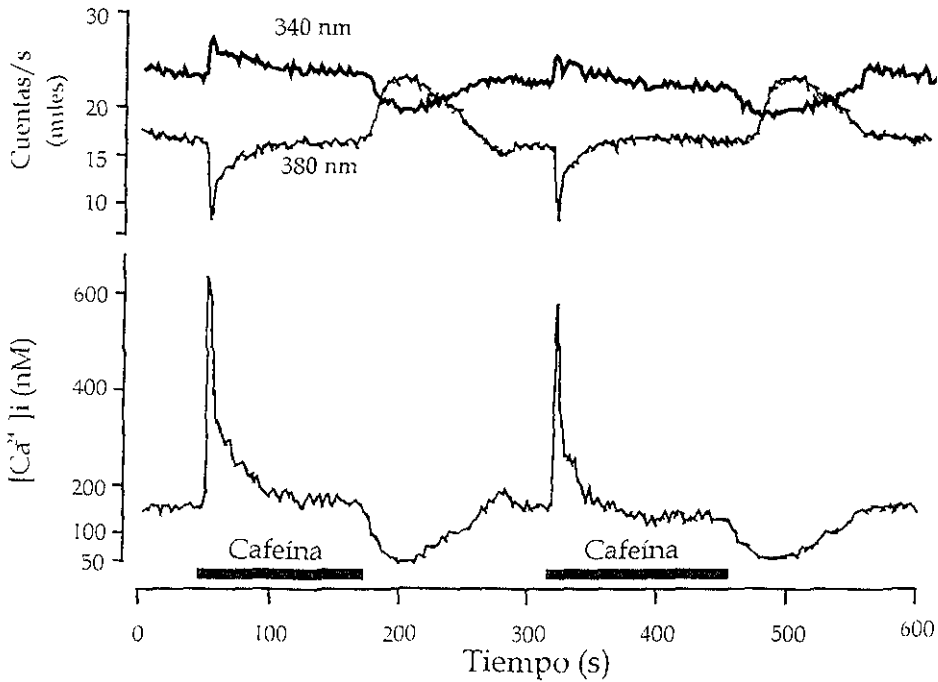


Fig. 16. Registro original del efecto de la cafeína en los niveles de Ca^{2+} libre intracelular $[Ca^{2+}]_i$ de células aisladas de ML traqueal de bovino. En la parte superior se muestran los registros de fluorescencia a 340 y 380 nm. En la parte inferior el incremento transitorio de las $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la cafeína (10 mM), seguido por el decremento de las $[Ca^{2+}]_i$ o *undershoot*. Un segundo estímulo produce una respuesta similar.

duración promedio del *undershoot* fue de 148.8 ± 9.2 s, de los cuales el decremento máximo se alcanzó en 26.0 ± 1.7 s y la recuperación hacia la basal en 122.1 ± 9.0 s. Una vez que el Ca^{2+} citosólico alcanzó sus niveles basales, una segunda estimulación con cafeína produjo una respuesta similar (Fig. 16).

EFECTO DEL Ca^{2+} EXTRACELULAR EN EL *UNDERSHOOT*

La eliminación del Ca^{2+} en el medio después de lavar la cafeína bloquea completamente la

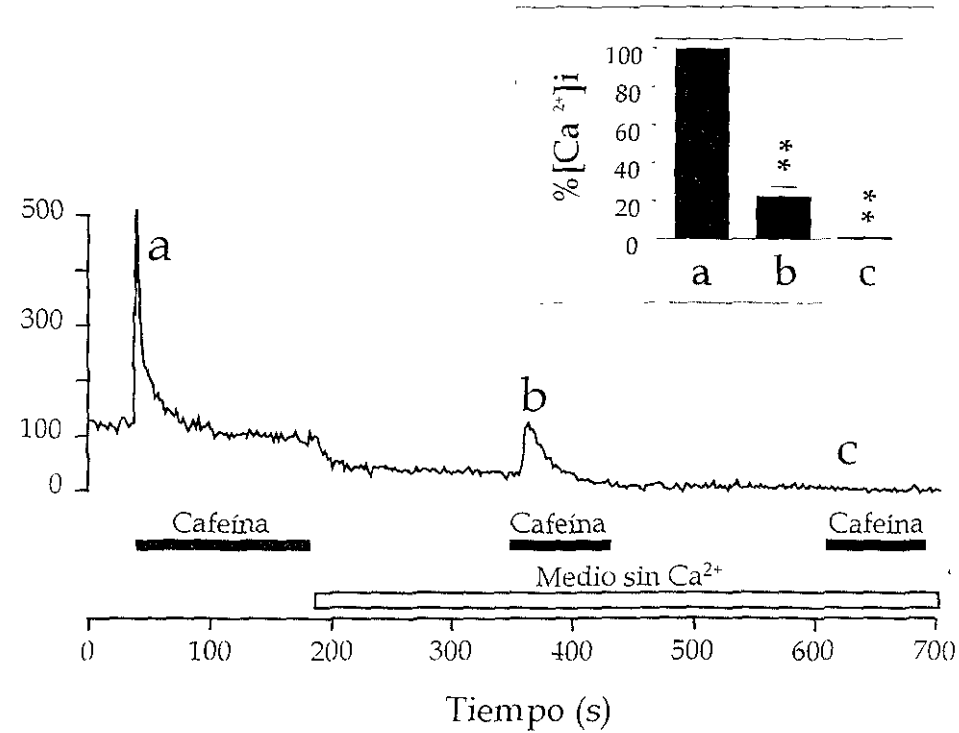
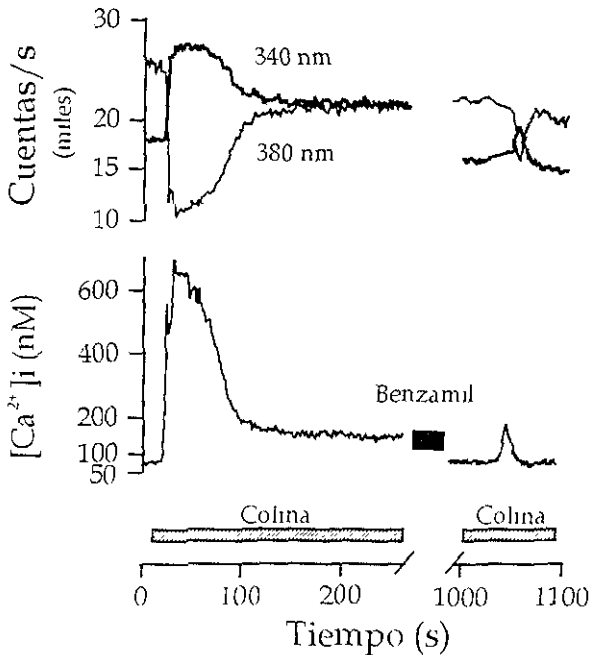


Fig. 16. Efecto del Ca^{2+} extracelular en la recuperación del *undershoot* y en la respuesta a cafeína de células de ML traqueal de bovino. Registro original que muestra la inhibición de la recuperación del *undershoot* después de lavar la cafeína (10 mM) e incubar las células en medio sin Ca^{2+} . Respuestas a cafeína hechas con Ca^{2+} 2 mM (a) y sin Ca^{2+} (b y c). En el inserto se muestra las respuestas máximas a cafeína como porcentajes a a, b y c ($p < 0.01$, $**p < 0.001$).

recuperación del *undershoot* ($n=9$; Fig. 17) Bajo estas condiciones, un estímulo con cafeína mostró que el RS contenía $22.4 \pm 5.0\%$ de su contenido de Ca^{2+} en un primer estímulo y $1.4 \pm 1.4\%$ de Ca^{2+} en un segundo estímulo (Fig. 17)

PAPEL DE LOS CANALES TIPO L Y DEL INTERCAMBIADOR $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ EN EL *UNDERSHOOT*

El *undershoot* generado al retirar a la cafeína en presencia del D600 $30 \mu\text{M}$ no se modificó con relación a un control previo ($n=8$, tabla 3). Así mismo, la sustitución de 118 mM de NaCl en la solución de KRH por 122.6 mM de KCl con el fin de inducir la inactivación de los canales de Ca^{2+} DV por despolarización prolongada y adicionalmente la inversión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, tampoco generó cambios en el *undershoot* ($n=5$, tabla 3).



18. Registro original del efecto del benzamil amilorida en el incremento de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producida por la acción del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en células aisladas de ML traqueal de bovino. La barra vacía muestra la incubación con cloruro de colina 143 mM , en sustitución de 118 mM de NaCl en el KRH con $30 \mu\text{M}$ de D600. La barra negra muestra la incubación con benzamil amilorida ($125 \mu\text{M}$) durante 8 min. Después de la incubación con el benzamil amilorida, la respuesta inducida por la colina fue bloqueada.

Tabla 3. Efecto de la inhibición de los canales DV y la reversión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en el *undershoot* generado después de lavar cafeína. Cada experimento fue comparado con su propio control

	Control	D600 30 μM	Control	Sustitución del NaCl por KCl
Valores del <i>undershoot</i> (s)				
Duración	199.97 \pm 9.63	231.80 \pm 41.22	132.10 \pm 11.10	114.35 \pm 14.38
Caída	27.18 \pm 6.39	35.63 \pm 6.04	21.87 \pm 1.89	28.53 \pm 3.63
Recuperación	172.79 \pm 27.14	196.17 \pm 41.20	99.75 \pm 6.28	85.83 \pm 12.36
$[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nM)				
Decremento	90 \pm 16	83 \pm 18	108 \pm 37	133 \pm 24

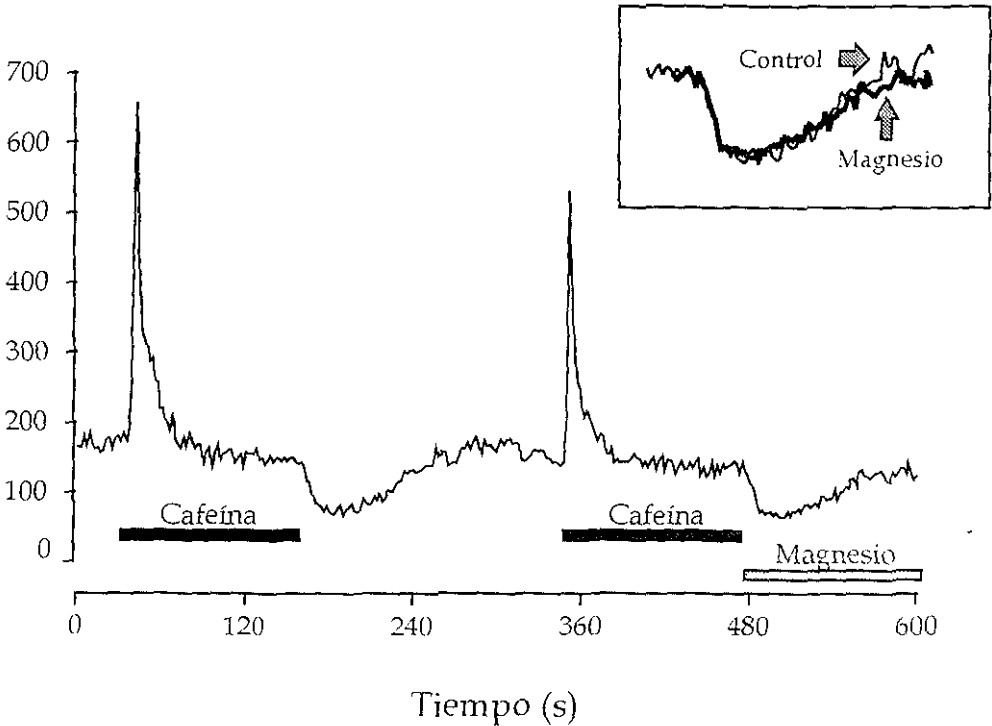
La adición de 25 μM de benzamil amilorida inhibió la respuesta de la inversión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ inducida por la sustitución de NaCl en el medio por 143 mM de cloruro de colina ($n=8$, Fig. 18). La preincubación durante 8 minutos con 25 μM de benzamil amilorida no altero al *undershoot* ($n=8$, tabla 4).

Tabla 4. Efecto de la inhibición del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ con benzamil amilorida en el *undershoot* generado al lavar cafeína. Cada experimento fue comparado con su propio control.

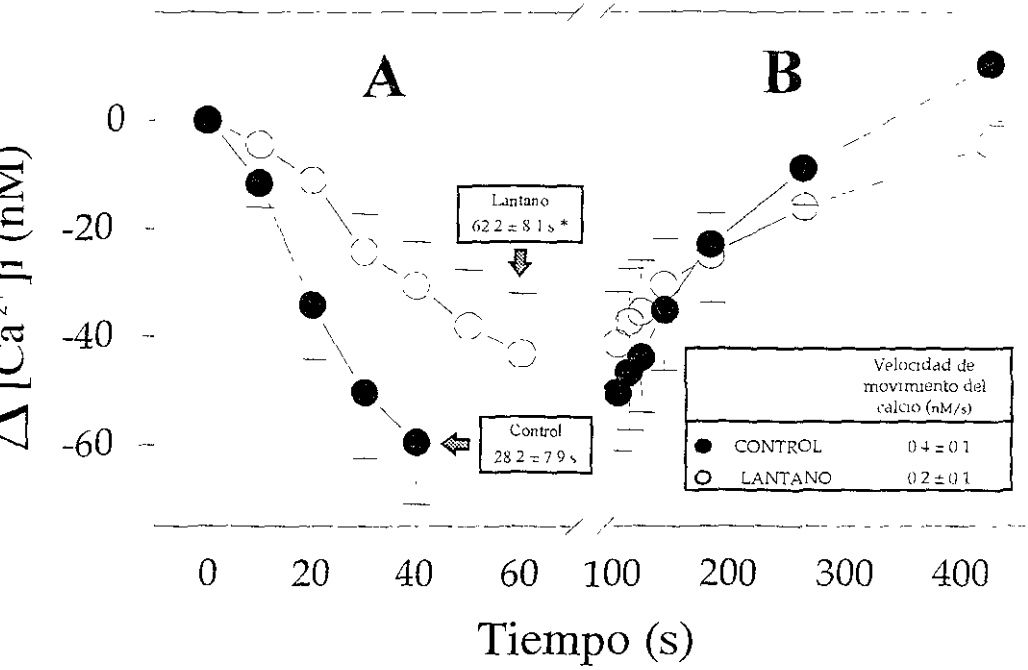
	Control	Benzamil amilorida 25 μM
Valores del <i>undershoot</i> (s)		
Duración	157.86 \pm 41.33	140.58 \pm 42.41
Caída	16.08 \pm 3.41	25.76 \pm 3.09
Recuperación	141.79 \pm 40.36	133.65 \pm 47.70
$[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nM)		
Decremento	85 \pm 13	84 \pm 32

EFFECTO DEL MAGNESIO, LANTANO Y NÍQUEL EN EL UNDERSHOOT

La incubación de las células de MLVA con 4 mM de magnesio o 200 μ M de lantano no produjo modificaciones en la basal de $[Ca^{2+}]_i$. El magnesio no modificó al undershoot ($n=4$, Fig. 19). El lantano retardó significativamente el curso temporal del decremento inicial de las $[Ca^{2+}]_i$ durante el undershoot, pero sin modificar a la recuperación ($p<0.005$, $n=6$, Fig. 20).



Registro original del efecto del magnesio (4 mM) en el undershoot generado por el lavado de catenas aisladas de ML traqueal de bovino. El inserto muestra los registros sobrepuestos del undershoot idénticos a la figura inferior.

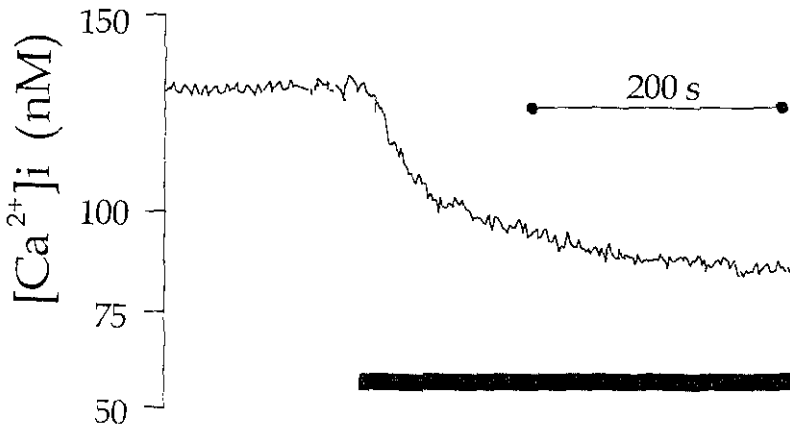


10. Efecto del lantano en el *undershoot* generado por el lavado de cafeína en células aisladas de ML real de bovino. **A)** Curso temporal del decremento de $[Ca^{2+}]_i$ durante el *undershoot* en KRH normal (los negros) y medio adicionado con lantano (0.2 mM, círculos blancos). Las flechas señalan el punto donde se obtuvo el decremento máximo con su respectivo valor. **B)** Continuación del curso temporal del *undershoot* desde el inicio de la recuperación. $n=6$, $*p<0.005$.

La incubación con níquel (1 mM) disminuyó las $[Ca^{2+}]_i$ hasta alcanzar una nueva basal después de 5 min (79 ± 11 nM, $n=6$, Fig. 21). La remoción del níquel restauró las $[Ca^{2+}]_i$ iniciales (Fig. 22A)

Se ha propuesto que el níquel induce el apagado del Fura-2 (Merrit y col., 1989). Sin embargo, como se puede ver en la figura 22A, las señales de 340 y 380 nm durante la perfusión con níquel no fueron modificadas.

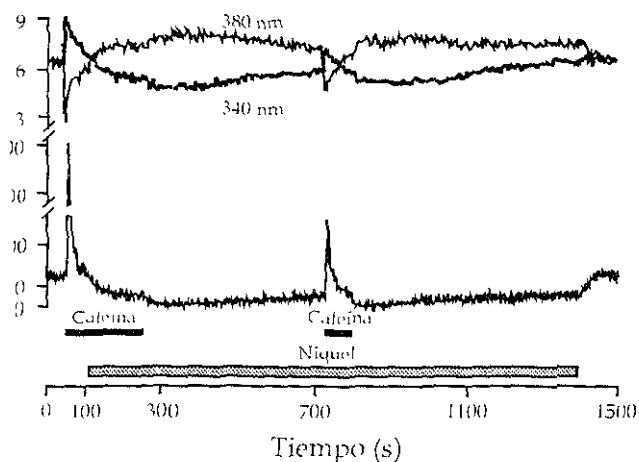
La incubación continua con 1 mM de níquel produjo una reducción significativa del $71.4 \pm 3.3\%$ de la respuesta a cafeína ($p < 0.01$, control = 620 ± 101 nM, níquel = 167 ± 28 nM, $n = 13$, Fig. 22A y B). Esta reducción no fue progresiva, pues estimulaciones repetidas con esta metilxantina generaron respuestas similares (Fig. 22B). La velocidad de recuperación del *undershoot* en presencia de níquel fue significativamente menor tanto en un medio normal ($p < 0.001$, 1.8 ± 0.3 nM/s, $n = 8$; con níquel = 0.1 ± 0.02 nM/s, $n = 8$) como en un medio despolarizante ($p < 0.01$, 1.3 ± 0.4 nM/s, $n = 4$; con níquel = 0.2 ± 0.1 nM/s, $n = 4$) con respecto al control sin níquel.



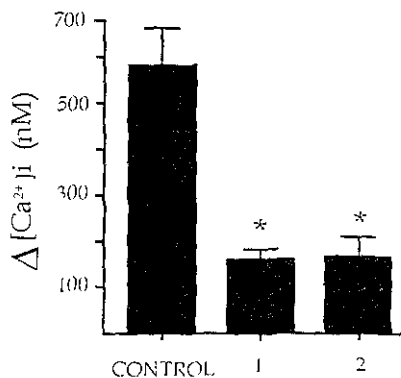
21. Curso temporal de efecto del níquel (1 mM, barra) en la basal de $[Ca^{2+}]_i$ en una célula de ML traqueal bovino

EFFECTO DEL CONTENIDO DE Ca^{2+} DEL RS EN LA ENTRADA DE Ca^{2+} EXTRACELULAR

Durante la incubación de las células en medio sin Ca^{2+} se observó un decremento significativo de la respuesta a cafeína desde los 2 min de iniciada la perfusión del medio sin Ca^{2+} ($p < 0.05$, $n = 6$; Fig. 23A y B). La incubación por mas de 10 min en medio sin Ca^{2+} , vació el contenido de este ión en el RS (Fig. 23B). La adición de 2 mM de Ca^{2+} a los 2, 4, 6 min de iniciada la incubación en un medio sin Ca^{2+} , produjo una entrada de Ca^{2+} extracelular que fue

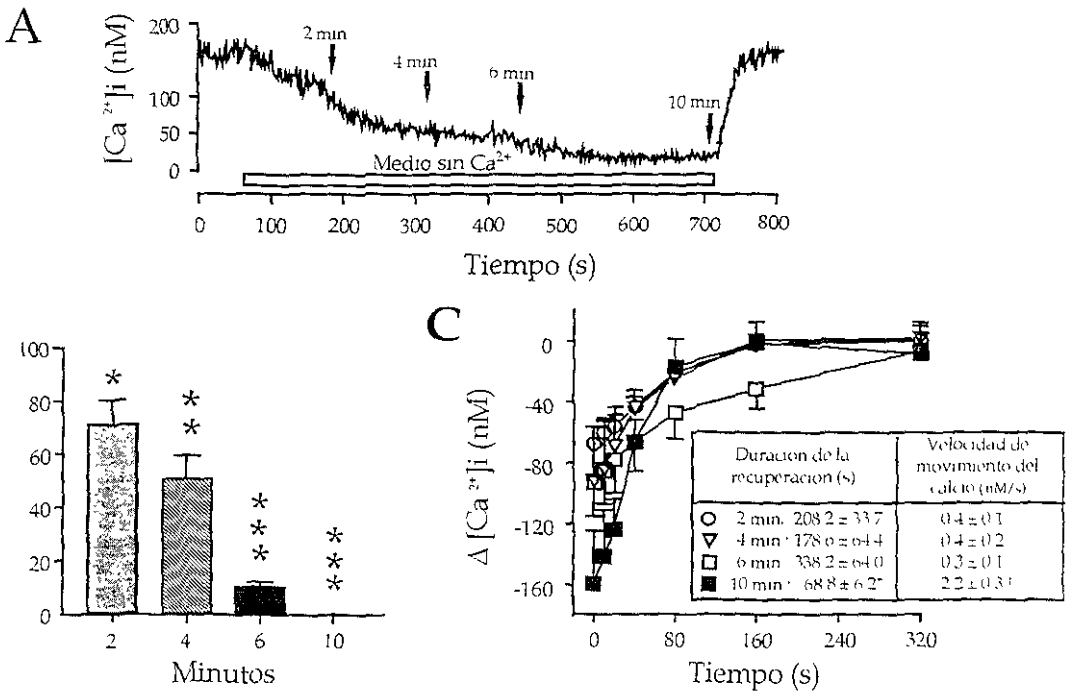


B



! Efecto del níquel en la respuesta a cafeína y el *inhibitor* en células aisladas de MI, traqueal de A) Registro original del efecto del níquel (1 mM) en el $[Ca^{2+}]_i$ y en la respuesta a cafeína (10 mM). B) Su máxima a la cafeína en medio normal y la primera (1) y segunda (2) respuestas en presencia de

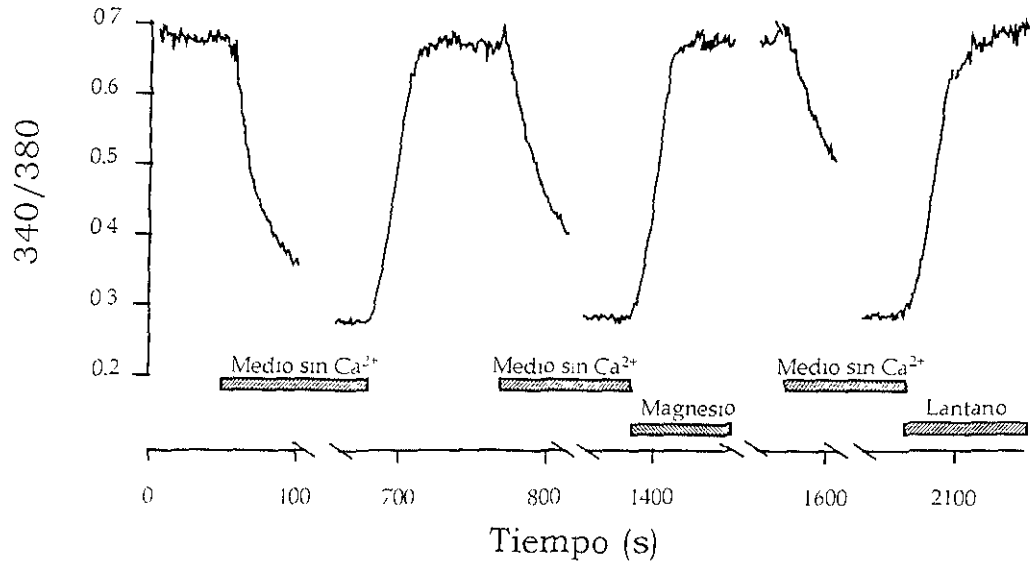
similar en los tres tiempos estudiados, es decir, que el tiempo necesario para alcanzar la basal de las $[Ca^{2+}]_i$ previa a la incubación en un medio sin Ca^{2+} no fue diferente, así como la velocidad de movimiento de este ión. Sin embargo, a los 10 min, la entrada de Ca^{2+} extracelular fue mucho más rápida ($p < 0.05$, $n=6, 5, 6$ y 5 para 2, 4, 6 y 10 min; Fig 23C).



23. Efecto del contenido de Ca^{2+} del RS en la recuperación de los niveles basales de las $[Ca^{2+}]_i$ en células aisladas de ML traqueal de bovino. **A)** Registro original de un miocito incubado en medio sin Ca^{2+} . La recuperación de las $[Ca^{2+}]_i$ se inició al añadir 2 mM de Ca^{2+} al medio. **B)** Respuestas inducidas por la adición de Ca^{2+} (10 nM) en diferentes tiempos de iniciada la incubación en medio sin Ca^{2+} . El control que se utilizó para obtener los porcentajes correspondió a la respuesta a Ca^{2+} en medio con Ca^{2+} después del experimento ($n=6$). **C)** Curso temporal de la recuperación de la basal de $[Ca^{2+}]_i$ de acuerdo a los diferentes tiempos de incubación en medio sin Ca^{2+} ($n=6, 5, 6$ y 5 para 2, 4, 6 y 10 min respectivamente; $p < 0.05, 0.01$ y 0.001 respectivamente en comparación con la respuesta en medio con Ca^{2+} ; $p < 0.05$).

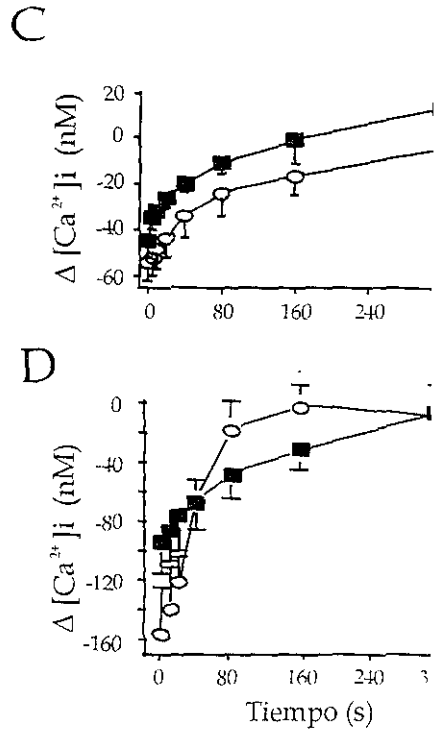
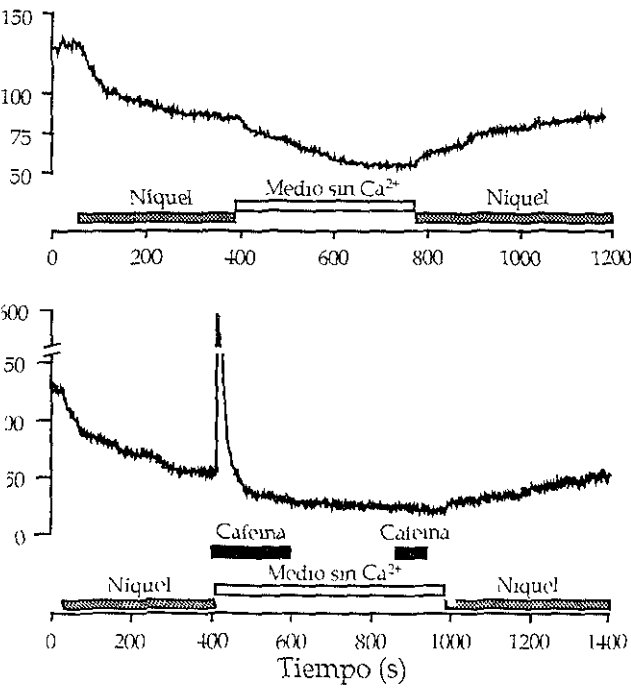
EFFECTO DEL MAGNESIO, LANTANO Y NIQUEL EN LA ENTRADA DE Ca^{2+} EXTRACELULAR EN CÉLULAS CON EL RS VACÍO

La presencia de magnesio (4 mM) o lantano (0.2 mM) no modificaron la entrada de Ca^{2+} extracelular en células incubadas por 10 min en medio sin Ca^{2+} ($n=4$, Fig. 24). Sin embargo, el níquel (1 mM) disminuyó significativamente la entrada de Ca^{2+} de 2.2 ± 0.3 nM/s ($p < 0.001$; control. $n=5$) a 0.1 ± 0.03 nM/s (níquel: $n=5$). Adicionalmente observamos que la entrada de Ca^{2+} en células incubadas durante 6 min en medio sin Ca^{2+} el níquel también modificó



24. Efecto del magnesio (4 mM) y el lantano (0.2 mM) en la entrada de Ca^{2+} extracelular después de ar el contenido de Ca^{2+} del RS con estimulaciones con cateína en medio sin Ca^{2+} en células aisladas de traqueal de box mo

significativamente, esta entrada (0.2 ± 0.03 nM/s; Fig. 25). Cabe destacar que en ambos grupos la presencia de níquel produjo que la entrada de Ca^{2+} fuera similar.



5. Efecto del níquel (1 mM) en la recuperación de los niveles basales de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ después de incubar medio sin Ca^{2+} a células aisladas de ML traqueal de bovino. Registros originales de micetos incubados con níquel en medio sin Ca^{2+} por 6 min (A) y medio sin Ca^{2+} por 10 min, con estimulaciones con cafeína (B). La recuperación de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se inició al añadir 2 mM de Ca^{2+} y níquel al medio. C) Cursos temporales de recuperación de las basales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Los cuadrados corresponden a A y los círculos a B ($n=5$). D) Cursos temporales de la recuperación de las basales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en los controles sin níquel a los 6 min ($n=6$, cuadrados) y 10 min ($n=5$, círculos) de incubar las células en medio sin Ca^{2+} .

ESTUDIOS *in vitro* EN EL ML TRAQUEAL DE BOVINO

REGISTRO SIMULTÁNEO DE LOS CAMBIOS EN EL Ca^{2+} CITOSÓLICO Y LA CONTRACCIÓN DE TIRAS DE ML DE BOVINO

La administración de carbacol (10 μ M) a las tiras de ML traqueal produjo una respuesta bifásica del Ca^{2+} intracelular, un pico transitorio seguido de una meseta similar al de las células aisladas (Fig 26A y B). Aunque las $[Ca^{2+}]_i$ se mantuvieron en menos del 50% del valor inicial, el carbacol produjo una contracción sostenida en las tiras de ML (Fig. 26B). Cuando el tejido fue incubado en un medio sin Ca^{2+} , solo se observó el pico inicial y las

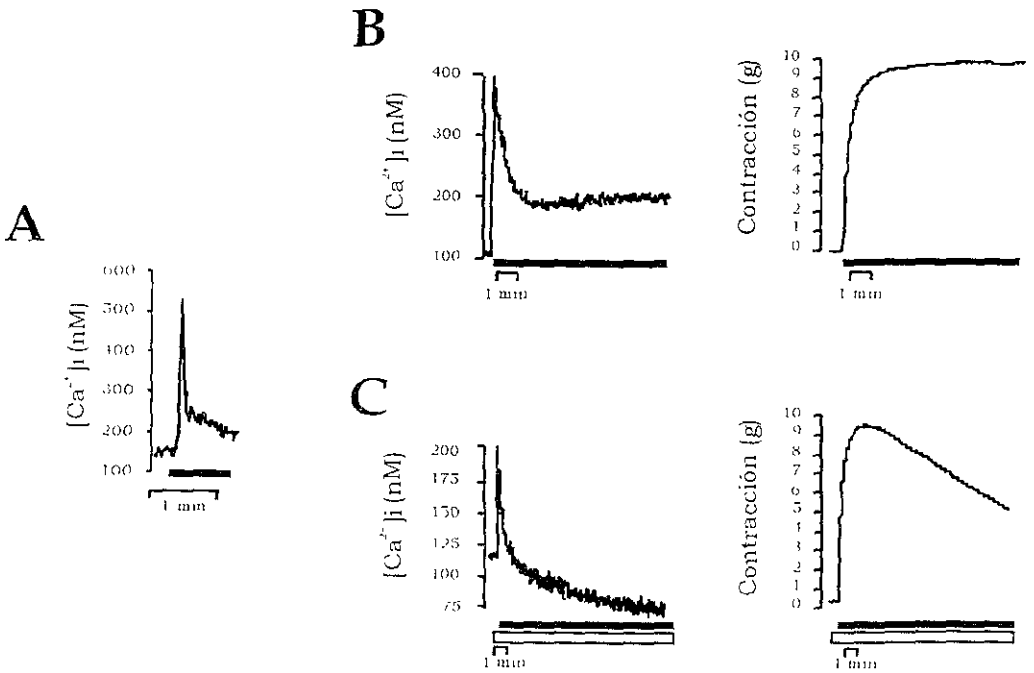


Fig. 26. Trazos representativos de las respuestas producidas en bovino por carbacol en una célula aislada (A) y en una tira de ML traqueal en un medio con Ca^{2+} (B) así como en un medio sin Ca^{2+} (C). El primero y segundo trazo de las figuras B y C muestran los registros simultáneos de las $[Ca^{2+}]_i$ y la contracción en la misma preparación. La barra negra representa la adición de carbacol (10 μ M) y la barra blanca el medio sin Ca^{2+} que fue añadido 5 min antes del carbacol.

Una vez que se abatieron las respuestas a la histamina de los anillos bronquiales estimulados en medio sin Ca^{2+} , la adición de carbacol ($n=6$) indujo una contracción sostenida (Fig. 28B y C). La preincubación con $10 \mu\text{M}$ de ACP decrementó significativamente la contracción sostenida de los anillos bronquiales inducida con carbacol una vez que se les había vaciado el contenido de Ca^{2+} de los almacenes sensibles a histamina ($n=7$; Fig. 29A). Por otro lado, la preincubación con ACP bloqueó parcialmente la primer respuesta sostenida inducida por histamina en medio sin Ca^{2+} ($n=7$, Fig. 29B).

La preincubación de los anillos bronquiales con EGTA 1 mM (30 min en medio sin

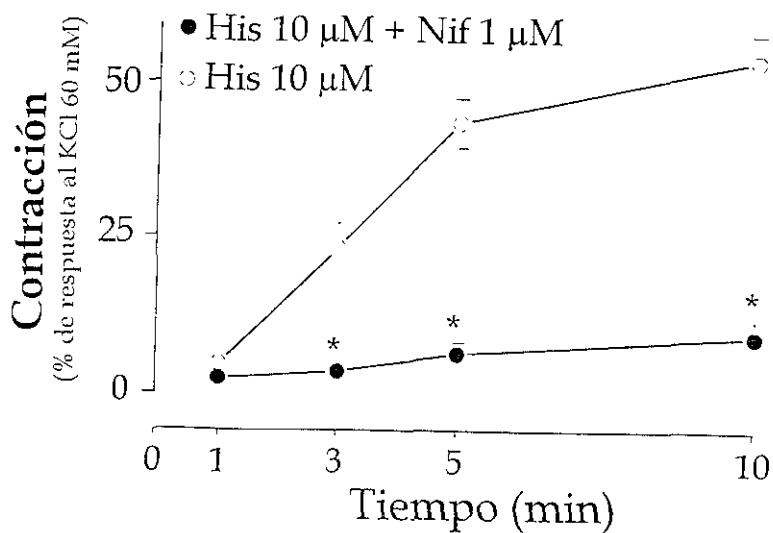
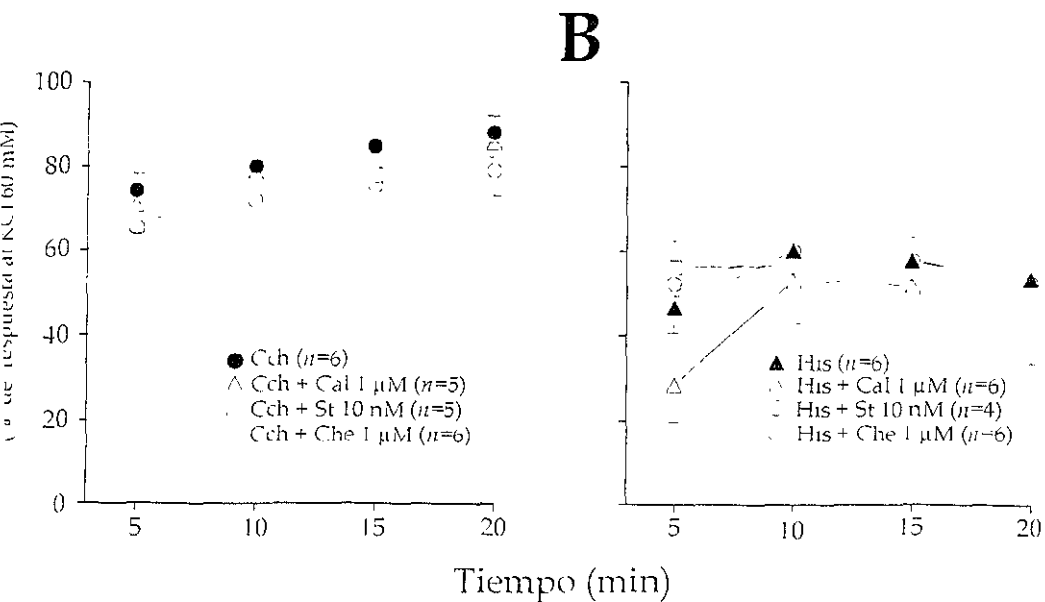


Fig. 30. Efecto de la preincubación con nifedipina (Nif, 10 min) en la contracción sostenida de los anillos bronquiales inducida por histamina (His) en medio sin Ca^{2+} . $n=6$, * $p<0.01$.

Ca^{2+} , $n=4$) disminuyó significativamente la primer respuesta a la histamina en medio sin Ca^{2+} (Fig. 29B). La adición de $1 \mu\text{M}$ de nifedipina ($n=6$) también inhibió la contracción inducida por histamina en medio sin Ca^{2+} (Fig. 30).

EFFECTO DE LA PKC EN LA CONTRACCIÓN DE LOS ANILLOS BRONQUIALES INDUCIDA POR CARBACOL Y POR HISTAMINA EN MEDIO SIN Ca^{2+}

La contracción inducida por carbacol y por histamina en los anillos bronquiales no se modificó con la presencia de $1 \mu\text{M}$ de callostina C (Fig. 31; $n=5$ y 6 , respectivamente), 10 nM de estaurosporina ($n=5$ y 4 , respectivamente) o $1 \mu\text{M}$ de chelitrina ($n=6$)



Efectos de la callostina C (Cal), la estaurosporina (St) y la chelitrina (Che) en la contracción de los anillos bronquiales inducida por A) carbacol (Cch) y B) histamina (His) en medio sin Ca^{2+} .

DISCUSIÓN

PARTE I:

REGULACIÓN DE LAS $[Ca^{2+}]_i$ EN LAS CÉLULAS AISLADAS DE MLVA

La ausencia de Ca^{2+} del medio extracelular de las células de MLVA de bovino produjo una disminución continua de las $[Ca^{2+}]_i$ hasta generar un nuevo estado basal. De manera simultánea, el contenido de Ca^{2+} del RS también fue disminuyendo. Esto podría sugerir que tanto en la membrana plasmática como en la del RS de estas células existe una salida importante de Ca^{2+} y que, debido a que no fue modificada por la despolarización, esta no depende del potencial de membrana. Se ha propuesto en el ML vascular, donde el RS es una estructura muy cercana a la membrana plasmática, que el RS funciona como una barrera superficial amortiguadora (BASA) de Ca^{2+} entre el medio extracelular y el mioplasma (van Breemen y col., 1995). En este modelo, el Ca^{2+} primero entra al espacio subplasmático, zona localizada entre el RS y la membrana plasmática y pasa al RS antes de difundirse hacia el mioplasma. Este mismo fenómeno se ha observado recientemente en el MLVA de perro (Janssen y col., 1999). Nosotros observamos que la salida de Ca^{2+} de la célula fue más rápida cuando el contenido de Ca^{2+} del RS fue vaciado con cafeína, una sustancia que libera Ca^{2+} de este almacén (Pessah y col., 1987, Baró y col., 1993). Esto podría indicar que la BASA de Ca^{2+} también puede funcionar en el sentido inverso, esto es, que el RS podría regular la salida de este ión de la célula y por eso cuando este es vaciado con cafeína, el RS reduce su capacidad de amortiguación y el Ca^{2+} citosólico se sale fácilmente de la célula en el medio sin Ca^{2+} .

Al retirar a la cafeína del medio de perfusión se produjo siempre un decremento reversible y transitorio de las $[Ca^{2+}]_i$. Este fenómeno conocido como *undershoot* ya se había observado en el ganglio simpático de sapo (Friel y Tsien, 1992), en el ML vascular y ventricular de rata (Baró y col., 1993), en las neuronas mientéricas (Kimball y col., 1996), el ML de vejiga urinaria (Ganitkevich e Isenberg, 1992; Yoshikawa y col., 1996) y el MLVA de cobayos (Sims y col., 1996). Algunos de estos autores concluyeron que el *undershoot* es resultado de la captura de Ca^{2+} por el RS (Friel y Tsien, 1992; Baró y col., 1993; Ganitkevich e Isenberg, 1992; Sims y col., 1996). Nuestros resultados confirman esta interpretación pues el ACP (5 μ M) inhibió completamente al *undershoot* (Datos no mostrados).

La cafeína inhibió la respuesta al carbacol en las células de MLVA de bovino. Wang y colaboradores (1997) demostraron en el ML traqueal de caballo que para producirse la respuesta a la acetilcolina es necesaria la liberación de Ca^{2+} del RS. Es probable entonces que la inhibición de la respuesta al carbacol, producida por la cafeína, se haya debido a la falta de Ca^{2+} en el RS. Sin embargo, la inhibición que produce la cafeína en la fosfodiesterasa del AMPc pudo contribuir también a la inhibición de la respuesta al carbacol. El incremento del AMPc activa a la cinasa de proteina A, lo cual resulta en una inhibición de la fosfolipasa C, y consecuentemente en una disminución en la producción de IP_3 (Ding y col., 1997; Prestwich y Bolton, 1995) además se ha propuesto que esta cinasa de proteina A fosforila al receptor de IP_3 disminuyendo su actividad (Ding y col., 1997; Prestwich y Bolton, 1995). En este trabajo observamos que la incubación con cafeína relaja la contracción inducida por KCl de las asas de músculo liso traqueal de bovino probablemente por la acumulación de AMPc.

Además, comprobamos que la inducción directa de la formación de AMPc con forskolina, un agonista de la adenilato ciclasa, inhibió el 50% de la respuesta al carbacol en las células aisladas de MLVA. Estos resultados sugieren que además del vaciado de calcio del RS, el incremento en el AMPc producido por la cafeína contribuye al abatimiento de la respuesta al carbacol y que la anulación de la respuesta del carbacol se debía a que el RS se encontraba vacío por efecto de la cafeína.

LA RECUPERACIÓN DEL *UNDERSHOOT*

En la actualidad se desconocen los mecanismos involucrados en la recuperación de la basal del Ca^{2+} citosólico durante el *undershoot*. Nuestra hipótesis fue que el Ca^{2+} involucrado en esta recuperación provenía del medio extracelular. De hecho si fuese así, la teoría de la BASA de Ca^{2+} podría explicar el lento incremento de las $[Ca^{2+}]_i$ durante la recuperación del *undershoot*, debido a que el Ca^{2+} que entra a la célula es capturado primero por el RS antes de llegar al mioplasma. En este sentido, observamos que la recuperación del *undershoot* fue bloqueada en medio sin Ca^{2+} , lo que confirmaría su origen extracelular. En el MLVA, como en otras células excitables, la vía de entrada de Ca^{2+} más importante es a través de los canales de Ca^{2+} DV (Dolphin, 1996; Bourreau y col., 1991). De hecho se ha demostrado una vía directa para el relleno de Ca^{2+} del RS a través de los canales DV tipo L en el MLVA de perro estimulado con acetilcolina (Bourreau y col., 1991). Sin embargo, nosotros comprobamos que la inhibición con D600 o la inactivación de los canales de Ca^{2+} DV inducida por una despolarización sostenida con alto KCl en las células MLVA de bovino, no modifica la recuperación del *undershoot*. Probablemente esta vía

directa propuesta por Bourreau y colaboradores (1991) es activada sólo por agonistas como la acetilcolina y no por la cafeína.

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ha sido relacionado con la regulación de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ al mantener la homeostasis de Ca^{2+} del espacio subplasmático de las células de ML vascular (van Breemen y col., 1995). No obstante, la participación del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en la regulación de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el MLVA ha sido cuestionada por otros autores (Fleishmann y col., 1996; Janssen y col., 1997). En este contexto, la inhibición del intercambiador con benzamil o la inducción de la inversión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ al sustituir NaCl con KCl (Baartscheer y col., 1996) no modificaron al *undershoot*, sugiriendo que este transportador no participa en este fenómeno.

Para caracterizar los posibles mecanismos involucrados durante el *undershoot* utilizamos níquel, un metal ampliamente utilizado como bloqueador de canales de Ca^{2+} . El níquel tiene la ventaja de que produce efectos reversibles, no forma precipitados insolubles. Se sabe que, a bajas concentraciones, el níquel ($<1\text{mM}$) es capaz de inhibir los canales de Ca^{2+} tipo T de células del nódulo sino-atrial y neuronas sensoriales (Fox y col., 1987; Hagiwara y col., 1988) y a altas concentraciones ($>1\text{mM}$) las corrientes de los canales tipo L en ML vascular (Blackburn y Highsmith, 1990). En miocitos traqueales de bovino, Madison y colaboradores (1998) determinaron que el níquel decrecienta la basal de Ca^{2+} a concentraciones de 0.3 mM y alcanza su máximo con 2 mM , pero ninguna de estas concentraciones vacía completamente el contenido de Ca^{2+} del RS. En este trabajo determinamos que el níquel (1 mM) es capaz de generar un nuevo estado basal con bajas concentraciones de Ca^{2+} tanto en el citosol como en el RS, que dura por horas y es reversible. De hecho estos resultados con níquel sugieren que la entrada pasiva de Ca^{2+} en

estas células es muy importante. Adicionalmente, el níquel inhibió la recuperación del *undershoot*, por lo que la entrada de Ca^{2+} por la vía sensible al níquel de alguna forma esta participando en este fenómeno.

Se ha propuesto que el níquel inhibe la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares (Nasu y col., 1993; Hughes y Schachter, 1994). Si esto fuera cierto, conforme el níquel ingresara a la célula se hubieran disminuido las señales del Fura-2 en vista de que este metal provoca cambios conformacionales en el marcador fluorescente que lo "apagan" (Shibuya y Douglas, 1992). Ya que no se observó este decremento, podemos descartar un efecto directo del níquel en el interior de célula, por lo que se restringe la acción del níquel a sus efectos en la membrana plasmática.

En las células no excitables, Putney (1986, 1997) propuso la *Teoría de la entrada capacitativa de Ca^{2+}* que plantea un mecanismo en donde se genera el ingreso de Ca^{2+} extracelular cuando se vacían los almacenes intracelulares de este ión. Esta vía de entrada de Ca^{2+} se activa cuando los almacenes se vacían y se inactiva cuando se llenan. En el ML de tráquea de humano se ha descrito un incremento continuo de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ debido a la entrada de Ca^{2+} después de vaciar al RS, de la misma forma como sucede con la entrada capacitativa de Ca^{2+} descrita en células no excitables (Amrami y col., 1995). Debido a que comprobamos que la cafeína vacía el contenido de Ca^{2+} del RS, consideramos posible que la recuperación del *undershoot* pudiera deberse a la entrada capacitativa de Ca^{2+} . Se ha demostrado que el níquel inhibe parcialmente la entrada capacitativa de Ca^{2+} (Floth y Jenner, 1993). Nosotros encontramos que 1 mM de níquel retraso considerablemente la recuperación del *undershoot*. Sin embargo, la incubación con otros inhibidores de la entrada capacitativa como el magnesio (4 mM) y el lantano (0.2 mM) a concentraciones

capaces de bloquear la entrada capacitativa en los ML traqueal y vascular (Yang, 1998; Yoshimura y col., 1996), no afectaron la recuperación del *undershoot*. Asimismo estos cationes, magnesio y lantano, no afectaron la basal de Ca^{2+} como en el caso del níquel, lo que pudiese indicar que los primeros no comparten la inhibición de los mismos canales de Ca^{2+} que el níquel. Es probable entonces que la vía de entrada de Ca^{2+} sensible al níquel, posiblemente una vía pasiva de entrada de Ca^{2+} , sea la vía que este participando de manera importante en la recuperación del *undershoot*. Otra hipótesis es que la entrada capacitativa de Ca^{2+} en estas células sea a través de canales insensibles a lantano y magnesio. Se necesitan más experimentos para comprobar ambas hipótesis.

En este trabajo se demostró que el lantano (0.2 mM) produjo un retraso del decremento máximo al inicio del *undershoot*. Es conocido que este decremento depende totalmente de la bomba de Ca^{2+} del RS. Previamente, Ganitkevich e Isenberg (1992) observaron que el uso de 3 mM de lantano bloqueó totalmente al *undershoot*. Se sabe que este catión es permeable a las células de ML vascular a concentraciones superiores a 0.25 mM (Shibuya y Douglas, 1992; Shimizu y col., 1997). Aunque utilizamos una concentración de este catión que supuestamente evita que entre en la célula (0.2 mM) (Shimizu y col., 1997), al retrasar el inicio del *undershoot*, sugiere que esta concentración de lantano penetra a la célula y probablemente inhibe a la bomba de Ca^{2+} del RS, por lo que no es recomendable utilizar esas concentraciones para estudiar este fenómeno.

REGULACION DE LA ENTRADA DE Ca^{2+} POR EL CONTENIDO DE Ca^{2+} DEL RS

Existen pocos trabajos donde se estudia la relación entre el contenido de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares y la regulación de la entrada de este ion a la célula. En este

sentido, se sabe que en células no excitables hay una relación entre la cantidad de Ca^{2+} del almacén y el curso temporal de la entrada de este ión (Jacob, 1990; Montero y col., 1993). En las células de MLVA de bovino se observó que la perfusión de medio sin Ca^{2+} produjo una disminución de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y que la reposición de Ca^{2+} al medio de perfusión (2 mM), produjo un incremento de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hasta alcanzar la basal inicial. El incremento de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tuvo la misma velocidad independientemente de que el contenido de Ca^{2+} del RS fuese del 10 o del 80%, pero se volvía mucho más rápida cuando se vaciaba completamente este almacén (Fig. 23). Las diferencias significativas en la velocidad del incremento de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pudiesen reflejar la activación de un mecanismo diferente de entrada de Ca^{2+} entre las células con el RS parcialmente vacío, con las que tienen este almacén totalmente vacío. El níquel inhibió la recuperación a la basal de las células con el RS parcial o totalmente vacío, sugiriendo que todos estos mecanismos comparten la sensibilidad a este catión. De esta manera el níquel, al ser una herramienta inespecífica, nos impidió diseccionar farmacológicamente los mecanismos que pudieran diferenciar la entrada de Ca^{2+} cuando el RS estaba parcialmente vacío de cuando estaba totalmente vacío. Sin embargo, el magnesio, otro catión con efectos muy similares al níquel como inhibidor de la entrada capacitativa (Yoshimura y col., 1996), no afectó a la recuperación de las células con el RS vacío. Adicionalmente, el lantano, potente bloqueador de las corrientes de entrada capacitativa de Ca^{2+} , la bomba de Ca^{2+} plasmática y prácticamente cualquier entrada y salida de Ca^{2+} (Hoth y Penner, 1993; Hille, 1991) tampoco afectó a la recuperación de las células con RS vacío. Estos resultados con lantano y magnesio sugieren que es probable que en estas células los canales que están participando en la entrada capacitativa de Ca^{2+} sean de un subtipo insensible a lantano y magnesio. Hartman y col.

una gran acumulación de fosfatos de inositol en el MLVA de perro (Bazán-Perkins y col., 1998, Carbajal, 1998). No obstante, en este mismo tejido la histamina no induce un incremento significativo en la acumulación los fosfatos de inositol, sugiriendo que este autacoide moviliza pobremente Ca^{2+} del RS (Bazán-Perkins y col., 1998; Carbajal, 1998). La deficiente producción de fosfatos de inositol generada por la histamina coincide con la pequeña respuesta de contracción del ML en perro y bovino inducida por este agonista en el medio sin Ca^{2+} . Podemos entonces sugerir que la contracción sostenida de los anillos bronquiales de perro inducida por la histamina en un medio sin Ca^{2+} moviliza este ión de una fuente diferente a la relacionada con los receptores a IP_3 del RS.

La posible existencia de otro almacén de Ca^{2+} en la contracción sostenida de los anillos bronquiales inducida por histamina esta apoyada en el hecho de que el carbacol aún produce una respuesta sostenida en tejidos a los que previamente se les agotó el contenido de Ca^{2+} de los almacenes sensibles a este autacoide. Esta respuesta al carbacol fue bloqueada con ACP, lo que sugiere que este almacén es el RS. Altas concentraciones de EGTA (1 mM) pueden bloquear la contracción generada por carbacol que no se inhibió con ACP (Montaño y col., 1996), apoyando la hipótesis de que el Ca^{2+} proviene de dos fuentes, el RS (sensible a ACP) y una probable fuente en la membrana extracelular sensible a EGTA (1 mM) (insensible a ACP). Es probable que la disección del ML pueda dañar esta fuente y por eso solo se observa en bronquios (Montaño y col., 1996). Esta fuente extracelular de Ca^{2+} podrían ser las caveolae, invaginaciones de la membrana de 50-100 nm observadas en células de ML de útero, intestino delgado y vasos sanguíneos así como endotelio pulmonar, músculo cardíaco y fibroblastos (Fujimoto 1993; Schnitzer y col., 1995; Isshiki y Anderson, 1999). Recientemente Darby y colaboradores (1997) encontraron que en la parte

de la membrana plasmática del ML de tráquea de perro se marcó intensamente con caveolina, un marcador para caveolae, sugiriendo la presencia de caveolae en este tejido. Adicionalmente estos investigadores encontraron que estas caveolae contienen grandes cantidades de canales de Ca^{2+} tipo L, bombas de Ca^{2+} de membrana plasmática, calsequestrina y calreticulina, estas dos últimas proteína a la que se unen el Ca^{2+} (Darby y col., 1997 y 2000; Shaul y Anderson, 1998). Igualmente, se ha demostrado que las caveolae son sitios de la membrana plasmática donde se encuentran una gran variedad de moléculas relacionadas con la transducción de señales. proteínas G, fosfoinosítidos, receptores a IP_3 y algunas enzimas relacionadas con fosfoinosítidos (Hope y Pike, 1996, Li y col., 1995; Song y col., 1996 y 1997; Shaul y Anderson, 1998,). Debido a que en el ML el RS es una estructura muy superficial, hay espacios de gran proximidad entre las caveolae y el RS (Gabella, 1981). En su conjunto todas estas evidencias podrían sugerir que el MLVA está provisto de caveolae que podrían funcionar como almacenes de Ca^{2+} para contribuir con este ión durante la contracción sostenida. A favor de esta hipótesis, Shaul y Anderson (1998) y Isshiki y Anderson (1999) recientemente propusieron que las caveolae parecen estar involucradas en la regulación de señales de Ca^{2+} en la superficie celular.

Por otro lado, Wheeler-Clark y Buja (1995) demostraron que el glicocalix de células de ML vascular de perro puede servir como una superficie restringida que evita la pérdida de Ca^{2+} extracelular en las vecindades de la célula en medio sin Ca^{2+} . En los anillos bronquiales la presencia de este mecanismo podría explicar por qué los almacenes de la membrana extracelular mantienen su contenido de Ca^{2+} en medio sin Ca^{2+} . La liberación de Ca^{2+} de estos depósitos podría estar asociada a la apertura de canales de Ca^{2+} tipo L. En este contexto, se ha demostrado que la nuedipina (1 μM) bloquea la contracción sostenida

producida por carbacol en medio sin Ca^{2+} en los anillos bronquiales de perro (Montaño y col, 1996), sugiriendo que los canales de Ca^{2+} tipo L de estos almacenes extracelulares pudiesen estar involucrados. Esto implica que el carbacol induce la apertura de los canales de Ca^{2+} DV (Janssen, 1997) La estimulación de los receptores H_1 tienen una acción similar, pues la respuesta sostenida inducida por la histamina en un medio sin Ca^{2+} fue bloqueada completamente con nifedipina ($1 \mu\text{M}$). Por otra parte, la adición de 1 mM de EGTA con el objetivo de reducir la cantidad de Ca^{2+} del almacén extracelular de Ca^{2+} , inhibió totalmente la contracción sostenida de los anillos bronquiales generada por histamina. Esto indica que la histamina probablemente movilizó Ca^{2+} de los almacenes extracelulares.

La posible fuente de Ca^{2+} extracelular sensible a histamina requiere de la actividad de la bomba de Ca^{2+} sensible a ACP, pues este inhibidor bloquea el 47% de la contracción sostenida inducida por histamina en medio sin Ca^{2+} . Esta inhibición fue menor a la observada en el caso del carbacol (82%), mostrando que la bomba de Ca^{2+} presente en estos almacenes extracelulares es menos sensible al ACP que los del RS. Además esto podría indicar que la actividad de la bomba de Ca^{2+} de los almacenes de la membrana extracelular para la movilización de Ca^{2+} es menos importante cuando el RS no es vaciado por la formación de inositoles. Por otro lado, la inhibición de la respuesta a la histamina inducida por el ACP en medio sin Ca^{2+} también pudiera ser explicada por el incremento inicial de Ca^{2+} , debido a la apertura de los canales de Ca^{2+} tipo L de los almacenes de la membrana extracelular, que parcialmente movilizarían el Ca^{2+} proveniente de los canales de Ca^{2+} sensibles a ranodina. Estos receptores han sido observados en el RS del MII VA (Yamaguchi y col., 1995)

La cantidad de Ca^{2+} intracelular requerida para mantener la contracción sostenida debe ser pequeña. Durante un estímulo colinérgico en las tráqueas de perro y bovino, las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se incrementan transitoriamente y descienden a niveles ligeramente superiores sobre la basal inicial, mientras la contracción es sostenida todo el tiempo (Takuwa y col., 1987; Yang y col., 1993b). Este fenómeno fue atribuido a la PKC debido a que esta proteína reduce el requerimiento de Ca^{2+} intracelular para mantener la contracción (Park y Rasmussen, 1985; Takuwa y col., 1987). Aunque la activación de la PKC ha sido involucrada en las respuestas sostenidas del MLVA (Gerthoffer, 1991; Rossetti y col., 1995; Roux y col., 1995), no hay un acuerdo acerca de su papel. Las isoenzimas de la PKC dependientes e independientes de Ca^{2+} se encuentran en el MLVA (Donnelly y col., 1995). Sin embargo la contracción sostenida de los anillos bronquiales inducida por carbacol o histamina en medio sin Ca^{2+} no fue bloqueada por los inhibidores de la PKC calfoestina C, chelerritrina o estaurosporina sugiriendo que la PKC no está involucrada en este fenómeno.

Los antecedentes antes mencionados sugieren que el Ca^{2+} movilizado por el carbacol para la contracción sostenida del MLVA en un medio sin Ca^{2+} pudiese provenir de dos estructuras, una intracelular, el RS, y otra en la membrana plasmática, las caveolae. Recientemente Carbajal y colaboradores (1999) demostraron que la contracción sostenida de los anillos bronquiales de perro es inhibida con rojo de rutenio, un bloqueador de los canales de Ca^{2+} de RS sensibles a rianodina. Esto podría indicar que debido a la existencia de sitios donde la membrana del almacén extracelular y el RS se encuentran muy próximos (Gabella, 1983), esta organización puede generar señales locales de Ca^{2+} de gran magnitud y por períodos de tiempo más prolongados que en el resto de la célula (Kargacin, 1994). Como resultado podría liberarse Ca^{2+} localmente tanto del RS, por la

activación de receptores sensibles a rianodina, como de los almacenes extracelulares, por los canales tipo L activados por despolarización (Montaño y col., 1996) regenerando el incremento de Ca^{2+} en estos espacios y después, tras la suma de señales de origen similar, generar ondas de Ca^{2+} con posibilidad de difundirse en toda la célula (Kargacin, 1994) De esta manera después de haberse iniciado la movilización de Ca^{2+} por la acción de un agonista, la respuesta puede mantenerse generando la contracción bronquial sostenida.

En **conclusión**, nuestros resultados sugieren que la contracción sostenida de los anillos bronquiales en medio sin Ca^{2+} es independiente de la actividad de la PKC y el Ca^{2+} necesario para esta respuesta inducida por carbacol proviene de dos fuentes: la sensible a ACP (el RS) y una fuente de la membrana extracelular sensible a 1 mM de EGTA, probablemente las caveolae y el glicocalix. La histamina aparentemente sólo moviliza Ca^{2+} de la fuente de Ca^{2+} de la membrana extracelular y este almacén depende de los canales de Ca^{2+} tipo L.

PERSPECTIVAS

El Ca^{2+} es un mensajero primordial en la contracción del MLVA. El principal depósito de Ca^{2+} en la célula es el RS. Como observamos en este trabajo, este almacén tiene un importante papel como amortiguador del Ca^{2+} en la célula. También observamos que las fuentes de Ca^{2+} de la membrana plasmática, posiblemente las caveolae y el glicocalix, contienen el suficiente Ca^{2+} para mantener la contracción bronquial en un medio sin Ca^{2+} . Es probable que la fuente de Ca^{2+} de la membrana plasmática también sea un sistema de amortiguamiento de Ca^{2+} en la célula como lo es el RS. ¿Porque es tan importante que existan tantos mecanismos de amortiguamiento de Ca^{2+} en las células de MLVA? Este tejido esta involucrado fuertemente en patologías como el asma, donde el MLVA se contrae exageradamente reduciendo el calibre de las vías aéreas. En este contexto, los mecanismos que mantienen el gradiente de Ca^{2+} de 20,000 veces menor en el medio intracelular del extracelular deben ser muy eficientes para evitar que se generen respuestas patológicas en el MLVA. De esta manera cada sistema que participa en la regulación del Ca^{2+} en las células permite un mayor control en la contracción.

Sería interesante estudiar a las caveolae como un sistema de amortiguamiento de Ca^{2+} , y su posible relación con el RS. Para esto es necesario usar herramientas como el medio sin Ca^{2+} y el ACP, que nos permitan distinguir entre el Ca^{2+} de las caveolae del Ca^{2+} del medio extracelular y del Ca^{2+} del RS. Recientemente nosotros observamos que es necesaria la activación del receptor-canal de ranodina para que se lleve a cabo la contracción bronquial sostenida en un medio sin Ca^{2+} (Carbajal y col, 2000). Una pregunta a realizar sería determinar si estos receptor-canales podrían encontrarse en las caveolae y

se podría contestar ya sea utilizando un doble marcaje con anticuerpos contra los receptores de rianodina y caveolina-1, o funcionalmente estimulando con cafeína a bronquios previamente incubados con CPA en medio sin Ca^{2+}_i .

Finalmente se exploraría la posible existencia de canales TRP en estas células así como su distribución en la membrana plasmática, con el fin de observar si se encuentran en las caveolae. Por otro lado sería interesante determinar si la entrada capacitativa de Ca^{2+} se puede producir por el vaciamiento del Ca^{2+} de las caveolae.

REFERENCIAS

1. Al-Hassani M.H., García J.G., Gunst S.J. Different Ca^{2+} mobilization by muscarinic agonist in tracheal smooth muscle. *Am J Physiol* **264** (*Lung Cell. Mol Physiol* 8). L53-L59, 1993.
2. Amrani Y., Magnier C., Enouf J., Wuytack F., Bronner C. Ca^{2+} increase and Ca^{2+} -influx in human tracheal smooth muscle cells: Role of Ca^{2+} pools controlled by sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2 isoform *Br J Pharmacol* **115**: 1205-1210, 1995.
3. Baartscheer A., Schumacher C.A., Ophof T., Fiolet J.W.T. The origin of increasing cytoplasmic calcium upon reversal of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in isolated rat ventricular myocytes *J Mol Cell Cardiol* **28**: 1963-1973, 1996.
4. Barnes P.J. Pharmacology of airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med* **158** s123-132, 1998.
5. Baró I., O'Neill S.C., Eisner D.A. Changes of intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ during refilling of sarcoplasmic reticulum in rat ventricular and vascular smooth muscle. *J Physiol Lond* **465**: 21-41, 1993.
6. Baron C.B., Cunnigham M., Straus J.F., Coburn R.F. Pharmacomechanical coupling in smooth muscle may involve phosphatidylinositol metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 6899-6903, 1984.
7. Bazán-Perkins B. Participación de un factor humoral en la contracción bronquial sostenida inducida por carbacol en un medio sin calcio. Tesis de Maestra en Ciencias Fisiológicas, 1994.
8. Bazán-Perkins B., Carbajal V., Sommer B., Macías-Silva M., González-Martínez M., Valenzuela F., Daniel E., Montañó L.M. Involvement of different Ca^{2+} pools during the canine bronchial sustained contraction in Ca^{2+} free medium. Lack of effect of PKC inhibition *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **358**: 567-573, 1998.
9. Beavo J.A., Reifsnnyder D.H. Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes and the design of selective inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* **11**: 150-155, 1990.
10. Berridge J. M. Inositol triphosphate and calcium signaling. *Nature* **361**, 315-325, 1993
11. Berridge J. M. Capacitative calcium entry. *Biochem J* **312**: 1-11, 1995
12. Birnbaumer L., Zhu X., Jiang M., Boulay G., Peyton M., Vannier B., Brown D., Platano D., Sadeghi H., Stefani E. On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: Roles for TRP proteins *Proc Natl Acad Sci* **93** 15195-15202, 1996
13. Blackburn K., Highsmith R.F. Nickel inhibits endothelin-induced contractions on vascular smooth muscle *Am J Physiol* **258** (*Cell Physiol* 27) C 1025-1030, 1990

14. Bourreau J.-P., Abela A.P., Kwan C.Y., Daniel E.E. Acetylcholine Ca^{2+} stores refilling directly involves a dihydropyridine-sensitive channel in dog trachea. *Am J Physiol* **261** (Cell Physiol **30**). C497-C505, 1991.
15. Bridge J.H.B. Na-Ca exchange currents: Transport physiology, pumps and exchangers en: *Cell Physiology Source Book* Second edition, Academic press 237-252, 1998.
16. Carafoli E., Stauffer T. The plasma membrane calcium pump: Functional domains, regulation of the activity, and tissue specificity of isoform expression. *J Neurobiol* **25**: 312-324, 1994.
17. Carbajal V. Contracción bronquial sostenida en un medio sin calcio: Participación del trifosfato de inositol. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas. Marzo, 1998.
18. Carbajal V., Bazán-Perkins B., Vargas M.H., Montaña L.M. Canine bronchial sustained contraction induced by carbachol in Ca^{2+} -free medium depends on ryanodine Ca^{2+} receptors activation. *Am J Respir Crit Care Med* **161**: A694, 1999.
19. Castagna M., Takai Y., Kaibuchi K., Sano K., Kikkawa U., Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* **257**: 7847-7851, 1982.
20. Challis R.A., Adams D., Mistry R., Boyle J.P. Second messenger and ionic modulation of agonist-stimulated phosphoinositide turnover in airway smooth muscle *Biochem Soc Trans* **21**: 1138-1145, 1993.
21. Clapham D.E. Calcium signaling. *Cell* **80**: 259-268, 1995
22. Cuthbert N.J., Gardiner P.J., Nash K., Poll C.T. Roles of Ca^{2+} influx and intracellular Ca^{2+} release in agonist-induced contraction in guinea pig trachea *Am J Physiol* **266** (Lung Cell Mol Physiol **10**). L620, 1994
23. Daly J.W. Adenosine receptors: Targets for future drugs. *J Med Chem* **25**: 197-207, 1982.
24. Darby P.J., Janssen L.J., Daniel E.E. Caveolae membranes from canine smooth muscle contain L-type Ca^{2+} channels but not IP_3 receptors. *Am J Respir Crit Care Med* **155**: A609, 1997.
25. Darby P.J., Kwan C.Y., Daniel E.E. Selective inhibition of oxalate-stimulated Ca^{2+} transport by cyclopiazonic acid and thapsigargin in smooth muscle microsomes. *Can J Physiol Pharmacol* **74**: 182-192, 1996
26. Darby P.J., Kwan C.Y., Daniel E.E. Caveolae from canine airway smooth muscle contain the necessary components for a role in Ca^{2+} handling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**: F1226-F1235, 2000
27. Davkin K., Widdop S., Hall I.P. Control of histamine induced inositol phospholipid hydrolysis in cultured human tracheal smooth muscle cells. *European J Pharmacol* **240**: 135-140, 1993.

28. De S.H., Missiaen L., Parys J., Bootman M., Mertens L., Van D., Casteels R. Determination of relative amounts of inositol triphosphate receptor in mRNA isoforms by ratio polymerase chain reaction / *Biol Chem* **269**: 21691-21698, 1994
29. Ding K., Husain S., Akhtar R., Isales C., Abdel-Latif A. Inhibition of muscarinic-stimulated polyphosphoinositide hydrolysis and Ca^{2+} mobilization in cat iris sphincter smooth muscle cells by cAMP-elevating agents / *Cell Signal* **9**: 411-421, 1997.
30. Dolphin A.C. Facilitation of Ca^{2+} current in excitable cells. *TINS* **19**. 35-43, 1996.
31. Donnelly R., Yang K., Omary M.B., Azhar S., Black J.L. Expression of multiple isoenzymes of protein kinase C in airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* **13**: 254-256, 1995.
32. Edes I., Kranias E.G. Ca^{2+} -ATPases/pumps en: *Cell Physiology Source Book: Section II Transport physiology, pumps and exchangers*. Second edition Academic press. 225-236, 1998.
33. Felder C.C. Muscarinic acetylcholine receptors: Signal transduction through multiple effectors / *FASEB J* **8**: 619-625, 1995.
34. Fleischmann B.K., Wang Y-X., Pring M., Kotlikoff M.I. Voltage -dependent calcium currents and cytosolic calcium in equine airway myocytes. / *J Physiol* **492**: 347-358, 1996.
35. Foster R.W., Small R.C., Weston A.H. The spasmogenic action of potassium chloride in guinea pig trachealis. *Br J Pharmacol* **80**: 553-559, 1983
36. Fox A.P., Nowycky M.C., Tsien R.W. Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. / *J Physiol* **394**: 149-172, 1987.
37. Friel D.D., Tsien R.W. A caffeine- and ryanodine-sensitive Ca^{2+} store in bullfrog sympathetic neurons modulates effects of Ca^{2+} entry on $[Ca^{2+}]_i$. / *J Physiol* **450**: 217-246, 1992.
38. Fujimoto T.S., Nakade S., Miyawaki A., Mikoshiba K., Ozawa K. Localization of inositol 1,4,5-triphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae. / *J Cell Biol* **119**: 1507-1513, 1992.
39. Fujimoto T.S. Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae / *J Cell Biol* **120**: 1147-1157, 1993.
40. Gabella G. Structure of Smooth Muscles. En: *Smooth Muscle, an Assessment of Current Knowledge* Editores: E. Bulbring, A.F. Brading, A.W. Jones y T. Tomita. Prensa de la Univ. Texas, Austin TX. 1-46. 1983
41. Ganitkevich V., Isenberg G. Contribution of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release to the $[Ca^{2+}]_i$ transients in myocytes from guinea-pig urinary bladder / *J Physiol* **458**: 119-137. 1992

42. Gerthoffer W.T. Regulation of the contractile element of airway smooth muscle. *Am J Physiol* **261**: (Lung Cell Mol Physiol **5**). L15-L28, 1991.
43. Gibson A., McFadzean I., Wallace P., Wayman C.P. Capacitative Ca^{2+} entry and the regulation of smooth muscle tone. *TIPS* **19**: 266-269, 1998.
44. Giembycz M.A., Raeburn D. Current concepts on mechanisms of force generation and maintenance in airways smooth muscle. *Pulm Pharmacol* **5**: 279-297, 1992.
45. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca^{++} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**: 3440-3450, 1985.
46. Hagiwara N., Irisawa H., Kameyama M. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* **395**: 233-253, 1988.
47. Harteneck C., Plant T.D., Schultz G. From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *TINS* **23**: 159-166.
48. Herbert J.M., Augereau J.M., Gleye J., Maffrand J.P. Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* **172**: 993-999, 1990.
49. Hidaka H., Koobayashi R. Pharmacology of protein kinase inhibitors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **32**: 377-397, 1992.
50. Hille B. Ionic channels of excitable membranes. Sinauer Associates Inc. Sunderland Massachusetts. 83-115. 1991
51. Hope H.R., Pike L.J. Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. *Mol Biol Cell* **7**: 843-851, 1996.
52. Hoth M., Penner R. Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol* **465**: 359-386, 1993.
53. Hughes A.D., Schachter M. Multiple pathways for entry of calcium and other divalent cations in a vascular smooth muscle cell line (A7r5). *Cell Calcium* **15**: 317-330, 1994
54. Iino M. Calcium release mechanism in smooth muscle [pn] *J Pharmacol* **54**:345-354, 1990.
55. Iino M. Calcium-induced calcium release mechanism in guinea pig taenia caeci. *J Gen Physiol* **94**. 363-383, 1989.
56. Isshiki M, Anderson R.G.W. Calcium signal transduction from caveolae. *Cell Calcium* **26**: 201-208, 1999
57. Jacob R. Agonist stimulated divalent cation entry into single cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Physiol (Lond)* **421**: 55-77, 1990.

58. Janssen L.J. Acetylcholine and caffeine activate Cl^- and suppress K^+ conductances in human bronchial smooth muscle. *Am J Physiol* 270 (*Lung Cell Mol Physiol* 14): L772-L781, 1996.
59. Janssen L.J. T-type and L-type Ca^{2+} currents in canine bronchial smooth muscle. Characterization and physiological roles. *Am J Physiol* 272 (*Cell Physiol* 41): C1757-1765, 1997
60. Janssen L.J., Betti P.A., Netherton S.J., Walters D.K. Superficial buffer barrier and preferentially directed release of Ca^{2+} in canine airway smooth muscle. *Am J Physiol* 276 (*Lung Cell Mol Physiol* 20): L744-L753, 1999
61. Janssen L.J., Hague C., Roopung N. Ionic mechanisms underlying electrical slow waves in canine airway smooth muscle. *Am J Physiol* 275 (*Lung Cell Mol Physiol* 19): L516-L523, 1998.
62. Janssen L.J., Sims S.M. Histamine activates Cl^- and K^+ currents in guinea pig tracheal myocytes: Convergence with muscarinic signalling pathway. *J Physiol (Lond)* 465: 661-677, 1993.
63. Janssen L.J., Walters D.K., Wattie J. Regulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in canine airway smooth muscle by Ca^{2+} -ATPase and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange mechanisms. *Am J Physiol* 273 (*Lung Cell Mol Physiol* 17): C322-C330, 1997.
64. Kageyama M., Mori T., Yanagisawa T., Taira N. Is staurosporine a specific inhibitor of protein kinase C in intact porcine coronary arteries? *J Pharmacol Exp Ther* 259: 1019-1026, 1991
65. Kajita J., Yamaguchi H. Calcium mobilization by muscarinic cholinergic stimulation in bovine single airway smooth muscle. *Am J Physiol* 264 (*Lung Cell Mol Physiol* 8): L496-L503, 1993
66. Kannan M.S., Davis C., Ladenius A.R.C., Kannan L. Agonist interactions at the calcium pools in skinned and unskinned canine tracheal smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 65: 1780-1787, 1986.
67. Kargacin G.J. Calcium signalling in restricted diffusion spaces. *Biophys J* 67: 262-272, 1994.
68. Khalil R.A., van Breemen C. Sustained contraction of vascular smooth muscle: Calcium influx or C-kinase activation? *J Pharmacol Exp Therap* 244: 537-542, 1988.
69. Kimball B.C., Yule D.I., Mulholland M.W. Caffeine- and ryanodine-sensitive Ca^{2+} stores in cultured guinea pig myenteric neurons. *Am J Physiol* 270 (*Gastrointest Liver Physiol* 33): G594-G603, 1996.
70. Knox A.J., Ajao P. The effect of Na/H exchange and Na/Ca exchange on airway smooth muscle contractility. *Pulmonary Pharmacol* 7: 99-102, 1994

71. Kobayashi T., Nakano H., Morimoto M., Tamaoki T. Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* **159**: 548-553, 1989.
72. Kohlhardt M., Fleckenstein A. Inhibition of the slow inward current by nifedipine in mammalian ventricular myocardium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **298**: 267-272, 1977.
73. Kotlikoff M.I. Calcium currents in isolated canine airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* **254** (Cell Physiol **23**): C793-C801, 1988.
74. Kotlikoff M.I., Murray R.K., Reynolds E.E. Histamine-induced calcium release and phorbol antagonism in cultured airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* **253** (Cell Physiol **22**): C561-C566, 1987.
75. Li S., Okamoto T., Chun M., Sargiacomo M., Casanova J.E., Hansn S.H., Nishimoto I., Lisanti M.P. Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J Biol Chem* **270**: 15693-15701, 1995.
76. Madison J.M., Ethier M.F., Yamaguchi H. Refilling of caffeine-sensitive intracellular calcium stores in bovine airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* **275** (Lung Cell Mol Physiol **19**): L852-L860, 1998.
77. Marthan R., Savineau J.P., Mironeau J. Acetylcholine-induced contraction in human isolated bronchial smooth muscle: Role of an intracellular calcium store. *Resp Physiol* **62**: 127-135, 1987.
78. Merritt J.E., Ron J., Hallam T.J. Use of manganese to discriminate between calcium influx and mobilization from internal stores in stimulated human neutrophils. *J Biol Chem* **264**: 1522-1527, 1989.
79. Montaña I.M., Barajas-López C., Daniel E.E. Canine bronchial sustained contraction in Ca^{2+} -free medium: Role of intracellular Ca^{2+} . *Can J Physiol Pharmacol* **74**: 1236-1248, 1996.
80. Montero M., Alonso-Torre S.R., Alvarez J., Sánchez A., García-Sancho J. The pathway for refilling intracellular Ca^{2+} stores passes through the cytosol in human leukaemia cells. *Pflugers Arch* **424**: 465-469, 1993.
81. Morgan J., De S., Gillespie J. Identification of three isoforms of the $InsP_3$ receptor in human myometrial smooth muscle. *Pflugers Arch* **431**: 697-705, 1996.
82. Moussavi R.S., Kelley C.A., Adelstein R.S. Phosphorylation of vertebrate nonmuscle and smooth muscle myosin heavy chains and light chains. *Mol Cell Biochem* **127/128**: 219-227, 1993.
83. Nasu T., Yamaguchi K., Shibata H. Blockade by nickel ions of phasic contraction to K^+ and high affinity calcium of ileal longitudinal muscle of guinea pig. *Comp Biochem Physiol* **106C**: 377-381, 1993.

84. Ogawa Y. Role of ryanodine receptors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **29**: 229-274, 1994.
85. Parekh A., Penner R. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* **77**: 901-930, 1997
86. Park S., Rasmussen H. Activation of tracheal smooth muscle contraction and synergism between Ca^{2+} and activators of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 8835-8839, 1985.
87. Parys J.B., Missiaen L., Smedt H.D., Sienaert I., Casteels R. Mechanisms responsible for quantal Ca^{2+} release from inositol triphosphate-sensitive Ca^{2+} stores. *Pflugers Arch* **432**: 359-367, 1996
88. Pessah I.N., Stambuk R.A., Casida J.E. Ca^{2+} -activated ryanodine binding: Mechanisms of sensitivity and intensity modulation by Mg^{2+} , caffeine and adenosine nucleotides. *Mol Pharmacol* **31**: 232-238, 1987.
89. Philipp S., Hambrecht J., Braslavski L., Schroth G., Freichel M., Murakami M., Cavalié A., Flockerzi V. A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *EMBO J* **17**: 4274-4282, 1998.
90. Prestwich S., Bolton T.B. Inhibition of muscarinic receptor-induced inositol phospholipid hydrolysis by caffeine, β -adrenoceptors and protein kinase C in intestinal smooth muscle. *Brit J Pharmacol* **114**: 602-611, 1995.
91. Putney J.W. Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* **7**: 1-12, 1986.
92. Putney J.W. Jr. TRP, inositol 1,4,5-triphosphate receptors and capacitative calcium entry. *PNAS* **26**: 14669-14671, 1999
93. Putney J.W. Jr. General aspects of calcium signalling. En. *Molecular Biology Intelligence Unit, Capacitative calcium entry*. Editors: Putney J.W. Jr, Austin, TX: R.G. Landes Biomedical Publishing, 1997, p.1.
94. Raeburn D., Hay D.W.P., Farmer S.G., Fedan J.S. Influence of cartilage on reactivity and on the effectiveness of verapamil in guinea pig isolated airway smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **242**: 450-454, 1987
95. Raeburn D., Rodger I.W., Hay D.W.P., Fedan J.S. The dependence of airway smooth muscle on extracellular Ca^{++} for contraction influenced by the presence of cartilage. *Life Sci* **38**: 1499-1505, 1986.
96. Rasmussen H., Iakawa Y., Park S. Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction. *FASEB J* **1**: 177-185, 1987
97. Rodger I. Excitation-contraction coupling and uncoupling in airway smooth muscle. *Br J Clin Pharmacol* **20**: 255S-266S, 1985

98. Rossetti M., Savineau J.-P., Crevel H., Marthan R. Role of protein kinase C in nonsensitized and passively sensitized human isolated bronchial smooth muscle. *Am J Physiol* 268 (Lung Cell Mol Physiol 12), L966-L975, 1995.
99. Rousseau E., Ladine J., Liu Q.Y., Meissner G. Activation of the Ca^{2+} release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds. *Arch Biochem Biophys* 267: 75-86, 1988.
100. Roux F., Mavoungou E., Naline E., Lacroix H., Tordet C., Advenier C., Gandordy B.M. Role of 1,2-sn diacylglycerol in airway smooth muscle stimulated by carbachol. *Am J Resp Crit Care Med* 151: 1745-1751, 1995.
101. Rüegg U.T., Burgess G.M. Staurosporine, K252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol Sci* 10: 218-220, 1989.
102. Sankary R.M., Jones C.A., Madison J.M., Brown J.K. Muscarinic cholinergic inhibition of cyclic AMP accumulation in airway smooth muscle. Role of a pertussis toxin-sensitive protein. *Am Rev Resp Dis* 130: 145-150, 1988.
103. Schnitzer J.E., Oh P., Jacobson B.S., Dvorak A.M. Caveolae from luminal plasmalemma of rat lung endothelium: Microdomains enriched in caveolin, Ca^{2+} ATPase, and inositol phosphate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1759-1763, 1995.
104. Schramm C.M., Grunstein M.M. Mechanisms of protein kinase C regulation of airway contractility. *J Appl Physiol* 66: 1935-1941, 1989.
105. Seidler N.W., Jona I., Vegh M., Martonosi A. Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 264: 17816-17823, 1988.
106. Shaul P.W., Anderson R.G.W. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am J Physiol* 275 (Lung Cell Mol Physiol 19): L843-L851, 1998.
107. Shibuya I., Douglas W.W. Calcium channels in rat melanotrophs are permeable to manganese, cobalt, cadmium, and lanthanum, but not to nickel: Evidence provided by fluorescence changes in Fura-2-loaded cells. *Endocrinology* 131: 1936-1941, 1992.
108. Shimamoto H., Shimamoto Y., Kwan C., Daniel E.E. 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, 1992.
109. Shimizu H., Borin M.L., Blaustein M.P. Use of La^{3+} to distinguish activity of the plasmalemmal Ca^{2+} pump from Na^{+}/Ca^{2+} exchange in arterial myocytes. *Cell Calcium* 21 31-41, 1997.
110. Silver P.J., Stull J.E. Phosphorylation of myosin light chain and phosphorylase in tracheal smooth muscle in response to KCl and carbachol. *Mol Pharmacol* 25 267-274 1984.

111. Sims M.S., Jiao Y., Zheng Z.G. Intracellular calcium stores in isolated tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 271 (*Lung Cell Mol Physiol* 15): L300-L309, 1996.
112. Sneyd J., Kalachev L.V. A profile analysis of propagating calcium waves. *Cell Calcium* 15: 289-296, 1994.
113. Somlyo A.P., Somlyo A. Smooth muscle. Excitation-contraction coupling, contractile regulation, and the cross-bridge cycle. *Alcoholism: Clin Exp Res* 18: 138-143, 1994.
114. Song K.S., Li S., Okamoto T., Quilliam L.A., Sargiacomo M., Lisanti M.P. Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J Biol Chem* 271: 9690-9697, 1996.
115. Song K.S., Sargiacomo M., Galbiati F., Parenti M., Lisanti M.P. Targeting of a G alpha subunit (G α i1) and C-Src tyrosine kinase to caveolae membranes: Clarifying the role of N-myristoylation. *Cell Mol Biol* 43: 293-303, 1997.
116. Suzuki M., Muraki K., Imaizumi Y., Watanabe M. Cyclopiazonic acid, an inhibitor of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-pump, reduces Ca²⁺-dependent K⁺ currents in guinea-pig smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 107: 134-140, 1992.
117. Takai Y., Kishimoto A., Iwasa Y., Kawahara Y., Mori T., Nishizuka Y. Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J Biol Chem* 254: 3692-3695, 1979.
118. Takuwa Y., Takuwa N., Rasmussen H. Measurement of cytoplasmic free Ca²⁺ concentrations in bovine tracheal smooth muscle using aequorin. *Am J Physiol* 253 (*Cell Physiol* 22): C817-C827, 1987.
119. Taylor C.W., Traynor D. Calcium and inositol trisphosphate receptors. *J Membr Biol* 145: 109-118, 1995.
120. Vaca L., Kunze L. Depletion of intracellular Ca²⁺ stores activates a Ca²⁺-selective channel in vascular endothelium. *Am J Physiol* 267 (*Cell Physiol* 36): C920-C925, 1994.
121. Vaca L., Sinkins W., Hu Y., Kunze D., Schilling W. Activation of recombinant TRP by thapsigargin in Sf9 insect cells. *Am J Physiol* 267 (*Cell Physiol* 36): C1501-C1505, 1994.
122. van Breemen C., Chen Q., Laher I. Superficial buffer barrier function of smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *TIPS* 16: 98-105, 1995.
123. Wade R.G., Barbera J., Sims S.M. Cholinergic inhibition of Ca²⁺ current in guinea pig gastric and tracheal smooth muscle cells. *J Physiol (Lond)* 491: 307-319, 1996.
124. Wang Y.-X., Fleishmann B.K., Kotlikoff M.I. M β receptor activation of nonselective cation channels in smooth muscle cells: Calcium and G β /G γ requirements. *Am J Physiol* 273 (*Cell Physiol* 42): C500-C508, 1997.

125. Waldron G.J., Sigurdsson S.B., Aeillo E.A., Halayko A.J., Stephens N.L., Cole W.C. Delayed rectifier K⁺ current of dog bronchial myocytes. Effect of pollen sensitization and PKC activation. *Am J Physiol* **275** (*Lung Cell Mol Physiol* **19**): L336-L347, 1998.
126. Wheeler-Clark E.S., Buja L.M. Calcium channel activation mobilizes calcium from a restricted pericellular region surrounding canine coronary artery smooth muscle cells / *Pharmacol Exp Ther* **274**: 1493-1506, 1995.
127. Yamaguchi H., Kajita J., Madison M. Isoproterenol increases peripheral [Ca²⁺]_i and decreases [Ca²⁺]_i in single airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* **268** (*Cell Physiol* **37**): C771-C779, 1995.
128. Yang C.M. Dissociation of intracellular Ca²⁺ release and Ca²⁺ entry response to 5-hydroxytryptamine in cultured canine tracheal smooth muscle cells. *Cell Signal* **10**: 735-742, 1998.
129. Yang C.M., Chou S-P., Wang Y.-Y., Hsieh J.-T., Ong R. Muscarinic regulation of cytosolic free calcium in canine tracheal smooth muscle cells. Ca²⁺ requirement for phospholipase C activation. *Br J Pharmacol* **110**: 1239-1247, 1993a.
130. Yang C.M., Yo Y.L., Wang Y.Y. Intracellular calcium in canine cultured tracheal smooth muscle cells is regulated by M₃ muscarinic receptors. *Br J Pharmacol* **110**: 983-998, 1993b.
131. Yoshikawa A., van Breemen C., Isenberg G. Buffering of plasmalemmal Ca²⁺ current by sarcoplasmic reticulum of guinea pig urinary bladder myocytes. *Am J Physiol* **271** (*Cell Physiol* **40**): C833-841, 1996.
132. Yoshimura M., Oshima T., Matsuura H., Ishida T., Kaambe M., Kajiyama G. Extracellular Mg²⁺ inhibits capacitative Ca²⁺ entry in vascular smooth muscle cells. *Circulation* **95**: 2567-2572, 1996.
133. Zucchi R., Ronca-Testoni S. The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: Modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev* **49**: 1-51, 1997.

Anexo I.

ARTICULO:

Involvement of different Ca^{2+} pools during the canine bronchial sustained contraction in Ca^{2+} free medium: Lack of effect of PKC inhibition.

ORIGINAL ARTICLE

anica Bazán-Perkins · Verónica Carbajal
 ttina Sommer · Marina Macías-Silva
 arco Gonzalez-Martínez · Fermin Valenzuela
 E. Daniel · Luis M. Montaña

Involvement of different Ca²⁺ pools during the canine bronchial sustained contraction in Ca²⁺-free medium: block of effect of PKC inhibition

Received 12 March 1998 / Accepted 2 September 1998

Abstract We evaluated the role of protein kinase C (PKC) in the sustained bronchial contraction (SBC) induced by carbachol (Cch) or histamine in a Ca²⁺-free medium and the possibility that each agonist uses a different Ca²⁺ store for its response. We studied third-order bronchi and airway smooth muscle (ASM) from first-order bronchi dissected free of cartilage and epithelium. Bronchial and ASM responsiveness to Cch or histamine were evaluated in Krebs solution (2.5 mM Ca²⁺) and in Ca²⁺-free medium. Cch and histamine induced an SBC in bronchial tissues in Ca²⁺-free medium. In ASM each agonist produced a transient contraction, but the response to histamine was much smaller. Cch induced a concentration-dependent accumulation of inositol phosphates (IPs) in both bronchi and ASM, however, histamine did not induce significant accumulation of IP. Repeated exposure to histamine in bronchial rings elicited contractile responses in Ca²⁺-free media, but Cch did afterwards still produced a sustained contraction. This response was blocked when bronchial tissues were preincubated with 10 µM cyclopropane acid (CPA). Brief incubation of these preparations with a high EGTA concentration (1 mM) abolished the histamine-induced SBC. The SBC induced by Cch or histamine in Ca²⁺-free medium was affected by the preincubation of the tissues with calphostin C, chelerythrine or staurosporine. We concluded that

Cch mobilizes Ca²⁺ from two different sources during the SBC in Ca²⁺-free medium: from a CPA-sensitive one from sarcoplasmic reticulum (SR) and from a putative extracellular membrane Ca²⁺ pool sensitive to 1 mM EGTA, and neither process involved PKC activation. Histamine appeared to utilize the extracellular membrane pool only.

Key words Protein kinase C · Intracellular Ca²⁺ · Bronchial sustained contraction · Ca²⁺-free medium

Introduction

In airway smooth muscle (ASM), contraction induced by cholinergic agonists depends on Ca²⁺ influx through voltage-dependent Ca²⁺ channels (L-type), receptor-operated Ca²⁺ channels and on Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum (SR) by inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) after receptor stimulation (Baron et al 1984; Cuthbert et al 1994; Kajita and Yamaguchi 1993). On the other hand, histamine-induced contractions, like those to KCl, depend largely on extracellular Ca²⁺ entry. Compared to carbachol (Cch), this autacoid is poorly able to mobilize Ca²⁺ from internal stores, at least in canine airway (Kannan et al 1987).

Contractions induced by Cch have two components: an initial fast response (phasic) followed by a sustained contraction (tonic; Rodger 1985). The IP₃-induced release of stored Ca²⁺ from SR seems to mediate the initial response (Kajita and Yamaguchi 1993). In contrast, protein kinase C (PKC) regulation of several steps of the sustained contraction mechanism has been proposed (Kajita and Yamaguchi 1993; Peiper et al 1996).

We previously noted that, in canine tracheal ASM, under Ca²⁺-free conditions, Cch induces an IP₃-dependent fast transient contraction, whereas in canine bronchi this agonist induces a sustained (tonic) contraction that has not been well characterized (Montaña et al 1996).

Thus, the aim of the present study was to assess the possible role of PKC activation in the canine bronchial sustained contraction induced by Cch in Ca²⁺-free medium and

Bazán-Perkins L.M., Montaña M., Gonzalez-Martínez F., Valenzuela E., Daniel E., Sommer T., Macías-Silva M., Carbajal V., Carbajal B., Sommer T., Montaña L.M. (*)
 Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México D.F., México
 Carbajal V., Carbajal B., Sommer T., Montaña L.M. (*)
 Departamento de Investigación en Asma, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Ilapam 4502, C.P. 14080, México D.F., México
 E-mail: unam@servidor.unam.mx, Fax: +52-5-6654623
 Daniel E.
 Department of Biomedical Sciences, McMaster University, Hamilton, ON L8S 4L8, Canada
 Montaña L.M. (*)
 Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica, Secretaría de Salud, P.O. Box 7-123, Cuernavaca, C.P. 76000, México D.F., México

to contrast the mechanism of the Cch-induced response to that of histamine

Materials and methods

Issue preparations Mongrel dogs of either sex (20–25 kg) were killed by an overdose of pentobarbital sodium (100 mg kg⁻¹), following a protocol approved by our Animal Care Committee. The experiments were conducted in accordance with the published Guiding Principles in the Care and Use of Animals, approved by the American Physiological Society. After lungs were excised, two types of bronchial preparations were made: (1) bronchial rings of third order (3rd-B) were dissected free of adhered fat and connective tissue, but not of cartilage and epithelium, at room temperature in oxygenated Krebs solution; (2) airway smooth muscle (ASM) strips were dissected from first-order bronchi, using a stereoscopic microscope Nikon WZ-10 (Tokyo, Japan) to prepare tissues without cartilage and epithelium as previously described (Montañó et al. 1996).

To ensure that dissection of cartilage and epithelium damage were minimal, concentration-response curves to Cch were constructed with and without cartilage and epithelium dissection; there were no significant differences in the EC₅₀ values (0.28±0.034 vs 0.34±0.025 μM, respectively, *n*=4). The E_{max} values could not be directly compared because of the different contributions of smooth muscle to the weight used to normalize the data.

Contractility experiments 3rd-B and ASM preparations were suspended in organ baths containing Krebs solution with indomethacin (0.1 μM). The rings were maintained at 37°C and aerated with 5% CO₂/oxygen, pH 7.4. Isometric tension was recorded on a Beckman R 2.2 dynograph (Beckman Instruments, Calif., USA) via a mechanical transducer (Grass FT03, Grass Instruments, Calif., USA). Preparations were equilibrated for 30 min under a resting tension of 1–1.5 g prior to testing; this tension was previously shown to yield optimal active tension. Preparations were then stimulated three times with 60 mM KCl until maximum stable responses were obtained. Krebs solution composition was as follows (mM): 115 NaCl, 4 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 22 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂ (unless otherwise specified) and 11 glucose.

Bronchial and ASM responsiveness to EC₅₀ of Cch (0.34 μM) or histamine (10 μM, submaximal concentration) were evaluated in Krebs solution (2.5 mM Ca²⁺) and in Ca²⁺-free medium (0 Ca²⁺, 1.0 l mM EGTA to eliminate possible Ca²⁺ contamination). Previous studies showed that the addition of 0.1 mM EGTA to a normally Ca²⁺-free solution measured with the calcium sensitive dye fura-2 pentapotassium salt, maintained Ca²⁺ concentrations 10 nM (Montañó et al. 1996). Results were expressed as percentage of the maximum contraction induced by KCl stimulation in Krebs solution (5 mM Ca²⁺) in the same strip. In order to rule out histamine desensitization due to repetitive stimulation, we performed some experiments to determine the appropriate time between histamine responses. We found that 1-h intervals between each histamine stimulation yielded desensitization (Table 1).

Inhibition of Cch or histamine-induced contraction in Ca²⁺-free medium Whether Ca²⁺ was available from Cch or histamine-sensitive stores to support contractions was indirectly evaluated by recording the contraction induced by these agonists in a Ca²⁺-free solution. After Cch or histamine stimulation in normal Krebs solution, preparations were washed three to six times in Ca²⁺-free medium and re-contraction evoked with the same agonist. The maximum contraction

induced by these agonists, under these conditions, was used as an index of their abilities to release Ca²⁺ from the cellular stores. Cch-induced contraction involves the release of Ca²⁺ from agonist-sensitive cellular stores (Bourreau et al. 1991; Montañó et al. 1993, 1996). Depletion of such stores was carried out by repetitive 20-min stimulations with Cch or 10 min with histamine in Ca²⁺-free medium. Once 3rd-B tissues were depleted of Ca²⁺ stores sensitive to histamine, as inferred by the absence of contractile responses, tissues were stimulated with Cch in Ca²⁺-free medium. In additional experiments, preparations were preincubated for 30 min with 10 μM cycloiazonacetic acid (CPA), an inhibitor of the smooth-muscle SR-Ca²⁺ pump (Bourreau et al. 1991; Darby et al. 1996; Suzuki et al. 1992).

In some other experiments, 3rd-B preparations were preincubated with EGTA 1 mM for 30 min in Ca²⁺-free medium to chelate Ca²⁺ bound extracellularly. EGTA was subsequently washed away with Ca²⁺-free medium and the preparations stimulated with histamine. In another set of experiments, tissues were incubated during 10 min with nifedipine (1 μM) and afterwards stimulated with histamine in Ca²⁺-free medium.

At the end of every experiment, the preparations were washed in normal Krebs solution and stimulated again with Cch or histamine. Responses to this final Cch or histamine concentration were not statistically different from the first contraction obtained at the beginning of the protocol (data not shown).

Effect of protein kinase C inhibition on Cch or histamine-induced contraction in Ca²⁺-free medium The effects of calphostin C and chelerythrine, two specific PKC inhibitors (Herbert et al. 1990; Kobayashi et al. 1989), and staurosporine, an unspecific inhibitor (Ruegg and Burgess 1989), on the first response to Cch or histamine in Ca²⁺-free medium were evaluated. The calphostin C concentration required to inhibit PKC was established through its ability to antagonize the maximum contractile response induced by 1 μM 4-β-phorbol 12,13-dibutyrate (PDB) or 1 μM 4-β-phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in 3rd-B and ASM preparations in normal Krebs solution. Calphostin C (1 μM) completely abolished the maximum contractile response induced by these phorbol esters (data not shown). The chelerythrine and staurosporine concentrations used were 1 μM and 10 nM, respectively. Staurosporine (10 nM) has been demonstrated to inhibit the contractile responses to 1 μM PDB in porcine coronary arteries and 0.66 μM chelerythrine is the IC₅₀ of PKC in rat brain (Herbert et al. 1990; Kageyama et al. 1991). At the concentrations used in this work, none of these PKC inhibitors (calphostin C, staurosporine or chelerythrine) modified the contraction induced by 60 mM KCl in bronchi preparations (100±6%, 103±38% and 95.95±32% of KCl response, respectively, *n*=5, *n*=4, *n*=5, respectively). These results indicated that these inhibitor concentrations were appropriate to assess their effect on histamine and Cch-induced contraction.

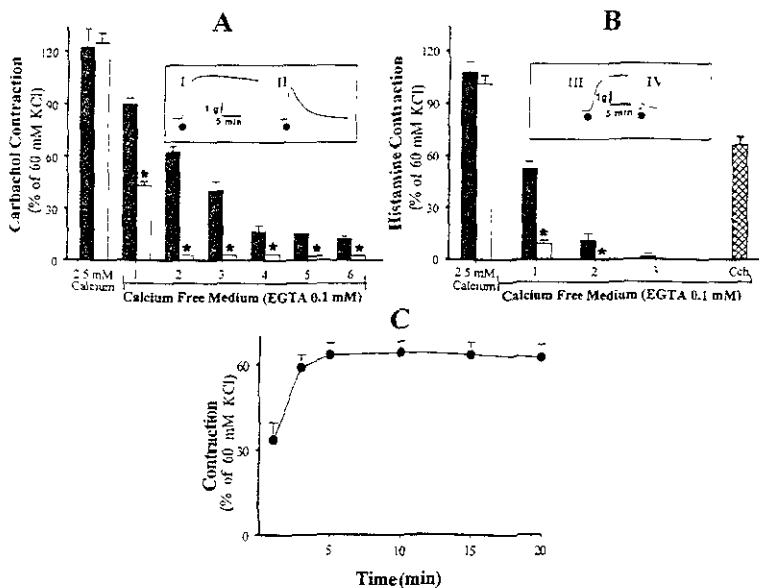
Finally, 3rd-B tissues were incubated for 1 h with calphostin C (1 μM), staurosporine (10 nM) and chelerythrine (1 μM) in Ca²⁺-free medium and then stimulated with Cch or histamine. All the experiments with PKC inhibitors and nifedipine were done under dim light conditions.

Accumulation of inositol phosphates (IPs) The effect of Cch or histamine on the hydrolysis of phosphoinositides (PI) was assessed by monitoring the accumulation of ³H-labelled inositol phosphates in normal Krebs solution and Ca²⁺-free medium (Berridge et al. 1983; Thomas et al. 1984). ASM from trachea, 3rd-B and cartilage from bronchi were incubated in a shaking water bath (80 strokes min) with 150 μCi ml⁻¹ [³H]-inositol at 37°C for 4 h in oxygenated Krebs solution. In these experiments ASM from trachea was normally used since IP measurement required large amounts of tissue not easily obtained from first order bronchi. In addition we corroborated that

Table 1 Effect of successive histamine stimulations (hourly) on bronchial strips in normal Krebs solution and in Ca²⁺-free medium (1.0 mM EGTA, 0 Ca²⁺)

Stimulation	1	2	3	4
Histamine (10 μM)	100 ± 8	183 ± 97	65 ± 81	26 ± 97
Cch (10 μM)	100 ± 8	183 ± 97	65 ± 81	26 ± 97

Fig. 1 Effects of repetitive $0.34 \mu\text{M}$ carbachol (A) and $10 \mu\text{M}$ histamine (B) stimulations on bronchial (black bars, $n=6$) and ASM (open bars, $n=6$) preparations in Ca^{2+} -free medium ($+ \text{EGTA } 0.1 \text{ mM}$). The *inset* in A and B represents carbachol (C) or histamine (H) addition. The *inset* in A represents tracings showing typical responses to the first Cch stimulation on bronchial (I) and ASM (II) preparations in Ca^{2+} -free medium. The *inset* in B represents tracings showing typical responses to the first histamine stimulation on bronchial (III) and ASM (IV) preparations in Ca^{2+} -free medium. C: Time course of Cch stimulation in bronchial preparations previously depleted of Ca^{2+} stores sensitive to histamine in Ca^{2+} -free medium. * $P < 0.01$, $n=6$.



ASM tracheal responses to histamine and Cch were similar to those obtained in ASM from first order bronchi in normal Krebs solution and Ca^{2+} -free medium (data not shown). Tissues were washed twice with Ca^{2+} -free medium, and then incubated in Krebs solution with or without Ca^{2+} containing LiCl (10 mM), at 37°C during 10 min. Non-cumulative concentration-response curves to Cch (10^{-5} – 10^{-7} M) or histamine (10^{-5} – 10^{-6} M) were done. After the addition of Cch or histamine the incubation was continued for 30 min. All the reactions were stopped by adding 30% perchloric acid followed by sonication and centrifugation at 1388 g during 15 min. All samples were neutralized with KOH (1.5 M), HEPES (75 mM), $\text{pH } 7.0$ – 7.5 , and applied to a column of AGI-X8 formate form, 100–200 mesh (Bio-Rad). The resin was washed twice with 10 ml distilled water and 10 ml ammonium formate (60 mM) + sodium tetraborate (5 mM) to eliminate free $[\text{H}^3]$ -inositol, and glycerophosphoinositol. Sequential washes with 4 ml sodium tetraborate (5 mM) + sodium formate (180 mM), 3 ml formic acid (100 mM) + ammonium formate (400 mM), and 4 ml formic acid (100 mM) + ammonium formate (1 M) were used to elute inositol mono phosphate (IP_1), inositol bisphosphate (IP_2), and inositol trisphosphate (IP_3), respectively. The amount of $[\text{H}^3]$ IP_3 was assessed by adding 4 ml scintillant liquid (Ready-Safe, Beckman) to each sample dark-adapting overnight, and measured in a Beckman LS 6000SF liquid scintillation counter (Fullerton, Calif., USA). The results were expressed as cpm per mg wet weight.

Drugs. Carbachol, carbachol chloride and histamine dihydrochloride (Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) were dissolved in Ca^{2+} -free solution. Indomethacin and ethylene glycol bis(β -aminoethyl ether) N,N'-tetracetate acid (EGTA, Sigma) were dissolved in Ca^{2+} -free solution and added to the Krebs solution (final concentration of 10^{-5} – 10^{-6} M). Nitrendipine (Sigma) was prepared as 10 mM stock solutions in ethanol and stored in darkness (final concentration of ethanol 0.1%). CPA, PMX, PDB (Sigma), carbachol, histamine, thapsigargin (Natick, Mass., USA) and thapsigargin (Sigma) were dissolved in methanol, sodium chloride (0.1 M). In control experiments addition of 0.1 mM of dimethyl sulfoxide had no effect. Myo- $[\text{D}^3]$ -histamine was obtained from New England Nuclear (Boston, Mass., USA).

Statistical analysis. All values in the text and illustrations are means \pm SEM. Data were analyzed by paired Student's *t*-test. In some experiments a one-way analysis of variance and Dunnett's test for multiple comparison were used. Two-tailed *P*-values < 0.05 were considered statistically significant. The *n*-values represent the number of dogs in each experiment.

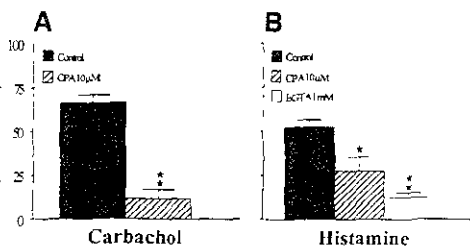
Results

Bronchial responsiveness to Cch and histamine

In bronchial preparations with cartilage and epithelium or in ASM strips without them, the contractile responses to Cch ($n=6$; Fig. 1A) or histamine ($n=6$; Fig. 1B) were not different in Krebs solution with 2.5 mM Ca^{2+} .

The addition of Cch or histamine to bronchial preparations in Ca^{2+} -free solution (0.1 mM EGTA) initially produced a sustained bronchial contraction during the 20- or 10-min stimulation, respectively (see insets in Fig. 1A,B). Repetitive Cch or histamine stimulation progressively diminished the contractile responses, indicating that Ca^{2+} stores sustaining each response were being depleted (Fig. 1A,B). Each successive response was always sustained at or near the initial level of tension. In ASM preparations both Cch and histamine stimulation in Ca^{2+} -free medium caused a transient contraction, but responses to histamine were smaller ($P < 0.01$, see insets in Fig. 1A,B).

Once the contractile responses to histamine in bronchial tissues in Ca^{2+} -free solution were abolished, Cch ($n=6$) was still able to induce contraction (Fig. 1B). This Cch response was sustained as shown in Fig. 1C. CPA ($0.3 \mu\text{M}$), an inhibitor of the smooth muscle $\text{S}\&\text{C}$ Ca^{2+} pump nearly character-



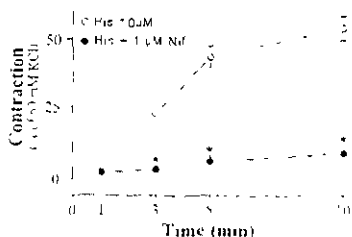
2 A Effect of cyclopirozamide acid (CPA) preincubation for 30 min in normal Krebs solution on carbachol (Cch, 0.34 μM) responses in bronchial preparations previously depleted of Ca²⁺ stores sensitive to thapsigargin in Ca²⁺-free medium. B Bronchial responses to histamine (1 μM) in Ca²⁺-free medium after CPA preincubation for 30 min in normal Krebs solution or preincubation for 30 min in Ca²⁺-free medium with EGTA. *P<0.05, **P<0.01, n=7

0.01) this response in tissues after the Ca²⁺ store supporting histamine contractions was depleted (Fig 2A). Additionally, CPA preincubation also partially blocked the bronchial sustained contraction induced by histamine in the preparations (Fig 2B).

Bronchial incubation with 1 mM EGTA (20 min in Ca²⁺-free medium, n=4) almost abolished the responses induced by histamine (Fig. 2B). The addition of nifedipine (1 μM, n=4) also inhibited the bronchial sustained contraction induced by histamine (Fig. 3).

Effect of Cch and histamine on IP_s accumulation in bronchial and ASM preparations

Preparations stimulated with Cch had the following IP_s basal values in normal Krebs solution and in Ca²⁺-free medium, respectively: ASM 8.94±2.59 cpm/mg (n=5) and 3±3.40 cpm/mg (n=5); bronchi 4.46±1.63 cpm/mg (n=7) and 4.47±1.17 cpm/mg (n=8). Addition of Cch to ASM and bronchial preparations, although lower in the latter, induced a concentration-dependent accumulation of IP_s (Fig 4A,B). The maximum response, as compared to basal values for ASM, was 1125.5±147.1% and 6±151.4% with and without calcium, respectively. In



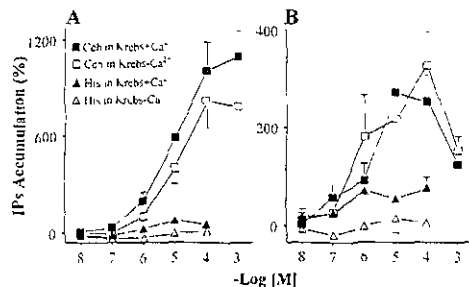
3 Effect of preincubation for 10 min with nifedipine (Nif) on histamine-induced bronchial sustained contraction in Ca²⁺-free medium. *P<0.05, n=5

bronchial preparations, the responses were smaller. 339.6±89% and 422.7±73.2%, respectively. In both tissues, the differences obtained in Ca²⁺-containing and Ca²⁺-free medium were not statistically significant. In cartilage preparations Cch (100 μM) did not induce any IP_s production (-28.89±13.32%, n=3).

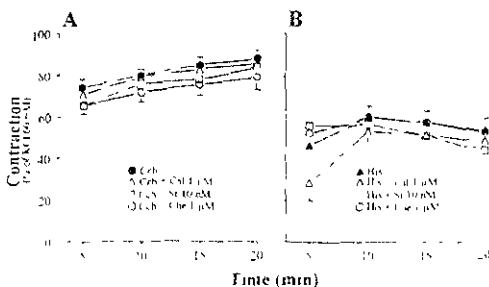
Histamine only induced a very small, non-significant accumulation of IP_s in ASM and bronchial preparations in both solutions. The basal values in Krebs solution and Ca²⁺-free medium for the former tissue were 6.31±2.94 cpm/mg⁻¹ and 5.43±2.1 cpm/mg⁻¹, respectively (n=4 for all experiments). The maximum response in ASM and bronchial preparations to histamine was 81.87±29.35% and 14.24±13.46%, 86.39±17.11% and 38.46±22.34%, in normal Krebs solution and calcium-free medium, respectively.

Effect of PKC on the bronchial sustained contraction induced by Cch and histamine in Ca²⁺-free medium

To assess the possible role of PKC activation in the contraction induced by Cch or histamine in Ca²⁺-free medium, we



4 Effects of carbachol (Cch, n=8) and histamine (Hist, n=4 for each group) on the inositol phosphates (IP_s) accumulation (% of basal value) in ASM (A) and bronchial (B) preparations. Krebs-Ca²⁺ = Krebs solution containing Ca²⁺, Krebs-Ca²⁺ = Krebs solution without Ca²⁺



5 Effects of cytochalasin (Cyto) staurosporine (Sto) and cytochalasin (Cyto) on bronchial sustained contraction induced by Cch or histamine in Ca²⁺-free medium. *P<0.05, n=5

ed the effect of the PKC inhibitors calphostin C, rospornine and chelerythrine. Figure 5 shows the average course of the bronchial sustained contraction induced by Cch and histamine in Ca^{2+} -free medium and the effect of 1 μM calphostin C ($n=5$, $n=6$), 10 nM rospornine ($n=5$, $n=4$) and 1 μM chelerythrine ($n=6$) on PKC inhibitors did not modify significantly the sustained contraction induced by Cch or histamine in Ca^{2+} -free medium when compared with their respective control groups.

Discussion

In a previous publication, we postulated that during the sustained bronchial contraction induced by Cch in Ca^{2+} -free medium, Ca^{2+} -recycling seems to be required, occurring by way of L-type Ca^{2+} channels from a compartment that was located outside the plasma membrane and dependent on the functional Ca^{2+} uptake into the SR for its recharging activity (Montaño et al 1996).

In this work, we observed that Cch and histamine each induced a sustained bronchial contraction in Ca^{2+} -free medium, whereas Cch and histamine stimulation caused a transient contraction in ASM, but histamine produced a significantly smaller response. Since Cch or histamine stimulation were done in Ca^{2+} -free medium, the only known source of Ca^{2+} for the sustained contraction is expected to be the SR through opening of IP_3 -sensitive channels (Baron et al 1984, Kajita and Yamaguchi 1993, Yang et al 1993a). This seems to be true for Cch stimulation since we found that this agonist induced IP_3 accumulation. However, unlike Cch, histamine did not produce a significant increment in IP_3 accumulation, suggesting that it mobilizes Ca^{2+} from a different source. This lack in IP_3 production by histamine is corroborated by the tiny ASM contraction induced by histamine in Ca^{2+} -free medium. Thus, the bronchial sustained contraction induced by histamine appears to mobilize Ca^{2+} from a source different from the SR IP_3 receptors-mediated release.

The possibility that there are other pool(s) of Ca^{2+} involved in the sustained bronchial contraction is supported by the fact that Cch still induced a sustained contraction in ASM previously depleted of histamine-sensitive Ca^{2+} . This Cch response was completely abolished by thapsigargin, which corroborated that this store was the SR. In a previous work, we showed that 1 mM EGTA blocked the sustained contraction response to Cch in Ca^{2+} -free medium (Montaño et al 1996), supporting the hypothesis that Ca^{2+} arises from two sources, the SR (CPA-sensitive) and a putative extracellular membrane Ca^{2+} pool sensitive to EGTA (CPA-insensitive). This extracellular Ca^{2+} pool might be the so-called caveolae, membrane invaginations that have been reported in smooth muscle cells from small intestine and blood vessels as well as lung, cardiac muscle cells and fibroblasts (Günther and Schmidt et al 1995). It has recently been shown that caveolae in canine trachea enriched in caveolin, a marker

for caveolae, are also enriched in L- Ca^{2+} channels, the plasmalemma Ca^{2+} pump and calsequestrin, a Ca^{2+} -binding protein (Darby et al 1997, and unpublished observations). Also, caveolae appear to be the plasmalemmal locations for G proteins, c-SRC tyrosine kinases, H-Ras, and some phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes (Hope and Pike 1996; Li et al 1995, Song et al 1996, 1997). These observations suggest that ASM is endowed with caveolae that could serve as a calcium pool for Ca^{2+} signalling during contraction. Further studies are warranted to confirm this hypothesis.

It has been proposed that coronary artery smooth muscle cells have a source of extracellular Ca^{2+} bound to the glycocalyx that in Ca^{2+} -free medium would buffer, restrict or sequester Ca^{2+} in the vicinity of the membrane surface (Wheeler-Clark et al 1995). In bronchial tissue, this last mechanism could explain why the extracellular membrane Ca^{2+} pool maintains its Ca^{2+} content in a medium free of this divalent cation. Ca^{2+} release from these pools could be triggered by a combined activation of a G protein-linked receptor and the opening of L-type Ca^{2+} channels. In this context, we have shown that 1 μM nifedipine abolishes the Cch-induced sustained contraction in Ca^{2+} -free medium (Montaño et al 1996), suggesting that L-type Ca^{2+} channels from these extracellular stores could be involved in this response. This implies that Cch must depolarize the membrane to open these voltage-dependent channels, as has been previously demonstrated (Montaño et al 1996). Histamine acting on H_1 receptors could have a similar action, since the bronchial sustained contraction induced by this autacoid was completely abolished by nifedipine (1 μM). Furthermore, 1 mM EGTA, which was expected to chelate Ca^{2+} from the extracellular membrane Ca^{2+} pool, completely abolished the histamine-induced sustained contraction, indicating that, in bronchial tissues, Ca^{2+} from these extracellular pools was available despite the presence of Ca^{2+} -free medium and the lack of significant inositolide production to release Ca^{2+} from SR.

This putative extracellular membrane Ca^{2+} source sensitive to histamine might require continuous basal activity of a CPA-sensitive Ca^{2+} -ATPase since CPA inhibited about 47-72% of the sustained contraction induced by histamine in Ca^{2+} -free medium. This inhibition was lower than the one observed with Cch (82.47%), suggesting that the Ca^{2+} -ATPase present in these pools is less sensitive to CPA than the one present in SR. Also, this could indicate that Ca^{2+} -ATPase activity from the extracellular membrane Ca^{2+} pool was less important for Ca^{2+} recycling when SR stores were not emptied by inositolide production. Alternatively, CPA inhibition of responses to histamine in Ca^{2+} -free media could be explained if the initial Ca^{2+} increase due to L-type Ca^{2+} channels opening from the extracellular membrane pool partially mobilizes Ca^{2+} from SR (ryanodine receptors) (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release). These receptors have been shown to be present in SR from ASM (Yamaguchi et al 1995).

An interesting finding was that histamine in Ca^{2+} -free medium, produced a very small response in ASM but induced a sustained bronchial sustained contraction. The lack of

ponse to histamine in ASM could be explained by the fact that histamine poorly mobilizes Ca^{2+} from SR stores in ASM and depends entirely or mostly on Ca^{2+} entering from the extracellular membrane stores. However, ASM dissection might damage these stores or remove a substance, which aids Ca^{2+} mobilization as we suggested previously (Montaño et al 1996). Additionally, the glycocalyx could have been damaged during the dissection procedure, inhibiting the pericellular Ca^{2+} buffering function. This glycocalyx injury or loss of a mobilizing factor may have reduced the availability of the extracellular membrane Ca^{2+} pool content so that there was not enough Ca^{2+} to support contraction.

The amount of Ca^{2+} required to maintain the sustained contraction may be small. It has been shown in bovine and pig trachea that intracellular Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) increases following a Cch-induced contraction, but falls to a plateau within 5–6 min, even though contractile tension is maintained for up to 2 h (Takuwa et al 1987; Yang et al 1993b). The authors presented evidence that Cch activated PKC that led to a reduced requirement for $[Ca^{2+}]_i$ elevation to maintain a sustained contraction during the plateau phase (Park and Rasmussen 1985; Takuwa et al 1987). Although PKC activation has been suggested subsequently to explain sustained contractile responses of ASM (Gerthoffer 1991; Sestini et al 1995; Roux et al 1995), there is no consensus about its role. Both Ca^{2+} -dependent and independent C isoenzymes have been reported in ASM (Donnelly et al 1995). In a previous work (Montaño et al 1996) we found that, in the presence of 1 μ M nifedipine, the Cch-induced sustained contraction in Ca^{2+} -free medium was completely abolished, suggesting that only Ca^{2+} -dependent C could be involved in this response. However, the lack of inhibitory effect of calphostin C, staurosporine and chelerythrine on the sustained contraction induced by Cch or amine in Ca^{2+} -free medium does not support the idea that PKC activation is involved in this process. Other mechanisms, probably IP₃ production and Ca^{2+} recycling, could be involved in the sustained response.

In summary, our results suggest that during the sustained contraction in Ca^{2+} -free medium, Cch could be mobilizing Ca^{2+} from two different sources: the CPA-sensitive from SR and a putative extracellular membrane Ca^{2+} pool sensitive to mEGTA, and that this response is PKC-independent. In contrast, amine appears to mobilize Ca^{2+} only from the extracellular pool from which entry into cells requires lung and availability of L-type channels.

Acknowledgements The experimental protocol was approved by our Institutional Care Committee and complies with the current laws of Mexico. This work was supported by grants from DGAPA-UNAM (1998), CONACYT (5076-M) and PUS UNAM (394-446-17-X). Dr Luis M. Montaño Dr FF Daniel was supported by MRC, UK.

References

- Baron CB, Cunningham M, Straus JF III, Coburn RF (1984) Pharmacomechanical coupling in smooth muscle may involve phosphatidylinositol metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:6899–6903
- Berridge MJ, Dawson RMC, Downes CP, Heslop JR, Irvine RF (1983) Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem J* 212:473–482
- Bourreau JP, Abela AP, Kwan CY, Daniel EE (1991) Refilling of ACh-sensitive internal Ca^{2+} store directly involves a dihydropyridine sensitive Ca^{2+} -channel in dog trachea. *Am J Physiol* 261 (Cell Physiol) 30:C497–C505
- Cuthbert NJ, Gardiner PJ, Nash K, Poll CT (1994) Roles of Ca^{2+} influx and intracellular Ca^{2+} release in agonist-induced contractions in guinea pig trachea. *Am J Physiol* 266 (Lung Cell Mol Physiol) 10:L620–L627
- Daroy PJ, Kwan CY, Daniel EE (1996) Selective inhibition of oxalate-stimulated Ca^{2+} transport by cyclooxygenase acid and thapsigargin in smooth muscle microsomes. *Can J Physiol Pharmacol* 74:182–192
- Daroy PJ, Jansson LJ, Daniel EE (1997) Caveolae membranes from canine tracheal smooth muscle contain L-type Ca^{2+} channels but not IP₃ receptors. *Am J Respir Crit Care Med* 155:A609
- Donnelly R, Yang K, Omari B, Azhar S, Black JD (1995) Expression of multiple isoenzymes of protein kinase C in airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13:253–256
- Fujimoto TS (1993) Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J Cell Biol* 120:1147–1157
- Gerthoffer WT (1991) Regulation of the contractile element of airway smooth muscle. *Am J Physiol* 261 (Lung Cell Mol Physiol) 5:L15–L28
- Herceiro JM, Augereau JM, Gleye J, Maffrand JP (1990) Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 172:993–999
- Hope HR, Pike LJ (1996) Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. *Mol Biol Cell* 7:843–851
- Kageyama M, Mori T, Yanagisawa T, Taira N (1991) Is staurosporine a specific inhibitor of protein kinase C in intact porcine coronary arteries? *J Pharmacol Exp Ther* 259:1019–1026
- Kajita I, Yamaguchi H (1993) Calcium mobilization by muscarinic cholinergic stimulation in bovine single airway smooth muscle. *Am J Physiol* 264 (Lung Cell Mol Physiol) 8:L496–L503
- Kannan MS, Davis C, Lademann AR, Kannan L (1987) Agonist interactions at the calcium pools in skinned and unskinned canine tracheal smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 65:1780–1787
- Kobayashi T, Nakano H, Morimoto M, Tamaoki T (1989) Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 159:548–553
- Li S, Okamoto I, Chun M, Sargiacomo M, Casanova JF, Hansen SH, Nishimoto I, Lisanti MP (1995) Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J Biol Chem* 270:15693–15701
- Montano LM, Jones JL, O'Byrne PM, Daniel FF (1993) Effect of ozone exposure in vivo on response of bronchial rings in vitro to intracellular Ca^{2+} . *J Appl Physiol* 75:1313–1322
- Montano LM, Barajas-Lopez C, Daniel FF (1996) Canine bronchial sustained contraction in Ca^{2+} -free medium: role of intracellular Ca^{2+} . *Can J Physiol Pharmacol* 74:1236–1248
- Park S, Rasmussen U (1985) Activation of trachea smooth muscle contraction: synergism between Ca^{2+} and activators of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:8855–8859
- Reuter U, Kopp SC, Thies H, Henke R (1996) Activation of protein kinase C accelerates contractile kinetics of a tracheal smooth muscle. *Physiol Arch* 432:R47–R52
- Rodriguez W (1985) Effect on contraction of calcium and magnesium in pig tracheal smooth muscle. *Br J Pharmacol* 95:285–295

- Setti M, Savineau J-P, Crevel H, Marthan R (1995) Role of protein kinase C in nonsensitized and passively sensitized human isolated bronchial smooth muscle. *Am J Physiol* 268 (Lung Cell Mol Physiol 12) L966-L975
- Six F, Mayoungou E, Naline F, Lacroix H, Jorret C, Advenet C, Grandordy BM (1995) Role of 1,2-sn diacylglycerol in airway smooth muscle stimulated by carbachol. *Am J Respir Crit Care Med* 151 1745-1751
- Ugg U I, Burgess GM (1989) Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol Sci* 10 218-220
- Wintzer JE, Oh P, Jacobson BS, Dvorak AM (1995) Caveolae from luminal plasmalemma of rat lung endothelium: microdomains enriched in caveolin, Ca^{2+} -ATPase, and inositol trisphosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 1759-1763
- Yang KS, Sargiacomo M, Galbiati F, Parenti M, Lisanti MP (1997) Targeting of a G alpha subunit (G11 alpha) and v-Src tyrosine kinase to caveolae membranes: clarifying the role of N-myristoylation. *Cell Mol Biol* 43:293-303
- Yang SK, Li S, Okamoto T, Quilliam LA, Sargiacomo M, Lisanti MP (1996) Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains: Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J Biol Chem* 271 9690-9697
- Yasuda M, Mutaki K, Imaizumi Y, Watanabe M (1992) Cyclopiazonic acid, an inhibitor of the sarcolemmal Ca^{2+} -pump, reduces Ca^{2+} -dependent K^{+} currents in guinea-pig smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 107 134-140
- Yokuwa Y, Yokuwa N, Rasmussen H (1987) Measurement of cytosolic free Ca^{2+} concentration in bovine tracheal smooth muscle using aequorin. *Am J Physiol* 253 (Cell Physiol 22) C817-C827
- Thomas AP, Alexander J, Williamson JR (1984) Relationship between inositol polyphosphate production and the increase of cytosolic free Ca^{2+} induced by vasopressin in isolated hepatocytes. *J Biol Chem* 259 5574-5584
- Wheeler-Clark FS, Buja LM (1995) Calcium channel activation mobilizes calcium from a restricted pericellular region surrounding canine coronary artery smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 274 1493-1506
- Yamaguchi H, Kajita J, Madison M (1995) Isoproterenol increases peripheral $[Ca^{2+}]_i$ and decreases inner $[Ca^{2+}]_i$ in single airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* 268 (Cell Physiol 37) C771-C779
- Yang CM, Chou S-P, Wang Y-Y, Hsieh J-T, Ong R (1993a) Muscarinic regulation of cytosolic free calcium in canine tracheal smooth muscle cells: Ca^{2+} requirement for phospholipase C activation. *Br J Pharmacol* 110:1259-1247
- Yang CM, Yo Y-L, Wang Y-Y (1993b) Intracellular calcium in canine cultured tracheal smooth muscle cells is regulated by M3 muscarinic receptors. *Br J Pharmacol* 110:983-988

Anexo II.

ARTICULO:

Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ depletion by caffeine and changes of [Ca²⁺]_i during refilling in bovine smooth muscle cells.

FINAL

WITH YOUR CORRECTIONS
WITHIN 48 HOURS TO

Capital City Press
Editorial Services
Wall Street Complex
131 South Main Street
Barre, VT 05641



Archives
of Medical
Research

Archives of Medical Research ■ (2000) 1-6

ORIGINAL ARTICLE

Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Depletion by Caffeine and Changes of [Ca²⁺]_i During Refilling in Bovine Airway Smooth Muscle Cells

Blanca Bazán-Perkins,^{*,**,*} ~~Edgar~~ Eduardo Sánchez-Guerrero,^{*} Verónica Carbajal,^{*,**,*} Carlos Barajas-López^{***} and Luis M. Montañó^{*,**,*}

Edgar
A

^{*}Departamento de Investigación en Asma, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), Mexico City, Mexico

^{**}Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Centro Médico Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City, Mexico

^{***}Department of Anatomy & Cell Biology, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada

^{****}Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

Received for publication September 24, 1999; Accepted July 4, 2000 (99/176)

10/

Background. In airway smooth muscle (ASM), Ca²⁺ influx in response to the Ca²⁺ depletion of the sarcoplasmic reticulum (SR) seems to play a role in the regulation of intracellular free Ca²⁺ concentrations ([Ca²⁺]_i). This study evaluates some possible Ca²⁺ entry pathways activated during SR-Ca²⁺ depletion induced by 10 mM caffeine.

Methods. Enzymatically dispersed bovine ASM cells were loaded with Fura-2/AM to permit measurement of [Ca²⁺]_i changes in single cells.

Results. Caffeine 10 mM induced a transient increase in [Ca²⁺]_i that depleted SR-Ca²⁺ content. After caffeine washout, a decrease in basal [Ca²⁺]_i (undershoot) was invariably observed, followed by a slow recovery. This phenomenon was inhibited by cyclopiazonic acid (5 μM). External Ca²⁺ removal in depolarized and nondepolarized cells induced a decrease in basal [Ca²⁺]_i that continued until depletion of the SR-Ca²⁺ content. The decrease in [Ca²⁺]_i induced by Ca²⁺-free physiological saline solution (PSS) was accelerated in caffeine-stimulated cells. Recovery from undershoot was not observed in Ca²⁺-free PSS. Depolarization with KCl and addition of D600 (30 μM) did not modify recovery. Similar results were obtained when the Na⁺/Ca²⁺ exchanger was blocked by substituting NaCl with KCl in normal PSS (Na⁺-free PSS) or by adding benzamil amitriptide (25 μM).

Conclusions. SR-Ca²⁺ content plays an important role in the Ca²⁺ leak induced by Ca²⁺-free medium, and does not depend on membrane potential. Additionally, recovery from undershoot after caffeine depends on extracellular Ca²⁺, and neither voltage-dependent Ca²⁺ channels nor the Na⁺/Ca²⁺ exchanger are involved. © 2000 IMMS. Published by Elsevier Science Inc.

Key Words: Airway smooth muscle, Sarcoplasmic reticulum, Ca²⁺ undershoot, Caffeine.

Introduction

A rise in intracellular free Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) is an essential step for the excitation-contraction coupling of airway smooth muscle (ASM). In these cells, the sarcoplasmic reticulum (SR), which operates as a limited Ca²⁺ source, has Ca²⁺-channels activated by inositol 1,4,5-triphosphate (1,2) or by the Ca²⁺-induced Ca²⁺ release (CICR) mechanism (3). This Ca²⁺ release from the SR is the main source

to initiate the increase in [Ca²⁺]_i (4). The extracellular space is an infinite Ca²⁺ source available to the cell through voltage-specific and nonspecific cation channels (5,6). Voltage-dependent L-type Ca²⁺ channels have been involved mainly in the refilling of SR Ca²⁺ stores (7,8).

In various myocytes (9-12) as well as other excitable cells (13,14), it has recently been described that cytosolic Ca²⁺ uptake by the SR-Ca²⁺ pump induces an undershoot of Ca²⁺ after intracellular Ca²⁺ mobilization by caffeine, acetylcholine or noradrenaline. This phenomenon reflects the refilling of the SR.

In nonexcitable cells, after Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum (ER), intracellular pathways for Ca²⁺ entry

Address reprint requests to Blanca M. Bazán-Perkins, MS, Department of Investigation in Asma, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, PO Box 7-726, Palmar, IMSS, 06702 Mexico City, D.F., Mexico. Tel: +52 (5) 562 22 22. Fax: +52 (5) 562 22 22. E-mail: bazan@iner.mx

cells activated after agonist removal, as long as the ER-pools need to be refilled (15). This phenomenon supports capacitative Ca^{2+} entry theory, according to which Ca^{2+} is triggered by an unknown signal initiated by Ca^{2+} depletion (15,16). A similar phenomenon has also been observed in excitable cells including ASM cells (17,18). We observed that in bovine ASM cells, caffeine removal induced a drop in basal $[Ca^{2+}]_i$ (undershoot) followed by a recovery to the initial baseline. The aim of this study is to evaluate the possible Ca^{2+} entry pathways involved in Ca^{2+} undershoot.

Materials and Methods

Isolation procedures. Bovine tracheas obtained from a slaughterhouse were dissected free of epithelium and active tissue in physiological saline solution (PSS, mM): NaCl, 25 NaHCO₃, 4.6 KCl, 1.2 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄, 1 glucose. The tissue was cut in strips (0.5 × 5 mm) weighing a total of 200 mg and placed in 2.5 mL of nominally Ca^{2+} -free PSS containing collagenase type D (2.6 mg/mL) and hyaluronidase grade II (0.7 mg/mL) for 15 min at 37°C. Strips were then transferred to a similar PSS containing fresh enzymes plus desoxyribonuclease I (1 mg/mL) until dispersed cells were observed. This procedure allows us to obtain cells at consistent levels of resting $[Ca^{2+}]_i$ (3). The dispersed cells were loaded with 2.5–3.5 μM Fura-2/AM, acetoxyethyl ester (Fura-2/AM) in low Ca^{2+} (0.1 mM) for 1 h at room temperature (25°C), then allowed to settle into a heated perfusion chamber with a glass cover at the bottom. This chamber was mounted on a Nikon inverted microscope (Diaphot 200), and adhered to the glass were continuously perfused at a rate of 1.5 mL/min with PSS (37°C, equilibrated with 95% O₂, pH 7.4) containing normal Ca^{2+} (2 mM).

Measurement of $[Ca^{2+}]_i$. Fura-2/AM loaded in the myocytes were excited by alternating pulses of 340 and 380 nm

light, and emission was collected at 510 nm using a PTI microphotometer (Photon Technology International, Princeton, NJ, USA). Background fluorescence was automatically subtracted and determined by removing the cell from the field before beginning the experiments. The fluorescence acquisition rate was 0.5 s. $[Ca^{2+}]_i$ was calculated according to the formula of Grynkiewicz and coworkers (19). The K_d of Fura-2 was assumed to be 386 nM (20). The mean 340/380 fluorescence ratios (R_{max} and R_{min}) were obtained by exposing the cells to 10 mM Ca^{2+} in the presence of 10 μM ionomycin and in Ca^{2+} -free PSS with 1.11 mM ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), respectively. R_{max} was 11.7, and R_{min} , 0.5. The fluorescence ratio at 380 nm light excitation in Ca^{2+} -free PSS and Ca^{2+} -saturated cells (β), was 7.5.

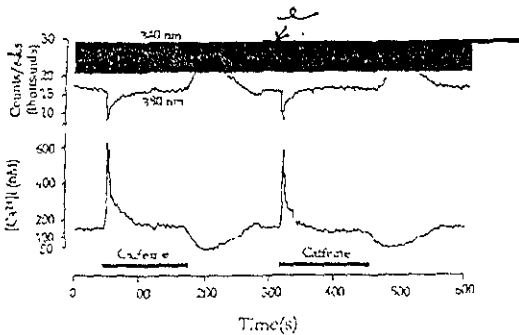
ED: A: recent

Drugs. Fura-2/AM, caffeine, carbamylcholine chloride, cyclopiazonic acid, ionomycin, methoxiverapamil hydrochloride, and benzamil amiloride were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Collagenase, elastase, and desoxyribonuclease I were obtained from Boehringer-Mannheim (Indianapolis, IN, USA). Fura-2/AM, cyclopiazonic acid, and ionomycin were dissolved in dimethylsulfoxide (final concentration, 0.025%). In control experiments, dimethylsulfoxide did not have any effect.

Statistical analysis. The nonpaired Student's *t*-test was used. Analysis of variance and Dunnett test for multiple comparisons was also used. Statistical significance was set at two-tailed *p* < 0.05. Data in the text and figures are expressed as mean ± standard error (SE).

Results

Effect of caffeine on bovine ASM cells. The resting $[Ca^{2+}]_i$ of ASM cells was $143 ± 8$ nM (*n* = 41). The addition of caffeine (10 mM) for 2 min to the PSS resulted in a rapid in-



delete the whole bar

Changes in $[Ca^{2+}]_i$ induced during the caffeine application and washout in a single bovine airway smooth muscle cell. Upper trace shows fluorescence ratios at 340 and 380 nm. Lower trace represents $[Ca^{2+}]_i$. First caffeine stimulation induced a transient elevation in $[Ca^{2+}]_i$ followed by Ca^{2+} after-caffeine removal. A second caffeine stimulation induced a transient decrease in $[Ca^{2+}]_i$ followed by Ca^{2+} after-caffeine removal.

crease in $[Ca^{2+}]_i$ (504 ± 42 nM $n = 41$). Afterward, the transient returned to a steady state at resting $[Ca^{2+}]_i$ (Figure 1). After caffeine removal, we always observed a decrease in the basal level of $[Ca^{2+}]_i$ (70 ± 5 nM) followed by a slow recovery (i.e., undershoot, Figure 1). This undershoot lasted 48.8 ± 9.2 s. The maximum $[Ca^{2+}]_i$ decrease was reached at 26.0 ± 1.7 s. The $[Ca^{2+}]_i$ returned to the basal level within 122.1 ± 9.0 s. Once $[Ca^{2+}]_i$ reached basal levels, a second caffeine stimulation produced a similar response as long as a 2-min recovery period was allowed (Figure 1).

Cell preincubation with CPA ($5 \mu M$, 2 min), an inhibitor of the SR- Ca^{2+} pump (21,22), completely abolished the $[Ca^{2+}]_i$ undershoot ($n = 15$) and further caffeine applications became ineffective (data not shown).

SR- Ca^{2+} content during caffeine stimulation. To evaluate whether the SR- Ca^{2+} content was depleted by caffeine, ASM cells were stimulated with carbachol during this xanline incubation. In control experiments, carbachol ($10 \mu M$) induced an increase in $[Ca^{2+}]_i$ of 627 ± 90 nM ($n = 37$). It has previously been demonstrated that carbachol releases SR- Ca^{2+} to initiate this response (4). In the presence of caffeine, carbachol addition did not induce any further response ($n = 7$) (Figures 2a and b). A third carbachol stimulation after caffeine washout induced an increase in $[Ca^{2+}]_i$, similar to the control response (Figure 2c).

It is well known that caffeine induces an increase in cAMP concentration (23) that could be responsible for its inhibitory effects on the carbachol response. To investigate this possibility, ASM cells were incubated for 2 min with forskolin ($32 \mu M$, IC_{50}), an adenylate cyclase activator. Forskolin reduced the transient Ca^{2+} peak induced by carbachol to 48.64 ± 11.24 % ($n = 3$) (data not shown), but did not abolish this response, as caffeine did (Figure 2). These results suggest that the cAMP elevation expected by the caffeine treatment cannot be the only mechanism responsible for the abolishment of the carbachol response.

fine treatment cannot be the only mechanism responsible for the abolishment of the carbachol response.

Effect of Ca^{2+} -free PSS in the $[Ca^{2+}]_i$ Figure 3A shows that the addition of Ca^{2+} -free PSS to nonstimulated cells leads to a lower basal $[Ca^{2+}]_i$, and this decrement may continue until the SR- Ca^{2+} content is depleted after 10 min (data not shown). In ASM cells previously stimulated with caffeine, the removal of external Ca^{2+} induced a faster $[Ca^{2+}]_i$ decrease compared with nonstimulated cells (Figure 3A and B). In both groups, the decrement was not modified when ASM cells were depolarized by substitution of 118 mM NaCl with 122.6 mM of KCl ($n = 7$).

Effect of extracellular Ca^{2+} on the undershoot recovery. External Ca^{2+} removal after caffeine stimulation completely abolished the undershoot recovery ($n = 9$) (Figure 4). Under this condition, the response to caffeine stimulation was significantly reduced (77.6 \pm 5%) compared with caffeine stimulation in normal PSS. A second caffeine stimulation did not produce any response (Figure 4). Restoration of external Ca^{2+} -containing (2 mM) PSS was followed by complete recovery of $[Ca^{2+}]_i$ basal levels (Figure 4) and caffeine responsiveness (data not shown).

Role of voltage-dependent Ca^{2+} channels (VDCC) and Na^+ Ca^{2+} exchanger in the undershoot. Methoxyverapamil (D600), an antagonist of VDCC, was used to evaluate

(Handwritten note: "with")

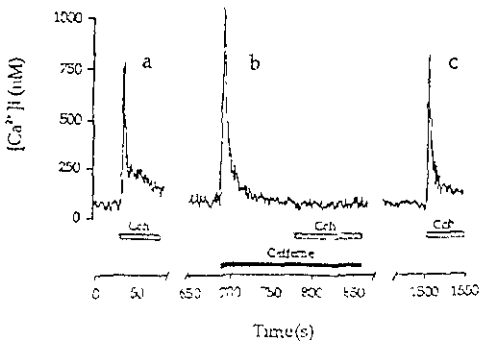


Figure 2. Caffeine abolishes the carbachol response. ASM cells (10^6) were incubated with $10 \mu M$ carbachol (Carb) for 10 min. (a) $[Ca^{2+}]_i$ response induced by carbachol. (b) Caffeine ($10 \mu M$) abolished the carbachol response. (c) After caffeine washout, the carbachol response was restored.

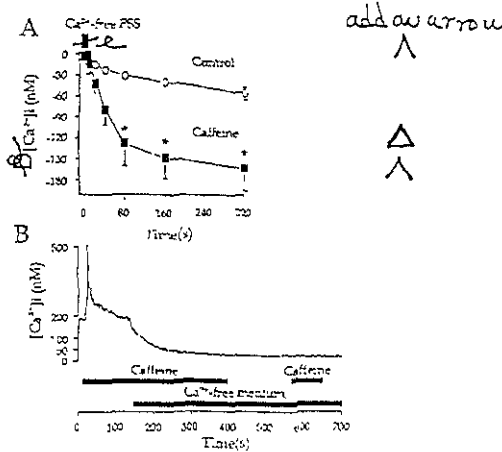


Figure 3. Effect of SR- Ca^{2+} content during the leak induced by Ca^{2+} -free medium. (A) Temporal course of the maximum drop in $[Ca^{2+}]_i$ in cells perfused with Ca^{2+} -free PSS without previous stimulation of SR and in cells incubated in Ca^{2+} -free PSS during caffeine stimulation ($10 \mu M$) and (B) original recording of the SR- Ca^{2+} depletion in Ca^{2+} -free PSS. Caffeine stimulation induced SR- Ca^{2+} depletion, which was not observed in control cells ($n = 7$).

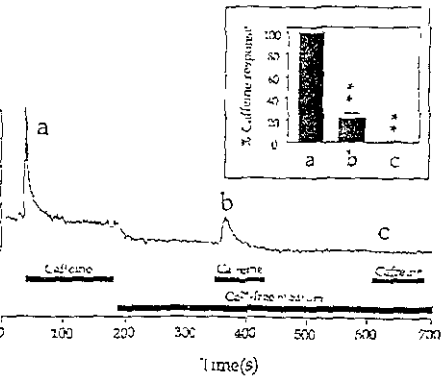


Figure 4. External Ca²⁺ removal prevents the undershoot recovery. (a) Caffeine (10 mM) induced a transient Ca²⁺ peak. Removal of extracellular Ca²⁺ (Ca²⁺-free PSS) washed out the undershoot recovery; (b, c) the addition in Ca²⁺-free PSS produced a smaller response, and a second stimulation did not produce any effect. The inset corresponds to the sum response induced by caffeine observed in a, b, and c. **P* < 0.001.

...er the Ca²⁺ entry pathway during undershoot and recovery could occur through these channels. We noticed that the total duration (drop and recovery) of the Ca²⁺ undershoot elicited by caffeine was not modified by D600 (30 μM, *n* = 8) (Table 1). Substitution of 118 mM NaCl in normal PSS by 122.6 mM of KCl to induce inactivation of C by long-lasting depolarization and inactivation of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger did not modify the Ca²⁺ undershoot (4). Moreover, benzamil amiloride, (25 μM), an Na⁺/Ca²⁺ exchanger blocker, added for 8 min in normal PSS did not affect the Ca²⁺ undershoot (*n* = 8) (Table 1). Benzamil amiloride concentration was enough to induce the Na⁺/Ca²⁺ exchanger reversal response induced by using NaCl with 143 mM of choline chloride (*n* = 4) (3.5).

Discussion

In the present experiments with ASM cells, we observed that caffeine induced a transient rise in [Ca²⁺]_i, which rapidly

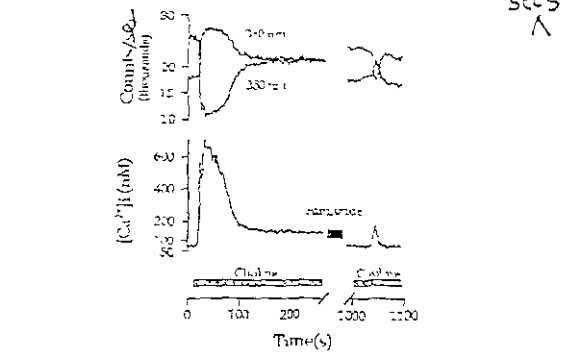


Figure 5. Typical recording of the effect of benzamil amiloride on the [Ca²⁺]_i changes induced by the reversal mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. Dashed bars show the substitution of 118 mM NaCl with choline chloride (143 mM) in normal PSS. Closed bar represents 8-min incubation with benzamil amiloride (25 μM), which nearly blocked the response to choline chloride.

returned to the initial baseline. The transient Ca²⁺ peak has been explained as an increase in the Ca²⁺ sensitivity of the CICR channels, i.e., [Ca²⁺]_i basal levels are sufficient to induce channel opening (10,24). Once caffeine was removed, an abrupt drop in [Ca²⁺]_i (undershoot) was observed.

The Ca²⁺ undershoot has been documented in bullfrog sympathetic ganglia (13), in rat vascular and ventricular myocytes (10), and in guinea pig myenteric neurons (14), urinary bladder (11,12), and tracheal smooth muscle cells (9). Most of these authors concluded that this abrupt drop in [Ca²⁺]_i is due to Ca²⁺ uptake by the empty SR (9-11,13). Our results are in agreement with this interpretation in that the undershoot was completely abolished by CPA.

The second component of the undershoot was the slow cytosolic Ca²⁺ recovery to baseline after the sudden drop in [Ca²⁺]_i. It has been suggested that SR serves as a superficial buffer barrier (SBB) for the deeper myoplasm (25). In this model, Ca²⁺ reaches the subplasmalemmal space before it can diffuse and raise cytosolic Ca²⁺ in the deeper myoplasm. This hypothesis predicts that SR-Ca²⁺ depletion produces a delay between the rise of [Ca²⁺]_i and force develop-

Effect of voltage operated Ca²⁺ channels and Na⁺/Ca²⁺ exchanger in the Ca²⁺ undershoot after caffeine withdrawal

	Control	D6000 30 μM	Control	Benzamil amiloride 25 μM	Control	Substitution of NaCl by KCl
			Time course of the undershoot (seconds)			
down	148.5 ± 18.4	173.0 ± 34.8	157.9 ± 41.3	140.0 ± 42.2	120.8 ± 6.6	127.3 ± 9.3
up	22.5 ± 7.1	35.5 ± 7.3	16.1 ± 3.4	25.8 ± 2.1	27.0 ± 3.0	29.4 ± 5.0
τ	22.0 ± 16.3	137.0 ± 33.5	141.8 ± 40.4	133.6 ± 47.7	97.6 ± 8.3	97.8 ± 4.5
Ca _i (nM) decrease	13.0 ± 22.0	67.0 ± 21.0	83.0 ± 13.0	83.0 ± 21.0	87.0 ± 14.0	99.0 ± 22.0

Dashed

Justify
rule
add
F. #

ment (26). The SBB hypothesis may thus explain the slow rise in cytosolic Ca^{2+} during undershoot recovery, because the SR could be buffering the Ca^{2+} influx before it reaches the deeper myoplasm.

Our experiments in Ca^{2+} -free PSS showed that external Ca^{2+} removal leads to a slow but continuous decrement of baseline $[Ca^{2+}]_i$, until SR- Ca^{2+} depletion is reached after 10 min. Such an observation was similar in both depolarized and nondepolarized cells, indicating that in these cells, the substantial Ca^{2+} leak does not depend on membrane potential. However, this Ca^{2+} leak seems to be more evident when SR- Ca^{2+} stores were previously depleted by caffeine. One possible explanation for this phenomenon could be that in nondepleted cells, SR- Ca^{2+} content is buffering the cytosolic Ca^{2+} , preventing a sudden drop in $[Ca^{2+}]_i$. Additionally, we observed that the Ca^{2+} source during undershoot recovery is mainly extracellular, because the undershoot recovery was abolished under Ca^{2+} -free conditions.

VDCC in ASM cells are one of the main Ca^{2+} entry pathways (27). In canine ASM, Bourreau and coworkers (7) reported that, during acetylcholine stimulation, a direct pathway occurs to allow SR- Ca^{2+} refilling through L-type Ca^{2+} channels. Recently, on studying the same species, Janssen et al. (28) found that, during caffeine stimulation, there is an increase in subsarcolemmal $[Ca^{2+}]_i$, and membrane current activity, such as Ca^{2+} -dependent Cl^- and K^+ currents, without activating VDCC. They also found that acetylcholine activates all previous mechanisms induced by caffeine, including VDCC.

Our results in bovine-isolated ASM cells suggest that VDCC are not involved, at least in SR- Ca^{2+} refilling induced by caffeine depletion, because neither D-600 nor membrane depolarization by KCl changed the undershoot recovery. Why VDCC are not activated by caffeine is still unknown, and requires further investigation.

In excitable cells, the Na^+/Ca^{2+} exchanger has been implicated in cytoplasmic Ca^{2+} regulation in the subsarcolemmal space, inducing Ca^{2+} extrusion to maintain the Ca^{2+} homeostasis in this area (25), although the role of this extrusion mechanism in ASM cells is questioned by other researchers (27,29). In this context, the Na^+/Ca^{2+} exchanger inhibition with benzamil amiloride or reversal of the Na^+/Ca^{2+} exchanger by substituting NaCl with KCl did not modify the mechanisms involved in the undershoot recovery.

In nonexcitable cells, Putney (15) postulated a capacitative Ca^{2+} entry theory that suggests a mechanism that senses the Ca^{2+} content in the ER and generates a signal to activate Ca^{2+} influx after depletion. This unique Ca^{2+} entry pathway is only activated when ER- Ca^{2+} stores are empty, and is functionally inactive when these stores are full. After emptying the intracellular stores from rat ileum smooth muscle (17) and human tracheal smooth muscle (18), a long-lasting cytosolic Ca^{2+} elevation and Ca^{2+} influx was observed in agreement with the capacitative Ca^{2+} entry theory. In our experiments with caffeine, we observed a complete

SR- Ca^{2+} depletion; thus, it may be possible that a capacitative Ca^{2+} entry is involved in the undershoot recovery. However, further experiments are required to corroborate this hypothesis.

In conclusion, we observed that SR- Ca^{2+} content plays an important role during the Ca^{2+} leak observed in Ca^{2+} -free medium, and does not depend on membrane potential. We additionally observed that recovery from undershoot after caffeine washout depends on extracellular Ca^{2+} , and that neither VDCC nor the Na^+/Ca^{2+} exchanger are involved. Finally, we observed that Ca^{2+} undershoot after caffeine removal appears to be a useful phenomenon to study some of the mechanisms involved in the regulation of $[Ca^{2+}]_i$, by the SR.

Acknowledgments

The authors would also like to thank Dr. Bettina Sommer for her assistance in the English language, and Mr. E. Torres for technical assistance. This study was supported by grants from DGAPA, UNAM (No. IN202999), and PUIS-UNAM (No. 394-446 17-94) to J. P. V.

References

1. Baron CB, Cunningham M, Straus JF, Coburn RF. Pharmacomechanical coupling in smooth muscle may involve phosphatidylinositol metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:6899
2. Bazán-Perkins B, Carbajal V, Sommer E, Macías-Silva M, González-Martínez M, Valenzuela F, Daniel EE, Montaño LM. Involvement of different Ca^{2+} pools during the canine bronchial sustained contraction in Ca^{2+} -free medium: lack of effect of PKC inhibition. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1998;358:567.
3. Yamaguchi H, Kajita J, Madison M. Isoproterenol increases peripheral $[Ca^{2+}]_i$ and decreases $[Ca^{2+}]_i$ in single airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1995;268(Cell Physiol 37):C771.
4. Wang Y-X, Fleischmann BK, Kotlikoff MI. M_2 receptor activation of nonselective cation channels in smooth muscle cells: calcium and G_i/G_o requirements. *Am J Physiol* 1997;273(Cell Physiol 42):C500.
5. Kotlikoff MI. Calcium currents in isolated canine airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1988;254(Cell Physiol 23):C793.
6. Cuthbert NJ, Gardner PJ, Nash K, Poll CT. Roles of Ca^{2+} influx and intracellular Ca^{2+} release in agonist-induced contractions in guinea pig trachea. *Am J Physiol* 1994;266(Lung Cell Mol Physiol 10):L620.
7. Bourreau J-P, Abela AP, Kwan CY, Daniel EE. Acetylcholine Ca^{2+} stores refilling directly involves a dihydropyridine-sensitive channel in dog trachea. *Am J Physiol* 1991;261(Cell Physiol 30):C497.
8. Montaño LM, Barajas-López C, Daniel EE. Canine bronchial sustained contraction in Ca^{2+} -free medium: role of intracellular Ca^{2+} . *Can J Physiol Pharmacol* 1996;74:1236.
9. Sims MS, Jiao Y, Zheng ZG. Intracellular calcium stores in isolated tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1996;271(Lung Cell Mol Physiol 15):L300.
10. Baró I, O'Neill SC, Eisner DA. Changes of intracellular $[Ca^{2+}]_i$ during refilling of sarcoplasmic reticulum in rat ventricular and vascular smooth muscle. *J Physiol Lond* 1993;465:21.
11. Gantkevich V, Isenberg G. Caffeine-induced release and reuptake of Ca^{2+} by Ca^{2+} stores in myocytes from pineal gland and bladder. *J Physiol (Lond)* 1992;458:69.
12. Yoshikawa A, van Breemen C, Isenberg G. Buffering of plasma calcium Ca^{2+} level by sarcoplasmic reticulum of pineal gland. *Am J Physiol* 1991;271(Cell Physiol 4):C107.

(Lora)

(bb)
Dr. Luis H.
A

DD, Tsien RW. A caffeine- and ryanodine-sensitive Ca^{2+} store in dog sympathetic neurons modulates effects of Ca^{2+} entry on Ca^{2+} stores in cultured guinea pig myenteric neurons. *Am J Physiol* 1992;450:217.

all BC, Yule DI, Mulholland MW. Caffeine- and ryanodine-sensitive Ca^{2+} stores in cultured guinea pig myenteric neurons. *Am J Physiol* 1996;270(Gastrointest Liver Physiol 33):G594.

ly JW Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 1986;7:1.

ly JW Jr. General aspects of calcium signaling. In: *Molecular Biology of Intelligence Unit, (editors) Capacitative calcium entry*. Austin, Landes Bioscience, 1997. p. 1-11.

T, Kawai K, Ito S, Nakazato Y. Ca^{2+} entry activated by emptying intracellular Ca^{2+} stores in ileal smooth muscle of the rat. *Br J Pharmacol* 1995;114:1165.

ni Y, Magnier C, Enouf J, Wuytack F, Bronner C. Ca^{2+} increase and Ca^{2+} influx in human tracheal smooth muscle cells: role of Ca^{2+} stores controlled by sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2 isoform. *Br J Pharmacol* 1995;115:1205.

klewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440.

I, Yamaguchi H. Calcium mobilization by muscarinic cholinergic stimulation in bovine single airway smooth muscle. *Am J Physiol* 1996;264(Lung Cell Mol Physiol 8):L496.

li M, Muraki K, Imazumi Y, Watanabe M. Cyclopiazonic acid, an inhibitor of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -pump, reduces Ca^{2+} -

dependent K^{+} currents in guinea-pig smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 1992;107:134.

22. Plenge-Telleches F, Soler F, Fernandez-Belda F. On the inhibition mechanism of sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases by cyclopiazonic acid. *J Biol Chem* 1997;272(5):2794.

23. Watanabe C, Yamamoto H, Hirano K, Kobayashi S, Kanaide H. Mechanisms of caffeine-induced contraction and relaxation of rat aortic smooth muscle. *J Physiol* 1992;456:193.

24. Pessah IN, Stambuk RA, Casida SE. Ca^{2+} -activated ryanodine binding: mechanisms of sensitivity and intensity modulation by Mg^{2+} , caffeine and adenine nucleotides. *Mol Pharmacol* 1987;31:232.

25. Van Breeem C, Chen Q, Laher I. Superficial buffer barrier function of smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Trends in Pharmacol Sci* 1995;16:98.

26. Chen Q, Cannel M, van Breeem C. The superficial buffer barrier in vascular smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 1992;70:509.

27. Janssen LJ, Walters DK, Watne J. Regulation of $[Ca^{2+}]_i$ in canine airway smooth muscle by Ca^{2+} -ATPase and Na^{+}/Ca^{2+} exchange mechanisms. *Am J Physiol* 1997;273(Lung Cell Mol Physiol 17):L522.

28. Janssen LJ, Beth PA, Netherton SJ, Walters DK. Superficial buffer barrier and preferentially directed release of Ca^{2+} in canine airway smooth muscle. *Am J Physiol* 1999;276(Lung Cell Mol Physiol 20):C744.

29. Fleischmann BK, Wang Y-X, Pring M, Kodiloff MI. Voltage-dependent calcium currents and cytosolic calcium in equine airway myocytes. *J Physiol* 1995;492(2):347.