



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

***CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA, BIOQUÍMICA Y MORFOLÓGICA
DE LOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS INVOLUCRADOS EN LA
HIPERREACTIVIDAD DE LAS VÍAS AÉREAS INDUCIDA POR RETO
ANTIGÉNICO EN COBAYOS SENSIBILIZADOS***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

Guadalupe Córdoba Rodríguez

TUTORA

DRA. PATRICIA SEGURA MEDINA

Jefa del Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Venegas"

México, Diciembre 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Jurado asignado

PRESIDENTE: Dr. Moises Eduardo Selman Lama

SECRETARIO: Dra. Patricia Segura Medina

VOCAL: Dr. Jesús Martínez Barnetche

VOCAL: Dr. Rodrigo Erick Escartín Pérez

VOCAL: Dra. Patricia Campos Bedolla

Dirección de Tesis

Doctora Patricia Segura Medina

*Jefa del departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial del
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas".*

Éste trabajo se realizó en el departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial (con el número de proyecto B17-12). Así como en el laboratorio de Biología Molecular, los dos laboratorios del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas". Durante sus estudios de doctorado la sustentante recibió beca por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (becario #296076). Además, por parte del Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (FIS/IMSS/G11/983). Y también por parte del Instituto Carlos Slim de la Salud (No. De Folio: S0922299).

Agradecimientos para la realización de éste trabajo

A la Dra. Patricia Segura Medina por la guía invaluable que has tenido conmigo en todos estos años juntas. No solo fuiste mi guía académica, eres mi profesor inspirador.

Al Dr. Mario Humberto Vargas Becerra por su enorme ayuda en la realización de mi artículo.

Al Dr. Víctor Ruíz y a la Dra. Verónica Estela Carbajal por su apoyo en la realización de los experimentos de qRT-PCR y Western blot.

A mi comité tutorial, Dr. Carlos Miguel Villalón Herrera, Dr. Eduardo García Zepeda y al Dr. Felipe Vadillo Ortega.

Al Dr. Moises Eduardo Selman Lama, Dr. Jesús Martínez Barnetche, Dr. Rodrigo Erick Escartín Pérez y a la Dra. Patricia Campos Bedolla por revisar mi trabajo y además enriquecerlo.

Al Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social “Centro Médico Nacional Siglo XXI”.

Agradecimientos a título personal

A mis padres que son las dos personas que nunca dudan de mí, que siempre me apoyan y siempre son incondicionales conmigo. Los amo.

A mi hermano César, que siempre contaré contigo. Y a mi hermano Miguel Ángel.

A mi hermano y mejor amigo Óscar. Por nuestro amor y apoyo absoluto.

A mi Ángel Gabrielle, como ya terminé esta tesis ya podemos: armar tus rompecabezas, colorear, ver abrazados tus películas y conquistar las montañas.

A la Dra. Patricia Segura Medina por ser paciente y amorosa conmigo. Aprendí muchas cosas contigo que sé me ayudarán en mi nuevo camino.

A mi familia, a la Banda Cleri-cool: A Teresa, Luz María, Raúl, Rocío, Luis, Hazel, Brandon, Karla, Aarón y Óscar.

A mis sobrinos que amo con locura loca y siempre serán los niños de mis ojos: María José, Aaroncito, María Fernanda y Raúl Eduardo.

A mi persona, Mayra Dinorah que adoro con todo mi corazón.

A mis mejores amigos Karla Alejandra, Celia, Tania, Nancy, Edgar, Mairo, Adriana.

A todos lo que han sido mis alumnos, en especial a mis lindas Paulina Mercadillo Herrera y Fabiola Zulema Espina Ordoñez.

Y, por último, dedico ésta tesis a mí misma ♥.

Índice general

	Página
1. Antecedentes	11
1.1. Serotonina	11
1.1.1. Síntesis y Metabolismo de serotonina.....	12
1.1.2. Receptores de Serotonina.....	14
1.1.3. Transportador de Serotonina.....	17
1.2. Asma	19
1.2.1. Hiperreactividad de las vías aéreas.....	23
1.2.2. Modelos de asma en animales.....	25
1.3. Serotonina y asma	27
1.3.1. Serotonina y asma: Inflamación.....	27
1.3.2. Serotonina y asma: Broncoobstrucción.....	29
1.3.3. Serotonina y asma: Hiperreactividad de las vías aéreas.....	33
2. Justificación	41
3. Hipótesis	42
4. Objetivos	43
5. Material y Métodos	44
5.1. Animales.....	44
5.2. Procedimiento de sensibilización y reto antigénico.....	44
5.3. Pletismografía para animales anestesiados.....	45
5.4. Modelo de hiperreactividad de las vías aéreas.....	46
5.5. Tratamiento de los tejidos usados para experimentos de qRT-PCR y Western-Blot.....	48
5.6. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).....	49
5.7. Pletismografía barométrica.....	51
5.8. Western-blot.....	52
5.9. Análisis estadístico.....	54
6. Resultados	55
6.1. Caracterización farmacológica	55
6.1.1. Al bloquear al receptor 5-HT _{1B/1D} genera hiperreactividad en cobayos con modelo de asma.....	56
6.1.2. El receptor 5-HT _{5A} no está involucrado en la hiperreactividad en cobayos con modelo de asma.....	57
6.1.3. El receptor 5-HT ₆ tampoco evita la hiperreactividad en cobayos con modelo de asma.....	58
6.1.4. Caracterización farmacológica completa de los receptores de serotonina en el desarrollo de hiperreactividad en cobayos con modelo de asma.....	59
6.2. Caracterización molecular	61
6.2.1. El mRNA de los receptores de serotonina se expresa en las vías aéreas.....	62
6.2.2. La expresión del mRNA de los receptores 5-HT _{1A} depende del grado de broncoobstrucción en cobayos con modelo de asma.....	62
6.2.3. La expresión del mRNA de los receptores 5-HT _{2A} de serotonina disminuye con el proceso de sensibilización.....	64
6.2.4. La expresión del mRNA de los receptores 5-HT ₃ de serotonina no se modifica con el proceso de sensibilización.....	65

6.2.5.	La expresión del mRNA de los receptores 5-HT ₄ de serotonina disminuye en las vías aéreas con el proceso de sensibilización.....	66
6.2.6.	La expresión del mRNA de los receptores 5-HT _{5a} de serotonina no cambia en las vías aéreas con el proceso de sensibilización.....	68
6.2.7.	La expresión del mRNA de los receptores 5-HT ₆ de serotonina no cambia en las vías aéreas con el proceso de sensibilización.....	69
6.2.8.	La expresión del mRNA de los receptores 5-HT ₇ de serotonina aumenta en las vías aéreas con el proceso de sensibilización.....	70
6.2.9.	La expresión del mRNA de los receptores 5-HT _{2A} , 5-HT ₄ y 5-HT ₇ son los que se modifican en las vías aéreas con el proceso de sensibilización.....	71
6.3.	Caracterización bioquímica.....	72
6.3.1.	El receptor 5-HT _{2A} aumenta su expresión en epitelio bronquial de cobayos con modelo de asma.....	72
6.3.2.	El receptor 5-HT ₄ aumenta su expresión en parénquima pulmonar de cobayos con modelo de asma.....	74
6.3.3.	El receptor 5-HT ₇ no aumenta ni disminuye su expresión en tejidos pulmonares de cobayos con modelo de asma.....	75
7.	Discusión.....	77
8.	Conclusiones y Perspectivas.....	85
9.	Referencias.....	87
10.	Publicación.....	95

Índice de figuras

Figura	Página
1. Estructura química de la serotonina.....	11
2. Síntesis y metabolismo de la serotonina.....	13
3. Mecanismos de acción que activan los 7 receptores de serotonina.....	15
4. Metabolismo de serotonina y sus sitios de acción en el sistema nervioso central y periférico.....	18
5. Prevalencia de los síntomas de asma entre los 13-14 años de edad.....	20
6. Proceso de sensibilización a un alérgeno en las vías aéreas.....	22
7. Curvas dosis-respuesta que muestra los cambios en el volumen espiratorio forzado al primer segundo (VEF1) inducido por distintas dosis de Metacolina o histamina.....	24
8. Cambio en el VEF1 inducido por dosis crecientes de Metacolina (estímulo broncoconstrictor) en sujetos con asma y sujetos control.....	25
9. Correlación entre las concentraciones libres de serotonina y el VEF1 (Volumen Espiratorio Forzado al primer segundo) en pacientes asmáticos.....	28
10. Decremento de la fase de relajación inducida por serotonina usando el antagonista Ketanserina (KT) para el receptor 5-HT _{2A} en anillos traqueales de cobayos.....	30
11. Efecto en la respuesta de serotonina en anillos traqueales de cobayos con modelo de asma.....	31
12. Efecto broncoobstructor de la serotonina en cobayos.....	32
13. Efecto de los receptores de serotonina en la broncoobstrucción en cobayos.....	33
14. Relación entre las concentraciones de serotonina plasmáticas y la broncoobstrucción máxima.....	34
15. Hiperreactividad a acetilcolina después del reto antigénico.....	35
16. Receptores de serotonina que están involucrados en la generación de hiperreactividad.....	36
17. Efecto de LP44 (agonista del receptor 5-HT ₇) y de Cisaprida (agonista del receptor 5-HT ₄) en la contracción inducida por una estimulación eléctrica de campo en anillos traqueales de cobayos.....	37
18. Concentración de serotonina en homogenados de parénquima pulmonar de cobayos control y cobayos con modelo de asma.....	37
19. Microscopia confocal para los receptores nicotínicos $\alpha 7$ (Receptor nACh) y serotonina (5-HT) en el epitelio de las vías aéreas de cobayo.....	39
20. Eventos que probablemente ocurren durante el desarrollo de la hiperreactividad a acetilcolina inducida por el reto antigénico.....	40
21. Método de sensibilización.....	45
22. Sistema de pletismografía para animales anestesiados.....	47
23. Receptores 5-HT _{1B/1D} de serotonina están involucrado en la generación de hiperreactividad.....	57
24. Receptores 5-HT _{5a} de serotonina no pueden evitar la generación de hiperreactividad.....	58
25. Receptores 5-HT ₆ de serotonina no pueden evitar la generación de hiperreactividad.....	60
26. Efecto de diferentes antagonistas para los receptores de serotonina en la hiperreactividad en cobayos con modelo de asma.....	61
27. Expresión relativa del mRNA de los receptores de serotonina en pulmón de cobayos control.....	63
28. Expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT _{1A} en homogenados de pulmón de cobayos control y con modelo de asma y su relación con el Penh.....	64
29. Expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT _{2A} en homogenados de pulmón de cobayos control y con modelo de asma y su relación con el Penh.....	65

30. *Expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₃ en homogenados de pulmón de cobayos control y con modelo de asma y su relación con el Penh*.....66

31. *Expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₄ en homogenados de pulmón de cobayos control y con modelo de asma y su relación con el Penh*.....67

32. *Expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT_{5a} en homogenados de pulmón de cobayos control y con modelo de asma y su relación con el Penh*.....68

33. *Expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₆ en homogenados de pulmón de cobayos control y con modelo de asma y su relación con el Penh*.....69

34. *Expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₇ en homogenados de pulmón de cobayos control y con modelo de asma y su relación con el Penh*.....70

35. *Expresión relativa del mRNA de los receptores de serotonina en homogenados de pulmón de cobayos control y cobayos con modelo de asma*.....71

36. *Expresión de la proteína del receptor 5-HT_{2A} analizado por Western blot en tejidos pulmonares de cobayos control y cobayos con modelo de asma*.....73

37. *Expresión de la proteína del receptor 5-HT₄ analizado por Western blot en tejidos pulmonares de cobayos control y cobayos con modelo de asma*.....75

38. *Expresión de la proteína del receptor 5-HT₇ analizado por Western blot en tejidos pulmonares de cobayos sanos y cobayos con modelo de asma*.....76

Índice de cuadros

Cuadro		Página
1.	<i>Familias de receptores de serotonina y su específico acoplamiento a las proteínas G.....</i>	15
2.	<i>Subtipos de receptores de serotonina y sus funciones fisiológicas.....</i>	16
3.	<i>Antagonistas para receptores de serotonina usados en éste estudio.....</i>	48
4.	<i>Secuencia de primers para receptores de serotonina usados en éste estudio.....</i>	51

Resumen

El asma es una enfermedad de las vías aéreas que afecta a casi a 300 millones de personas en el mundo. El descifrar cuáles son los mecanismos que llevan a una persona sana a desarrollar asma, en la actualidad aún no son claros. Por lo que, el posible papel de la serotonina y sus receptores, es una fuerte línea de investigación para explicar el desarrollo del asma. En nuestro laboratorio, hemos reportado que los receptores de serotonina están involucrados en la generación de broncoobstrucción en cobayos con modelo de asma. Además, la serotonina se libera de manera activa en pulmones de cobayos con modelo de asma después de un reto antigénico a ovoalbúmina. También, los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT₄ y 5-HT₇ generan hiperreactividad en cobayos con modelo de asma. Para profundizar en esta línea de investigación, en el presente estudio caracterizamos a la mayoría de los receptores de serotonina en tejidos de las vías aéreas en cobayos con modelo de asma alérgica. Dicha caracterización, se realizó desde 3 perspectivas, la farmacológicas, la molecular y la bioquímica. Para la **caracterización farmacológica**, utilizamos antagonistas específicos para los receptores 5-HT_{1B/1D}, 5-HT_{5a} y 5-HT₆ en cobayos con modelo de asma; y con el equipo de pletismografía para animales anestesiados medimos si se evitaba o se generaba hiperreactividad. Encontramos, que solo el receptor 5-HT_{1B/1D} está involucrado en la generación de hiperreactividad en cobayos con modelo de asma. En la **caracterización molecular**, medimos la expresión relativa del mRNA con la técnica de qRT-PCR de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5a}, 5-HT₆ y 5-HT₇ en homogenados de pulmón de cobayos sometidos al modelo experimental de asma. Asimismo, se midió el grado de broncoobstrucción (Penh) en estos cobayos para determinar la correlación entre el Penh y la expresión relativa de estos receptores de serotonina. Nuestros resultados muestran que el mRNA de todos estos receptores se expresan de manera constitutiva en pulmón de cobayo. Además, disminuyó la expresión relativa de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₄ y aumentó la expresión de los receptores 5-HT₇ en pulmones de cobayos con modelo de asma. Existe una correlación inversamente proporcional entre el grado de broncoobstrucción y la expresión del mRNA del receptor 5-HT_{1A}. Por último, en la **caracterización bioquímica** se cuantificó la expresión protéica de los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT₄ y 5-HT₇ en músculo y epitelio traqueal, epitelio bronquial y parénquima pulmonar en cobayos con modelo de asma. Se encontró que aumentó la expresión de la proteína del receptor de 5-HT_{2A} en el epitelio bronquial y del receptor 5-HT₄ en el parénquima pulmonar. A partir de nuestros resultados, llegamos a la conclusión que los principales subtipos de receptores de serotonina se expresan constitutivamente en pulmón cobayos y que el proceso de sensibilización alérgica modifica la expresión de los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT₄, y 5-HT₇.

ANTECEDENTES

SEROTONINA

La 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina) fue descubierta casi simultáneamente en dos laboratorios diferentes. En 1937, Vittorio Erspamer descubrió en la mucosa gástrica de conejo una amina bioactiva a la que llamó *enteramina*. Posteriormente, en 1947 Maurice Rapport, Arda Green e Irvine Page descubrieron una sustancia con propiedades vasoconstrictoras en suero de bovino a la cual llamaron *serotonina*. Pocos años después, se determinó la estructura química de estas dos moléculas y se determinó que eran la misma; y se decidió dejarle el nombre de serotonina¹.

La estructura química de la serotonina (Figura 1) posee un grupo hidroxilo en la posición 5 del anillo indol y una amida nitrogenada primaria que actúa como aceptador de protones a un pH fisiológico².

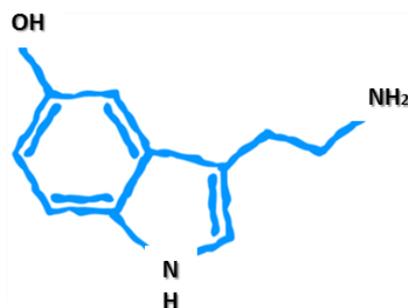


Figura 1. Estructura química de la serotonina

Síntesis y Metabolismo de la serotonina

La serotonina es una molécula que se sintetiza en varias células del organismo. El aproximadamente 95% de la síntesis de serotonina es en las células enterocromafines³. El 5% restante de la síntesis de serotonina se reparte entre las neuronas serotoninérgicas del núcleo de Rafé, en las células neuroendócrinas pulmonares⁴ y células cebadas⁵.

Las plaquetas son el mayor reservorio de serotonina en el organismo, el 99% de la serotonina en la sangre es almacenada en las plaquetas. Estas no sintetizan serotonina, ya que carecen de la maquinaria enzimática para hacerlo. Sin embargo, si pueden almacenar a la serotonina, ya que expresan el transportador de serotonina (SERT) que ayuda a las plaquetas a capturar a la serotonina del tracto gastrointestinal y del pulmón. Las plaquetas liberan la serotonina durante la agregación plaquetaria⁶.

La síntesis de serotonina (Figura 2) comienza cuando el aminoácido primordial *L-triptófano* es transformado por la triptófano hidroxilasa (TPH) en *5-hidroxitriptófano*. Existen dos tipos de TPH, la TPH1 que se expresa en células no neuronales y la TPH2 se expresa en las neuronas serotoninérgicas. Este paso de la síntesis de serotonina es considerado como limitante; ya que dependiendo de la cantidad de triptófano disponible dependerá la cantidad de serotonina que se sintetiza.

El siguiente paso de la síntesis de serotonina es la acción de la enzima descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos. Esta enzima toma al 5-hidroxitriptófano y lo transforma en *5-hidroxitriptamina*, o sea en serotonina.

Cuando las neuronas o las células enterocromafines sintetizan serotonina, la almacenan. Una vez que la serotonina es liberada de donde está almacenada, se puede acoplar con sus receptores o puede ser metabolizada. La enzima que metaboliza a la serotonina es la monoamino oxidasa (MAO) y la transforma en *acetaldehído del 5-hidroxiindol*. Esta molécula a su vez, es metabolizada por la enzima aldehído deshidrogenasa y se obtiene el principal metabolito de la serotonina, el *ácido acético 5-hidroxiindol* (Figura 2).

Los tejidos que contribuyen considerablemente al metabolismo de serotonina son el pulmón, intestino y el endotelio vascular. Aunque, cualquier célula que posea a la MAO, tiene el potencial de metabolizar serotonina⁷.

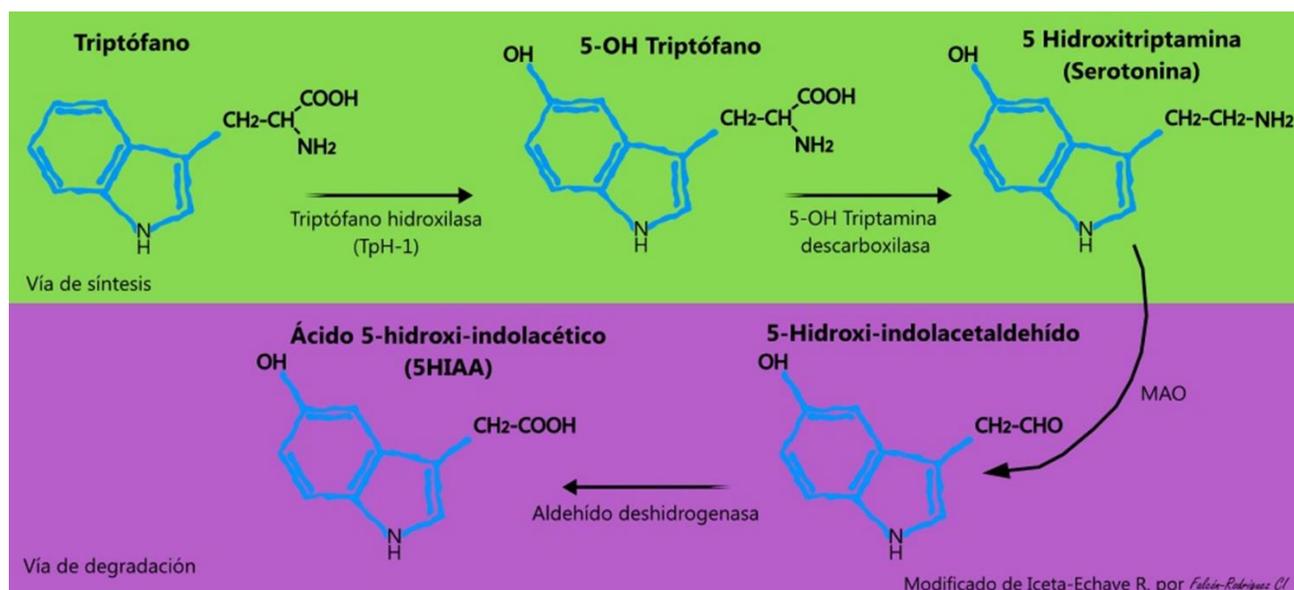


Figura 2. Síntesis y metabolismo de la serotonina

Receptores de serotonina

La serotonina tiene múltiples funciones en el organismo y esto se debe a su gran variedad de receptores. Estos receptores se expresan tanto en sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico. Así como en tejidos no neuronales como pulmón, intestino y vasos sanguíneos.

Para clasificar a los receptores de serotonina se deben de tener en cuenta tres criterios que sugiere la Unión Internacional de Farmacología (UIPHAR, siglas en inglés). El primer criterio es la *estructural* del receptor; se refiere a la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos. El segundo criterio es el *transduccional*; esto es saber si el receptor está acoplado a alguna proteína G y que segundos mensajeros se activan. Por último, el tercer criterio es el *operacional* y es sobre los agonistas y antagonistas que estimulan al receptor^{8,9,10}.

Hasta éste momento, se han identificado siete familias de receptores y se identifican con números: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ y 5-HT₇. Los receptores de serotonina son del tipo 7- transmembrana y están acoplados a proteínas G, excepto el receptor 5-HT₃ que es un receptor ionotrópico. Y dependiendo a que proteína G están acoplados, es el tipo de mecanismo de acción que se activa (cuadro 1 y Figura 3).

A su vez, los receptores de serotonina tienen subtipos, teniendo un total de 15 diferentes tipos de receptores para serotonina. Esta gran variedad de receptores, es lo que hace que la

serotonina sea una molécula versátil, ya que tiene diferentes funciones en todo el cuerpo (cuadro 2 y Figura 3).

Cuadro 1. Familias de receptores de serotonina y su específico acoplamiento a las proteínas G

Familia	Proteína G	Mecanismo de acción
5-HT ₁	G _i /G _o	↓ concentraciones intracelulares de AMPc
5-HT ₂	G _q 11	↑ concentraciones intracelulares de IP ₃ y DAG
5-HT ₃	Canal ionotrópico Na ⁺ /K ⁺	Despolarización de la membrana plasmática
5-HT ₄	G _s	↑ concentraciones intracelulares de AMPc
5-HT ₅	G _i /G _o	↓ concentraciones intracelulares de AMPc
5-HT ₆	G _s	↑ concentraciones intracelulares de AMPc
5-HT ₇	G _s	↑ concentraciones intracelulares de AMPc

AMPc (adenosín monofosfato cíclico), IP₃ (inositol trifosfato), DAG (diacilglicerol). (Modificado de Pytliak, 2010¹¹).

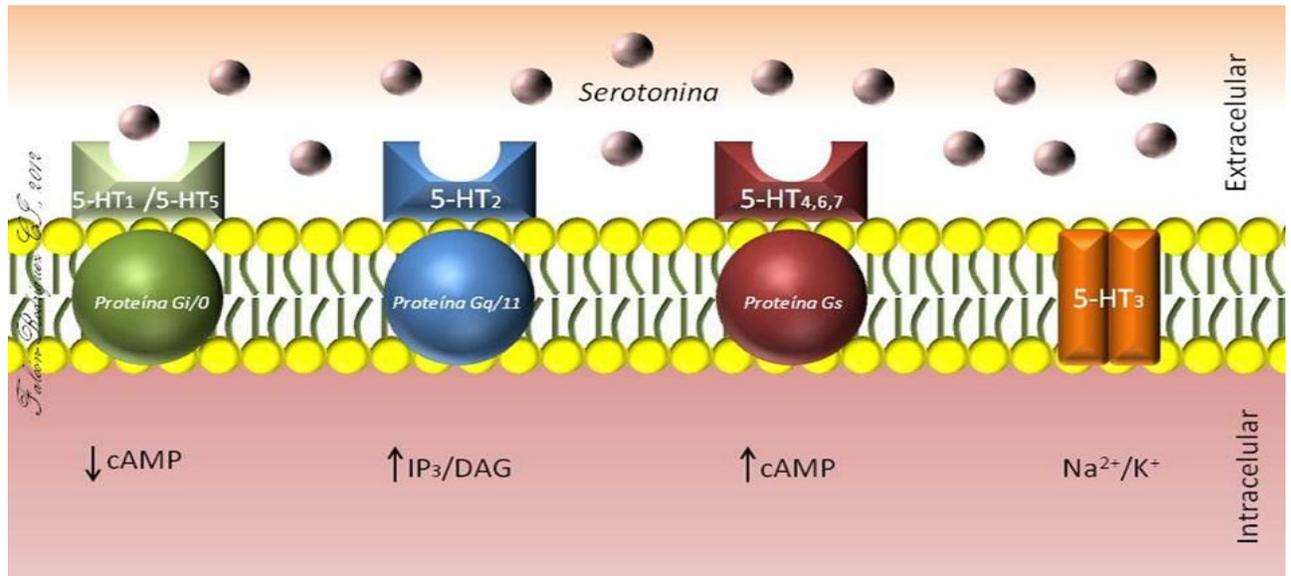


Figura 3. Mecanismos de acción que activan los 7 receptores de serotonina. cAMP (adenosín monofosfato cíclico), IP₃ (inositol trifosfato), DAG (diacilglicerol). (Modificado de Pytliak, 2010¹¹).

Cuadro 2. Subtipos de receptores de serotonina y sus funciones fisiológicas.

Receptor	Función	Agonista	Antagonista
5-HT_{1A}	SNC: agresión, ansiedad, adicción, apetito, émesis, memoria, impulsividad, humor, náuseas, respiración, sueño, respiración, sueño, comportamiento sexual. SCV: presión arterial, vasoconstricción, latidos. Otros: dilatación de la pupila.	8-OH-DPAT, NLX-101	Robalzotan, WAY-100635
5-HT_{1B}	SNC: agresión, ansiedad, aprendizaje, memoria, conducta sexual, humor, locomoción. SCV: vasoconstricción pulmonar, erección.	CP94253	GR-55562
5-HT_{1D}	SNC: locomoción, ansiedad. SCV: vasoconstricción cerebral.	PNU109291, eletriptan	SB 714786
5-HT_{1e}	SNC: Memoria.	BRL-54443	Metiotepina*
5-HT_{1F}	SNC: ¿locomoción? ¿ansiedad? SCV: vasoconstricción	Lasmiditan	Metiotepina*
5-HT_{2A}	SNC: ansiedad, apetito, cognición, imaginación, aprendizaje, memoria, humor, percepción, comportamiento sexual, sueño, termorregulación. SCV: vasodilatación y vasoconstricción. ML: contracción. Plaquetas: agregación.	DOI, LSD, mescalina.	Ketanserina.
5-HT_{2B}	SNC: ansiedad, apetito, sueño. TGI: movilidad gastrointestinal. SCV: vasoconstricción.	BW723C86.	BF-1.
5-HT_{2C}	SNC: ansiedad, apetito, adicción, locomoción, humor, comportamiento sexual, sueño, termorregulación. TGI: movilidad gastrointestinal. SCV: vasoconstricción, erección del pene.	WAY-163909, Lorcaserin.	SB 242084, FR260010.
5-HT₃ (5-HT_{3A}, 5-HT_{3B})	SNC: ansiedad, adicción, náuseas, émesis, aprendizaje, memoria, excitación neuronal. TGI: movilidad gastrointestinal, náusea, émesis.	SR57227A,	Palonosetron, ondansetron.
5-HT₄ (5-HT_{4A-H})	SNC: ansiedad, aprendizaje, memoria, apetito, humor, respiración. TGI: movilidad gastrointestinal.	Cisaprida, relenopride.	SB 204070, GR 113808.
5-HT_{5a}	SNC: locomoción, sueño.	Ninguno.	SB 699551.
5-HT₆	SNC: ansiedad, cognición, aprendizaje, memoria, humor.	WAY-181187, WAY-208466.	SB399885, cerlapirdine.

5-HT₇	SNC: ansiedad, memoria, humor, respiración, sueño, termorregulación. SCV: Vasoconstricción.	LP-44, LP-211.	SB269970, SB656104.
-------------------------	--	----------------	------------------------

SNC: Sistema Nervioso Central, SCV: Sistema Cardiovascular, TGI: Tracto Gastrointestinal, ML: Músculos Lisos, LSD: Ácido Lisérgico. Se presentan algunos de los agonistas y antagonistas selectivos para cada receptor de serotonina. La IUPHAR menciona al receptor 5-HT_{5b} pero éste receptor aún no cuenta con agonistas ni antagonistas, ni se le ha encontrado una función fisiológica. *Receptores que aún no tienen antagonistas selectivos. (Pytiak 2010¹¹, IUPHAR 2016¹²)

Transportador de serotonina en plaquetas

El transportador de serotonina (SERT; 5-HTT) es una proteína transmembranal sodio dependiente, ya que permite la entrada de iones Na²⁺ y la salida de iones Cl⁻. La principal función del SERT es regular las concentraciones de serotonina sinápticas.

El SERT se expresa en cerebro (terminales presinápticas serotoninérgicas). Y fuera del cerebro, SERT se expresa en pulmón, venas, arterias, en las plaquetas placentarias y sanguíneas, en el epitelio gastrointestinal, en la glándula adrenal y en los linfocitos B.

El SERT tiene gran importancia en patologías como dolor crónico, migraña, ansiedad, depresión, esquizofrenia e hipertensión. Además, drogas de abuso como las anfetaminas y la cocaína engañan al SERT, y son usadas como sustratos de éste transportador. Esto favorece que las concentraciones de serotonina aumenten en el espacio sináptico y en el plasma; y esto ocasiona que disminuya la expresión de SERT en el cerebro y en las plaquetas.

Como se mencionó anteriormente, las plaquetas almacenan hasta el 99% de la serotonina del plasma. Esto las hace acreedoras del mayor reservorio de serotonina en el cuerpo. El SERT se encuentra en la membrana plasmática de las plaquetas y cuando hay un exceso de serotonina en el plasma, el SERT la introduce a las plaquetas. La serotonina almacenada en las plaquetas tiene

dos destinos; uno es que sea almacenada en gránulos por un tipo de transportador llamado vesicular de monoaminas (VMAT). Y el otro destino de la serotonina, es que sea metabolizada por la MAO-B que se encuentra en el citoplasma de las plaquetas (Figura 4).

La serotonina almacenada en las plaquetas es liberada por exocitosis cuando se activan otras moléculas como la trombina, ADP, colágeno y la adrenalina. También, en respuesta a procesos como el daño tisular e isquemia.

Por otro lado, el único receptor que se expresa en la membrana plasmática de las plaquetas es el 5-HT_{2A} que juega un papel importante en el proceso de agregación plaquetaria¹³.

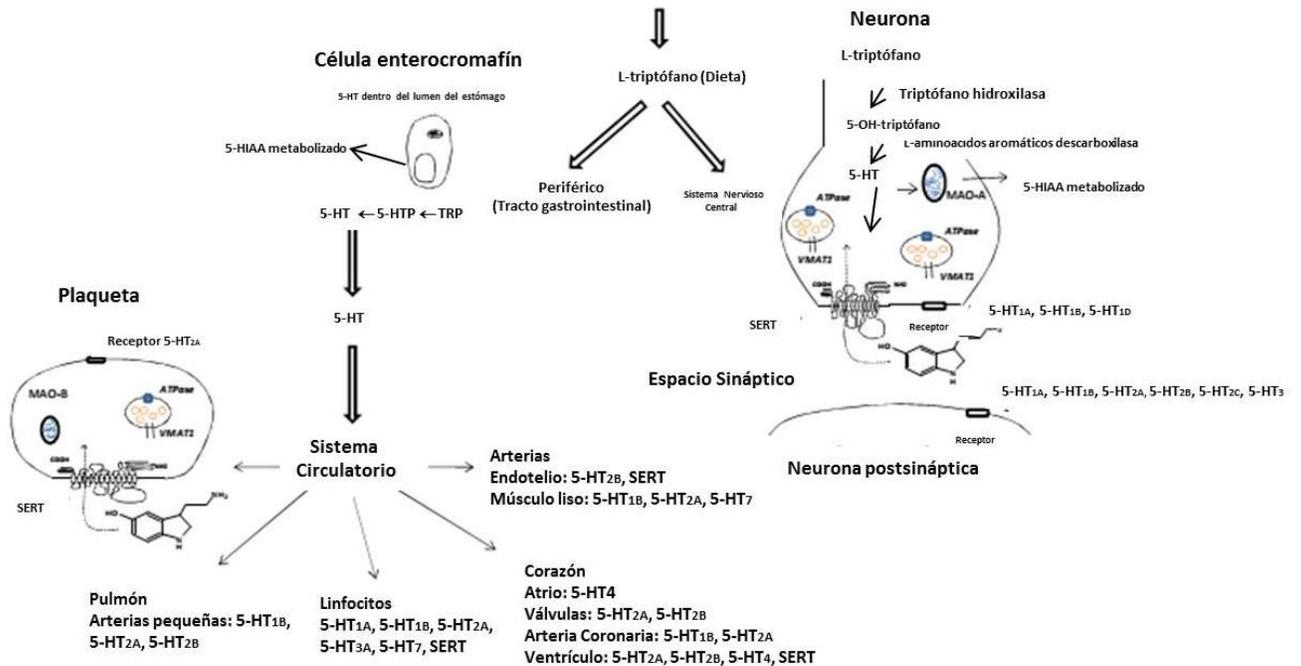


Figura 4. Metabolismo de serotonina y sus sitios de acción en el sistema nervioso central y periférico. (Modificado de Yubero-Laboz 2013¹³).

ASMA

El asma es una enfermedad de las vías aéreas que afecta aproximadamente a 300 millones de personas a nivel mundial, una cifra considerablemente alta. Ya que, esta enfermedad no discrimina ni edad ni sexo ni condición social. Hasta éste momento, aún no se sabe con exactitud cuáles son los factores que hacen que una persona presente asma. Por lo que, el saberlo sería de gran ayuda, ya que se podrían proponer estrategias terapéuticas más efectivas para el tratamiento de esta enfermedad.

La edad y el sexo pueden llegar a determinar el desarrollo y la progresión del asma. En el área de investigación, tanto clínica como básica sobre el asma, existen varios programas a nivel mundial que se enfocan en dar soluciones de tratamiento y de prevención. Uno de estos programas es el *Estudio Internacional de Asma y Alergias en la Infancia* (ISAAC, The International Study of Asthma and Allergies in Childhood; Figura 5). Este es un programa de investigación epidemiológico sobre el asma, rinitis y dermatitis; se aplica en más de 100 países en aproximadamente 2 millones de niños. El objetivo principal de ISAAC es planear soluciones para reducir el desarrollo de estas enfermedades principalmente en niños que viven en países en vías de desarrollo (<http://isaac.auckland.ac.nz/index.html>).

Por otro lado, en un estudio en México se encontró que los casos de asma en hombres y mujeres dependen de la edad. Entre los 0-4 años de vida se observan más casos de asma en hombres que en mujeres (en una proporción 4-5:1, respectivamente). Después, hasta la pubertad las proporciones entre hombres y mujeres pueden mantenerse 1:1.

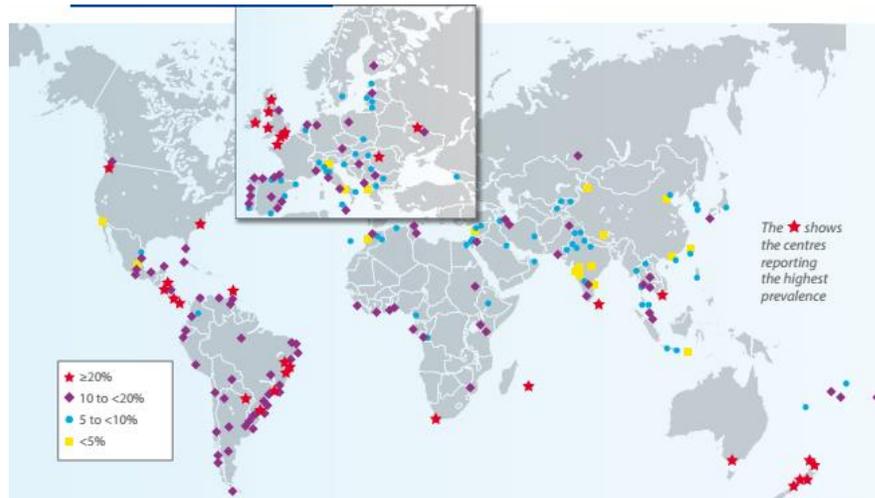


Figura 5. Prevalencia de los síntomas de asma entre los 13-14 años de edad (ISAAC, 2014)

Sin embargo, al llegar a la edad reproductiva la proporción entre hombres y mujeres pueden llegar a invertirse hasta 5 casos de mujeres asmáticas por 1 de hombre asmático. La mayor diferencia entre los casos de desarrollo de asma entre mujeres y hombres es a la edad de los 50 años, coincidiendo con la menopausia¹⁴.

El asma es definido como una enfermedad caracterizada, usualmente, por una inflamación crónica de las vías aéreas. Los síntomas recurrentes del asma son tos, sibilancias, dificultad al respirar y opresión en el pecho. Estos síntomas van acompañados de la limitación reversible del flujo de aire¹⁵.

La inflamación que se desarrolla en el asma ocasiona una broncoobstrucción reversible, hiperreactividad de las vías aéreas, infiltración de eosinófilos y células T del tipo 2 (Th2) dentro de la submucosa aérea, hipersecreción de moco y remodelación de las vías aéreas¹⁶.

El asma se ha clasificado en alérgico y no alérgico. El asma alérgico es clasificado como una reacción de hipersensibilidad del tipo I. En la mayoría de los casos de personas con asma, la

inflamación es producida por una reacción alérgica que puede ser desencadenada por ácaros del polvo casero, pólenes, proteínas animales, etc¹⁷.

En el asma no alérgico los síntomas no se asocian a algún alérgeno. Los pacientes reaccionan a estímulos como aire frío o seco, humedad, ejercicio, contaminantes o infecciones. Se ha propuesto que el asma no alérgico es un tipo de autoinmunidad o autoalergia debido a la activación anormal de los linfocitos¹⁸.

Para que se produzca la alergia, las vías aéreas deben de *sensibilizarse* al alérgeno. La sensibilización empieza con la captura y procesamiento de los nuevos alérgenos por las células dendríticas; estas células son catalogadas como células presentadoras de antígenos profesionales. Las células dendríticas presentan al alérgeno procesado a las células Th0 y éste evento deriva en la diferenciación de éstas células Th0 en Th2. Estos linfocitos liberan las citosinas IL-4 e IL-13 que estimulan la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas productoras de inmunoglobulina E (IgE) alérgeno específicas.

La IgE recién sintetizada se une a receptores de IgE de alta afinidad (FcεRI) que se encuentran en la membrana de las células cebadas induciendo la sensibilización²¹ (Figura 6).

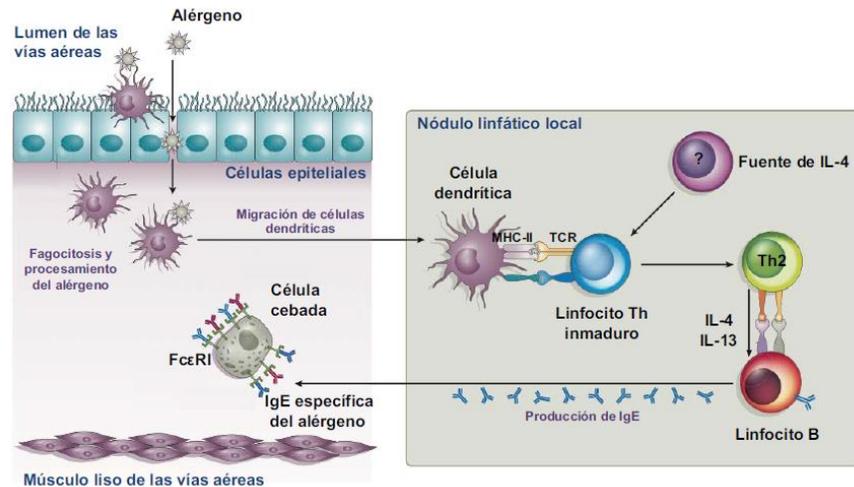


Figura 6. Proceso de sensibilización a un alérgeno en las vías aéreas (Modificado de Galli 2010²⁰).

Cuando hay una reexposición al alérgeno, éste se une a los receptores FcεRI en las células cebadas provocando que estas células degranulen. Esto ocasiona que se liberen moléculas preformadas como la histamina, serotonina, triptasa, así como mediadores inflamatorios sintetizados *de novo* como leucotrienos, prostaglandinas, factor activador de plaquetas y bradicinina^{20, 21}.

Cuando se desarrolla la inflamación alérgica en las vías aéreas, por lo regular se presentan dos respuestas de ésta inflamación: la temprana y la tardía. En la fase temprana de la alergia histamina, proteasas, leucotrienos, prostaglandinas, bradicinina y el factor activador de plaquetas. Las consecuencias de los efectos de estos mediadores inflamatorios son broncoespasmo agudo, vasodilatación, edema, secreción de moco. Algunos de los mediadores liberados en esta fase reclutan y activan células que están involucrados en la respuesta tardía de la inflamación.

En la respuesta tardía de la inflamación IL-4, IL-5, IL-13, RANTES, leucotrienos, TNF α , GCSF, neuropéptidos, moléculas de adhesión y TGF α . Estos mediadores generan un broncoespasmo más sostenido, remodelación e hipersecreción de moco^{19, 20,21}.

Una consecuencia importante de la inflamación crónica es la inestabilidad de las vías aéreas haciendo que el calibre de estas se reduzca drásticamente ante estímulos endógenos o exógenos; produciéndose la hiperreactividad de las vías aéreas²².

Hiperreactividad de las vías aéreas

La inflamación crónica en el asma ocasiona que las vías aéreas se vuelvan inestables e hipersensibles. En consecuencia, las vías aéreas pueden responder de forma exagerada a estímulos diversos (aire frío, ejercicio, estrés, inhalación de soluciones hipotónicas, etc.) produciendo una disminución del calibre bronquial. A esta hipersensibilidad de las vías aéreas se le denomina *hiperreactividad de las vías aéreas*.

La hiperreactividad de las vías aéreas es la principal anomalía funcional del asma y es proporcional al grado de severidad del asma²³ (Figura 7). La hiperreactividad se refiere a la respuesta exagerada que tienen las vías aéreas al someterse a estímulos que no generan ésta respuesta en sujetos control²⁴.

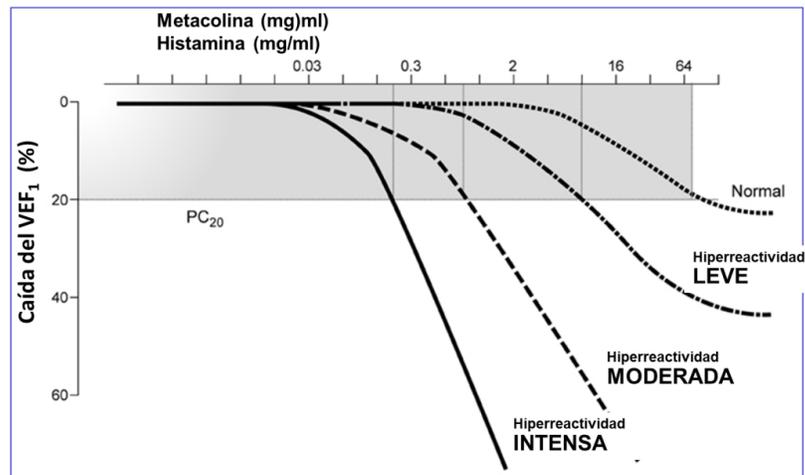


Figura 7. Curvas dosis-respuesta que muestra los cambios en el volumen espiratorio forzado al primer segundo (VEF₁) inducido por distintas dosis de Metacolina o histamina. Modificado GINA 2010²⁵.

Una forma de evaluar clínicamente la hiperreactividad es con pruebas de broncoprovocación y existen dos tipos de pruebas: las inespecíficas y las específicas. Las inespecíficas consisten en administrar dosis crecientes de sustancias broncoconstrictoras como metacolina o histamina. Para sujetos que se presume que tienen asma, a dosis bajas de metacolina o histamina tienden a tener una caída del 20% del volumen espiratorio máximo al primer segundo (VEF₁); al comparar los VEF₁ con predichos en sujetos controles. Por su parte, las pruebas específicas son similares que las inespecíficas, con la diferencia en que se usan los alérgenos que se sabe que provoca la broncoconstricción, ejercicio y solución salina hipertónica²⁶,

27.

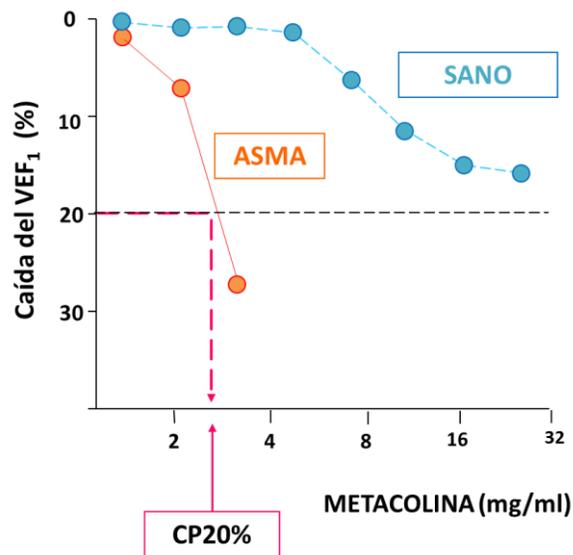


Figura 8. Cambio en el VEF₁ inducido por dosis crecientes de Metacolina (estímulo broncoconstrictor) en sujetos con asma y sujetos sanos. La dosis provocativa 20 (CP20) es definido como la dosis de Metacolina que provoca que las vías aéreas se obstruyan un 20%. Los sujetos asmáticos tienen un umbral de respuesta muy reducido en comparación de los sujetos sanos; lo que indica una mayor sensibilidad de las vías aéreas en sujetos asmáticos. Modificado O'byrne 2003²⁷.

En este sentido, cuando se desencadena el proceso inflamatorio durante el asma se estimulan a varios tipos de células como las células dendríticas, cebadas, epiteliales, a las terminaciones nerviosas y a las plaquetas. Por lo tanto, estos componentes de las vías aéreas vierten sus mediadores químicos que almacenan generando hiperreactividad. La serotonina representa uno de estos mediadores²⁰; cuya importancia actualmente está despertando el interés de varios grupos de investigación.

Modelo de asma en animales

Los modelos de asma en animales son utilizados para estudiar los mecanismos involucrados en la fisiopatología del asma. Diversos parámetros se pueden medir en los modelos animales como IgE específica, infiltrado de eosinófilos, contracciones diafragmáticas e hipertrofia del

músculo liso. Existen diversos modelos de asma en animales como en ratas, ratones, cobayos, conejos, entre otros.

El modelo de asma en cobayos es un buen modelo para estudiar esta enfermedad ya que genera una respuesta alérgica a alérgenos externos como la ovoalbúmina, produce IgE e IgG₁ específica, hay infiltrado de eosinófilos y neutrófilos, el músculo liso se contrae y se genera hiperreactividad bronquial. Además, la anatomía de las vías aéreas de los cobayos es similar a la de los humanos y desarrollan cambios estructurales parecidos a los pacientes asmáticos. Sin embargo, una de las principales limitantes de este modelo animal de asma es que existe una escases de reactivos específicos para esta especie. Aún con esta limitante, el cobayo ofrece un atractivo modelo animal para estudiar los mecanismos que originan las alteraciones de la función respiratoria en el asma^{74, 75, 76}.

SEROTONINA Y ASMA

La inquietud en varios grupos de investigación sobre la relación entre la serotonina y el asma, ha derivado en la publicación de varios. El papel de la serotonina se ha estudiado en los temas de inflamación, broncoobstrucción e hiperreactividad de las vías aéreas en el asma. Además, estas investigaciones se centran tanto en estudios clínicos como en estudios con modelos animales.

En 1996, el grupo del investigador Lechín tenían la inquietud de conocer si la serotonina estaba involucrada en la función respiratoria de pacientes con asma. Así, reportaron la correlación inversamente proporcional entre las concentraciones libres de serotonina y el VEF₁ en pacientes asmáticos. Ya que, mientras van en aumento las concentraciones de serotonina en la sangre de los pacientes asmáticos, va decreciendo la función pulmonar²⁸ (Figura 9).

Serotonina y asma: Inflamación

Como se explicó anteriormente, la inflamación en las vías aéreas es una de las principales características en el asma alérgica. En la inflamación de las vías aéreas actúan varias células inflamatorias como las células cebadas, basófilos, linfocitos, células dendríticas, eosinófilos y neutrófilos. Estas células producen varios mediadores inflamatorios como lípidos, péptidos, purinas, citosinas y especies reactivas a oxígeno. Las moléculas que producen las células inflamatorias afectan a varias células de las vías aéreas como las células epiteliales, fibroblastos,

células vasculares y a las células del músculo liso. Al igual, las terminaciones nerviosas que inervan a las vías aéreas son activadas y sensibilizadas durante la inflamación²⁹.

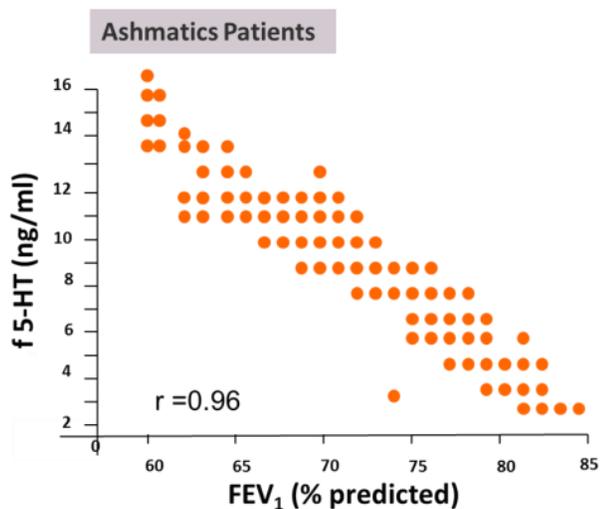


Figura 9. Correlación entre las concentraciones libres de serotonina y el VEF₁ en pacientes asmáticos.

Dado lo anterior, se han realizado investigaciones en pacientes asmáticos en búsqueda en la relación entre la serotonina y sus receptores con las células inflamatorias en el asma alérgica.

Un grupo de investigadores alemanes hicieron estudios con células dendríticas de pacientes asmáticos y concluyeron que la serotonina es un potente regulador de las células dendríticas, ya que la serotonina modula la migración de las células dendríticas de las vías aéreas por medio de los receptores 5-HT₁ y 5-HT₂. Además, la serotonina regula la producción de la IL-6 (una citosina proinflamatoria) en las células dendríticas por medio de los receptores 5-HT₃, 5-HT₄ y 5-HT₇. Además, los receptores 5-HT₄ y 5-HT₇ regulan la producción de la IL-10 (citosina antiinflamatoria). Finalmente, los autores de este estudio concluyeron que la serotonina favorece que se presente una respuesta inmune del tipo Th2⁷².

En otro estudio, en monocitos de humanos control se reportó que éstas células expresan a los receptores 5-HT_{1E}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT₄ y 5-HT₇. El receptor 5-HT₃ regula la producción de IL-1 β , IL-8/CXCL8, IL-12p40 y TNF- α , mientras que los receptores 5-HT₄ y 5-HT₇ promueven la liberación de IL-1 β , IL-6, IL-8/CXCL8 e IL-12p40; e inhiben la liberación de TNF- α ³¹.

Por otra parte, en el epitelio de neumocitos II en humanos se expresan los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT₄, 5-HT₆, 5-HT₇. Estos receptores, excepto el 5-HT_{1A}, regulan la liberación de IL-8/CXCL8 e IL-6³².

Por otro lado, también existe abundante información en modelos animales sobre la relación entre la serotonina y el asma. En un estudio en pacientes y ratones con asma se les hizo lavado bronco alveolar y se observó que existen una gran concentración de serotonina. Además, al bloquear a la enzima TPH1 se encontró que se atenúa la inflamación alérgica. Por último, en este trabajo se propone que la serotonina que se acumula después de un reto alérgico a ovoalbúmina proviene de las plaquetas³³.

Serotonina y asma: Broncoobstrucción

En nuestro grupo de trabajo, existe una importante línea de investigación sobre la relación entre la serotonina y el asma. Nosotros nos evaluado la relación de la serotonina con el asma alérgico en la broncoobstrucción e hiperreactividad de las vías aéreas. Utilizando un modelo de asma alérgica a ovoalbúmina en cobayos machos.

Como se mencionó previamente, el receptor 5-HT_{2A} se expresa en todos los músculos lisos y su estimulación genera contracción. En 2008³⁴, se la serotonina a través del receptor 5-HT_{2A} genera una *respuesta bifásica* en el músculo liso de la tráquea (Figura 10). Esta respuesta bifásica consiste en una respuesta inicial de contracción y una respuesta posterior de relajación.

En experimentos en cobayos con modelo de asma la respuesta bifásica de la serotonina contrasta con lo obtenido con los cobayos claros. La contracción es más sostenida en el músculo liso de cobayos con modelo de asma (Figura 11).

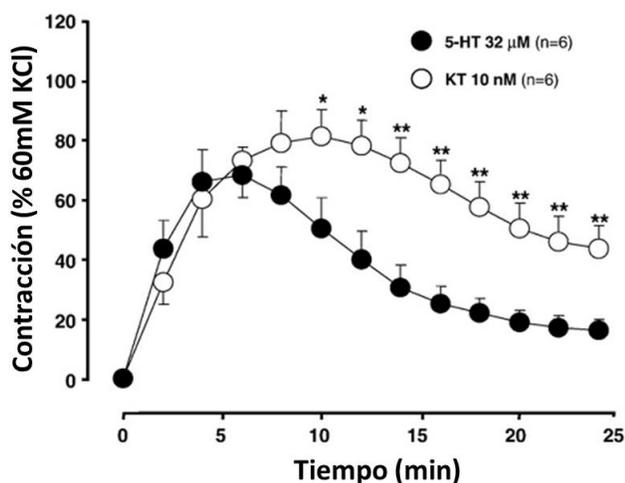


Figura 10. Decremento de la fase de relajación inducida por serotonina usando el antagonista Ketanserina (KT) para el receptor 5-HT_{2A} en anillos traqueales de cobayos (Campos-Bedolla, y col. 2008).

En éste trabajo se concluyó que el receptor 5-HT_{2A}, no sólo participa en la contracción del músculo liso de las vías aéreas, sino que además participa en la relajación de éste músculo. Y la respuesta de relajación depende de la activación del receptor 5-HT_{2A} y está mediada por la activación de la ATPasa Na⁺/K⁺.

En otro trabajo de nuestro grupo, publicamos que la serotonina es liberada activamente desde los pulmones durante un reto antigénico. Además, ésta serotonina está involucrada en la generación de broncoobstrucción en cobayos sensibilizados con ovoalbúmina. Para llegar estas conclusiones, dividimos éste trabajo en tres partes³⁵.

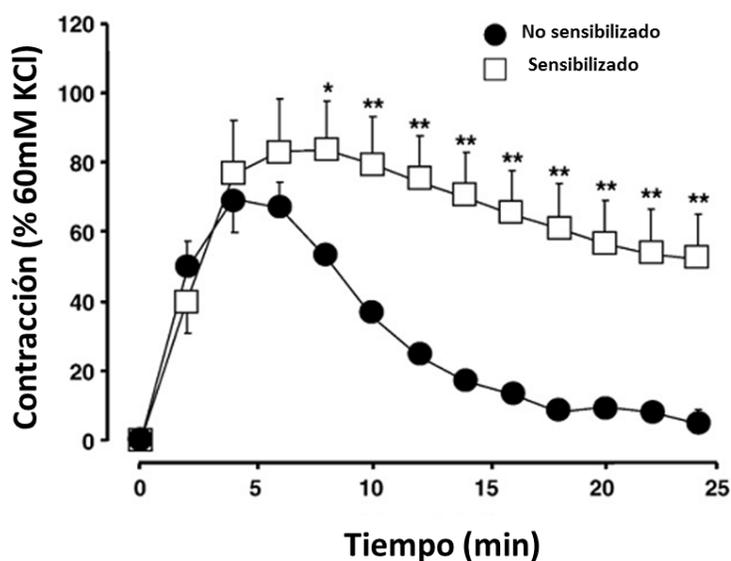


Figura 11. Efecto en la respuesta de serotonina en anillos traqueales de cobayos con modelo de asma. La fase de relajación fue notablemente disminuida en anillos traqueales de cobayos con modelo de asma en comparación con anillos traqueales de cobayos sanos. (Campos-Bedolla, y col. 2008)

En una parte de éste trabajo, evaluamos el efecto broncoobstructor de la serotonina en cobayos controles (sin sensibilizar a ovoalbúmina). A estos cobayos se les hizo curvas dosis-respuesta con dosis no acumulativas de serotonina (0.18-5.6 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Las curvas fueron hechas con un pletismógrafo para animales anestesiados y se midió la resistencia pulmonar (RL). Encontramos que la administración de dosis crecientes de serotonina produce una respuesta broncoobstructiva dosis-dependiente. Además, la RL basal aumentó aproximadamente 4 veces (Figura 12).

En la segunda parte de éste estudio, se determinó el papel de la serotonina en la broncoobstrucción en cobayos con modelo de asma. Estos cobayos fueron sometidos a un reto antigénico con 40µg/Kg de ovoalbúmina intravenosa. Además, se bloquearon los siete receptores de serotonina utilizando una combinación de dos fármacos, metiotepina (antagonista de 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₅, 5-HT₆ y 5-HT₇) y tropisetron (antagonista de 5-HT₃ y 5-HT₄).

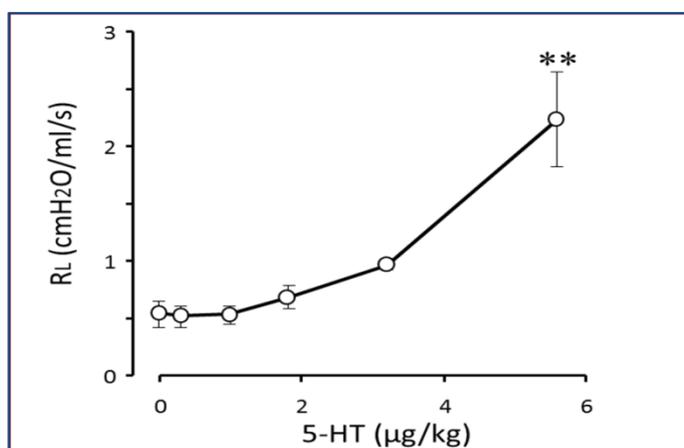


Figura 12. Efecto broncoobstructor de la serotonina en cobayos. Se administraron dosis crecientes de serotonina y midió su efecto en las vías aéreas. (Arreola, y col. 2013)

Ambos antagonistas se administraron por vía intravenosa, aproximadamente 10 minutos antes del reto antigénico. Entonces, encontramos que al bloquear los siete receptores de serotonina disminuyó considerablemente la broncoobstrucción (Figura 13).

Finalmente, la tercera parte del estudio, consistió en cuantificar los posibles cambios en las concentraciones sanguíneas de la serotonina durante del reto antigénico. Se tomaron muestras de sangre de cobayos antes, durante y después del reto antigénico a ovoalbúmina en cobayos sensibilizados. Encontramos que en el grupo que se midieron las concentraciones de serotonina en

la sangre durante el reto antigénico que provenía de los pulmones, tuvo una alta correlación con la máxima broncoobstrucción observada. Sugiriendo que la serotonina libre tiene una función en la generación de la broncoobstrucción (Figura 14).

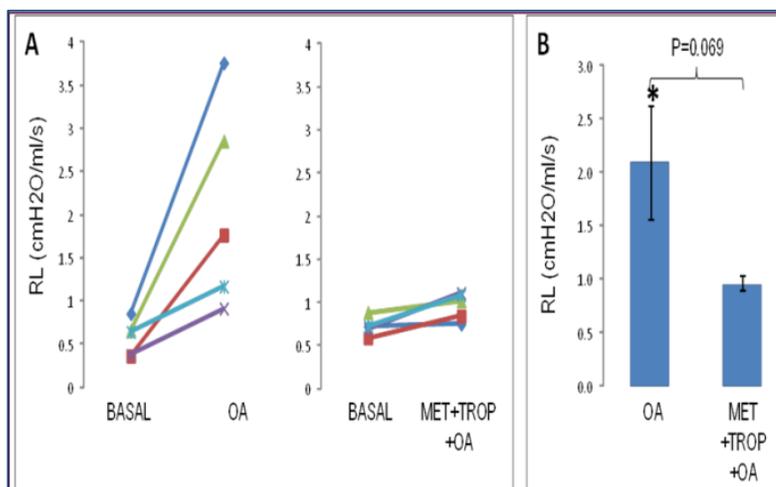


Figura 13. Efecto de los receptores de serotonina en la broncoobstrucción en cobayos. Se bloquearon los siete receptores de serotonina con una combinación de metiotepina + tropisetron y se midió el efecto del bloqueo en las vías aéreas. (Arreola, y col. 2013; datos no publicados).

Serotonina y asma: Hiperreactividad de las vías aéreas

La hiperreactividad es un proceso característico del asma. Sin embargo, aún no está comprendido en su totalidad cuáles son los factores que la generan. Por éste motivo en otro estudio publicado en el 2010³⁶, también por nuestro grupo de trabajo, nos enfocamos en estudiar el papel de la serotonina y sus receptores en la hiperreactividad de las vías aéreas.

Para poder evaluar lo anterior, utilizamos cobayos con modelo de asma alérgica a ovoalbúmina. Para medir la hiperreactividad, se realizaron dos curvas dosis-respuesta no acumulativas a acetilcolina, una curva antes y otra curva después del reto antigénico a

ovoalbúmina. Antes de administrar la segunda curva de acetilcolina se administró una mezcla de fármacos, Tropicetrón (antagonista de 5-HT₃ y 5-HT₄) y Metiotepina (antagonista de 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₅, 5-HT₆ y 5-HT₇). Las curvas fueron hechas con un pletismógrafo para animales anestesiados y se midió la resistencia pulmonar (RL). Se encontró que al bloquear todos los receptores de serotonina se pudo evitar la generación de hiperreactividad en cobayos con modelo de asma (Figura 15).

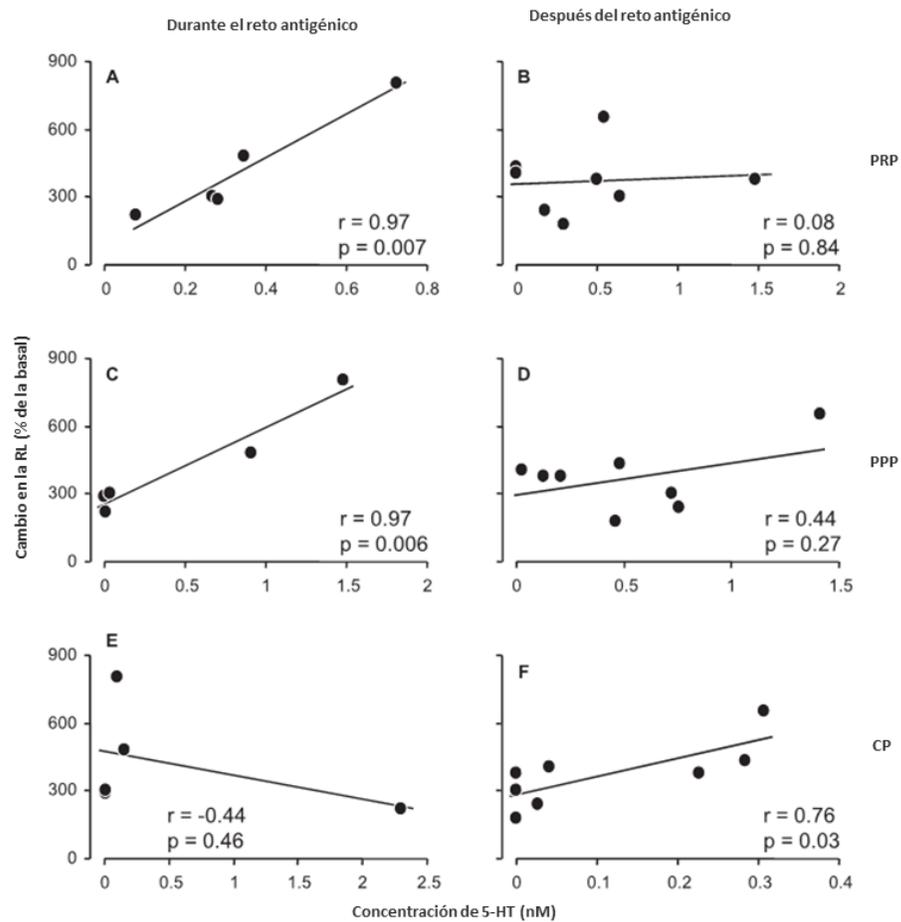


Figura 14. Relación entre las concentraciones de serotonina plasmáticas y la broncoobstrucción máxima. (Arreola, y col. 2013)

Entonces, al bloquear todos los receptores de serotonina en cobayos sometidos al modelo experimental de asma, se abolía la hiperreactividad. Pero no sabíamos con exactitud cuál o cuáles receptores de serotonina eran los que estaban mediando la hiperreactividad. Por lo tanto, utilizamos antagonistas específicos para los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT₄ y 5-HT₇ y así evaluar cuáles eran los receptores de serotonina que estaban involucrados en la generación de hiperreactividad (Figura 15). Encontramos que los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT₄ y 5-HT₇ son los responsables de generar hiperreactividad en cobayos con modelo de asma.

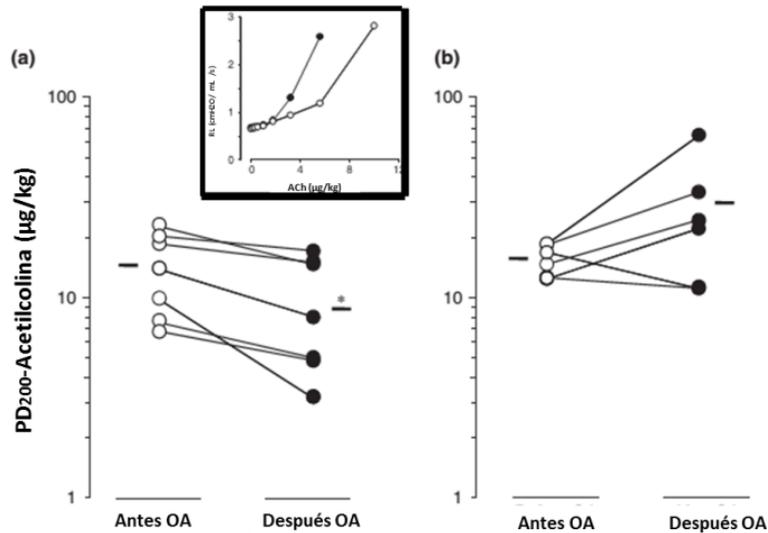


Figura 15. Hiperreactividad a acetilcolina después del reto antigénico. En el panel (a) el reto antigénico en cobayos disminuye la PD₂₀₀ (dosis de acetilcolina que causa el incremento del 200% del valor de la RL basal), y esto causa hiperreactividad. En el panel (b) una combinación de Metitepina (0.3 mg/kg) más Tropisetron (3mg/kg) completamente abolió la hiperreactividad inducida por reto antigénico. Los círculos abiertos son las curvas de acetilcolina antes del reto antigénico y los círculos cerrados son las curvas de acetilcolina después del reto antigénico. p<0.05. (Segura Medina, y col. 2010)

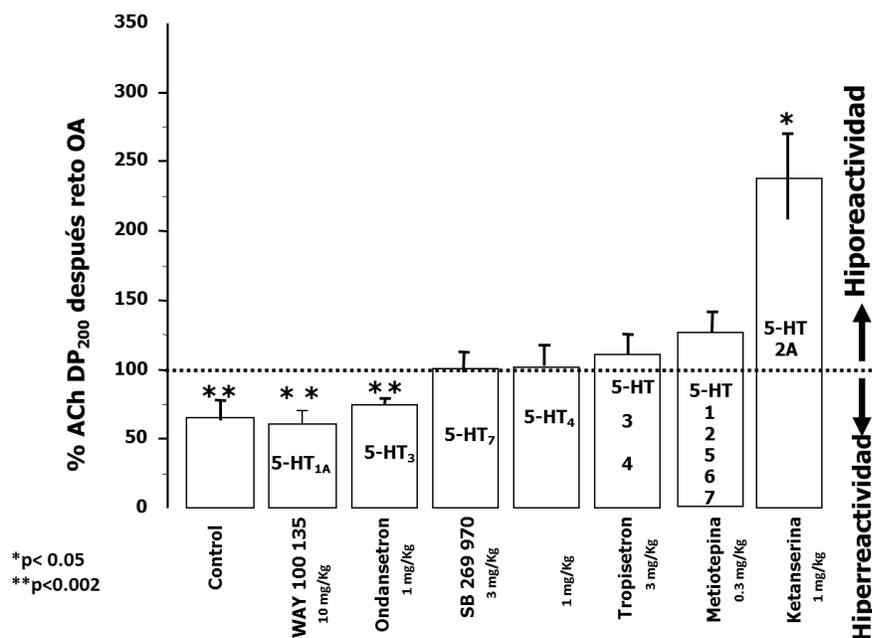


Figura 16. Receptores de serotonina que están involucrados en la generación de hiperreactividad. Se usaron antagonistas específicos para receptor de serotonina y de esta manera evaluar que receptor generaba o no hiperreactividad de las vías aéreas. (Segura Medina, y col. 2010)

En concordancia con lo anterior, el receptor 5-HT_{2A} en las vías aéreas se encarga de contraer y hasta relajar el músculo liso. Es ampliamente reconocido la participación del receptor 5-HT_{2A} en la contracción del músculo liso de las vías aéreas. No obstante, poco es conocida la actividad de los receptores 5-HT₄ y 5-HT₇. En este trabajo, describimos que los receptores 5-HT₄ y 5-HT₇ participan de manera indirecta en la hiperreactividad. Se realizaron estudios in vitro de estimulación eléctrica de campo y se evaluó la acción de los agonistas específicos Cisaprida (agonista 5-HT₄) y LP44 (agonista 5-HT₇) en tráqueas de cobayos controles. Así definimos que los receptores 5-HT₄ y 5-HT₇ se encuentran de manera presináptica en el músculo liso traqueal; ya que incrementan la respuesta de contracción colinérgica a la estimulación eléctrica (Figura 17).

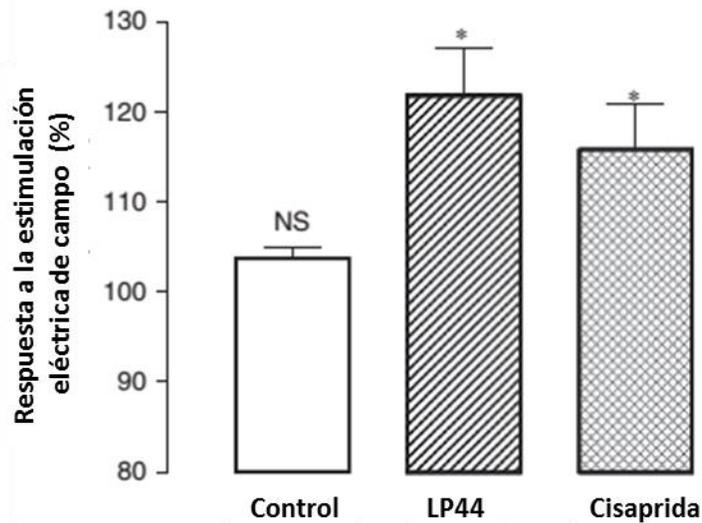


Figura 17. Efecto de LP44 (agonista del receptor 5-HT₇) y de Cisaprida (agonista del receptor 5-HT₄) en la contracción inducida por una estimulación eléctrica de campo en anillos traqueales de cobayos. (Segura Medina, y col. 2010)

También es este estudio evaluamos las concentraciones de serotonina en homogenados de pulmón en cobayos controles y en cobayos con modelo de asma. Encontramos que la serotonina aumenta nueve veces más en pulmones de cobayos con modelo de asma (Figura 18).

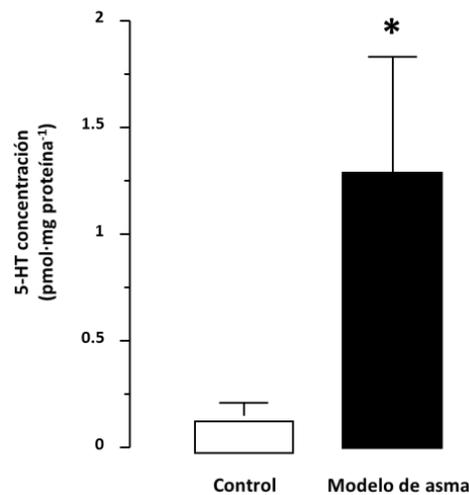


Figura 18. Concentración de serotonina en homogenados de parénquima pulmonar de cobayos sanos y cobayos con modelo de asma. (Segura Medina, y col. 2010)

Por consiguiente, encontramos la participación de las células neuroendócrinas pulmonares como reservorios de serotonina en las vías aéreas (Figura 19).

La conclusión sobre éste valioso trabajo se puede observar en la Figura 20. En cobayos no sensibilizados (Panel A), la acetilcolina intravenosa estimula a los receptores muscarínicos M3 lo que produce contracción del músculo liso traqueobronquial. La estimulación de receptores muscarínicos M2 en el músculo liso potencian la contracción mediante una reducción en la producción de cAMP. A nivel presináptico, la estimulación de los receptores M2 previene la subsecuente liberación endógena de acetilcolina de las terminales neuronales. La acetilcolina intravenosa puede también inducir la liberación de serotonina de las células neuroendócrinas pulmonares. Después del proceso de sensibilización (Panel B), probablemente ocurren dos cambios críticos. En primer lugar, el contenido de serotonina pulmonar proveniente de las células neuroendocrinas pulmonares incrementa, por lo tanto, su liberación inducida por la acetilcolina se ve aumentada. La serotonina produce contracción del músculo liso traqueobronquial por estimulación de los receptores 5-HT_{2A}. En segundo lugar, la llegada de los eosinófilos produce deterioro de los receptores presinápticos M2, dejando sin mecanismos inhibitorios que modulen la secreción de acetilcolina, por lo que predominan los mecanismos que promueven su liberación, como aquellos iniciados por receptores presinápticos 5-HT₄ y 5-HT₇. La activación de fibras aferentes por la serotonina induce reflejo vagal, favoreciendo la aún más la liberación de acetilcolina. El incremento en la liberación endógena de acetilcolina puede entonces potenciar los mecanismos contráctiles. Los eosinófilos pueden también causar deterioro de los receptores M2

en el músculo liso traqueobronquial, disminuyendo la respuesta contráctil a acetilcolina, por lo que la contracción se torna más dependiente de la estimulación de los receptores 5-HT_{2A}.

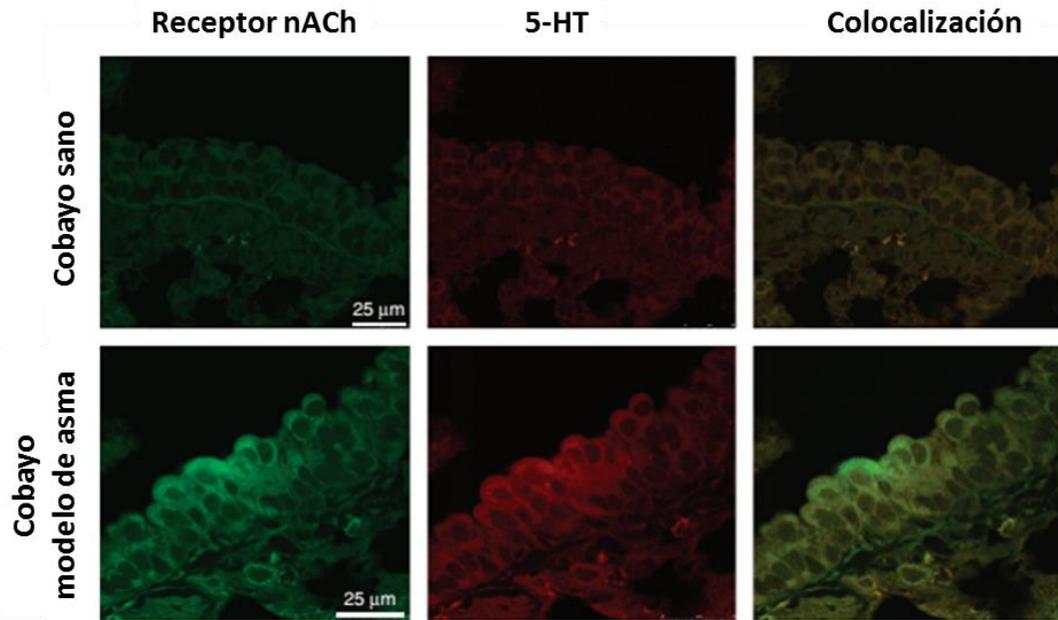


Figura 19. Microscopia confocal para los receptores nicotínicos $\alpha 7$ (Receptor nACh) y serotonina (5-HT) en el epitelio de las vías aéreas de cobayo. La sensibilización a ovoalbúmina aumenta considerablemente la inmunodetección del receptor nACh y la 5-HT, comparado con los tejidos de cobayos sanos. La colocalización de receptor nACh con a 5-HT se aprecia con el color amarillo. (Segura Medina, y col. 2010)

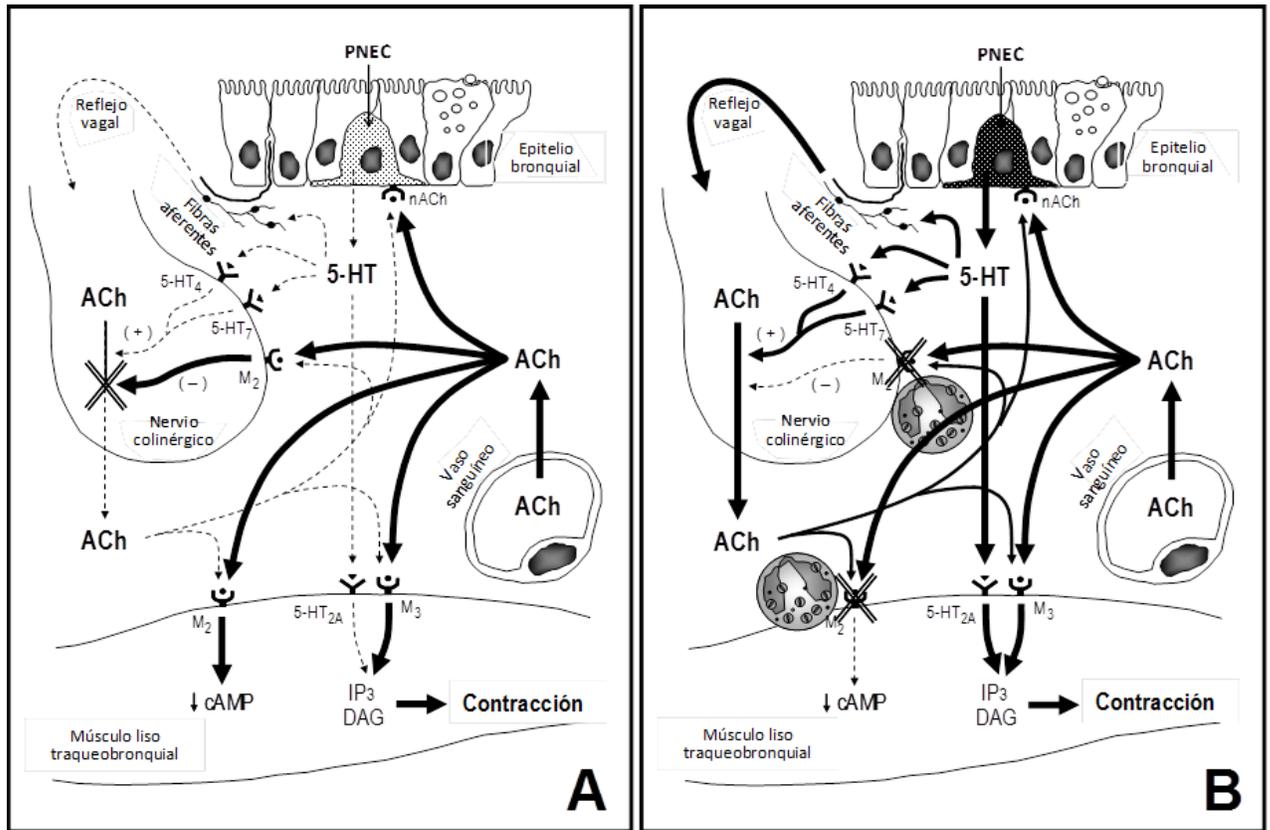


Figura 20. Eventos que probablemente ocurren durante el desarrollo de la hiperreactividad a acetilcolina inducida por el reto antigénico. ACh: acetilcolina, 5-HT: serotonina, nACh: receptor nicotínico, IP₃: inositol trifosfato, DAG: diacilglicerol, PNEC: células neuroendocrinas pulmonares. (Segura Medina, y col. 2010)

JUSTIFICACIÓN

El asma representa un serio problema de salud pública en México y en el mundo, por ser una de las enfermedades más frecuentes de atención hospitalaria. Aproximadamente, 300 millones de personas en el mundo padecen de ésta enfermedad; en México la incidencia del asma comprende del 5 al 12% de la población, siendo la población infantil la más afectada. La fisiopatología del asma es compleja, ya que participan diferentes procesos fisiológicos que involucran distintas células y moléculas, como la serotonina, cuyos mecanismos de acción en las vías aéreas aún se siguen investigando. Por lo que, nuestro interés fue determinar la importancia de la serotonina y sus receptores en el fenómeno de hiperreactividad. En el presente estudio evaluamos la expresión de los receptores serotoninérgicos en pulmón de cobayos sometidos al modelo experimental de asma alérgica.

HIPÓTESIS

Los receptores de serotonina expresados en el pulmón de cobayos sometidos a un modelo experimental de asma alérgica participan en la hiperreactividad de las vías aéreas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar a los receptores de serotonina involucrados en el desarrollo de hiperreactividad en cobayos con modelo de asma alérgica.

Objetivos particulares

1. Caracterizar farmacológicamente el papel de los receptores 5-HT_{1B/1D}, 5-HT_{5a} y 5-HT₆ sobre la hiperreactividad a la acetilcolina en cobayos con modelo de asma alérgica.
2. Determinar la expresión del mRNA de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ y 5-HT₇ de serotonina en pulmón de cobayo con modelo de asma alérgica mediante qRT-PCR.
3. Determinar la expresión de la proteína de los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT₄ y 5-HT₇ en músculo liso traqueal, epitelio traqueal y bronquial y en parénquima pulmonar mediante Western-Blot.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Usamos cobayos machos (450-500g) criados en condiciones convencionales en el bioterio (ciclos luz/oscuridad de 12/12 h, aire acondicionado filtrado, $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, humedad 50-70%, cama esterilizada) y alimentados *ad libitum* con pellets (Teklad Guinea Pig Diet 7006, Harlan Teklad, Madison, WI) y agua esterilizada. El protocolo para realizar éste trabajo fue aprobado por los Comités Científico y de Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (B17-12) y del Instituto Mexicano del Seguro Social (2010-785-033). Los experimentos se condujeron siguiendo los lineamientos de *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicadas por U. S. National Institutes of Health revisión 2011.

Procedimiento de sensibilización y reto antigénico

Los cobayos se sensibilizaron (día 0) con la administración intraperitoneal de 60 mg de ovoalbúmina (cat. A-5253; Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) y 1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ en 0.5 ml de solución salina (NaCl al 0.9%). Al día 8 (primer refuerzo antigénico) los animales se nebulizaron con $3\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de OA en solución salina durante 5 min usando un nebulizador ultrasónico (model WH-2000, Guangdong Yuehua Medical Instrument Factory Co., Ltd., Guangdong, China, diámetro de partícula 1–5 μm). En el día 15, se aplicó un segundo refuerzo antigénico a los cobayos con $0.5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de OA en solución salina durante 1 min (Figura 21).

En los días 21-25 del estudio, se administró a los cobayos el reto antigénico con un Pletismógrafo para animales anestesiados. El reto antigénico se hizo con la finalidad de hacer una primera medición de la reactividad de las vías aéreas a la acetilcolina, que fue seguida de un reto antigénico con un bolo único de ovoalbúmina ($400 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ i.v.), y para una segunda medición de la reactividad de las vías aéreas una hora después de haberse recuperado de la broncoconstricción aguda inducida por el reto antigénico.

Los cobayos que no respondieron adecuadamente al reto antigénico fueron descartados del estudio. Todas las soluciones usadas fueron preparadas el mismo día de su uso.

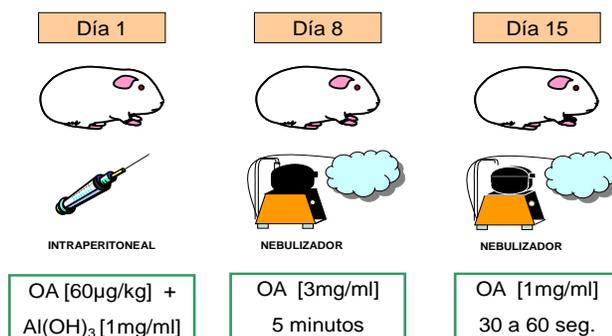


Figura 21. Método de sensibilización

Pletismografía para animales anestesiados

La resistencia pulmonar (RL) se midió a través del método isovolumétrico en una cámara pletismográfica cerrada (Buxo Electronics Inc., Troy, NY).

Los cobayos se anestesiaron con pentobarbital sódico (35 mg·Kg⁻¹ intraperitoneal), y la profundidad de la anestesia se mantuvo con administración periódica de dosis adicionales de pentobarbital (~9 mg·Kg⁻¹ intravenoso). Todos los animales recibieron bromuro de pancuronio (0.06 mg·Kg⁻¹ intravenoso) para evitar movimientos respiratorios espontáneos.

Después de canular la tráquea, cada animal fue ventilado mecánicamente (ventilador modelo 50-1700, Harvard Apparatus Ltd., Edenbridge, UK) con volumen corriente de 10 ml·Kg⁻¹ y a 48 respiraciones·min⁻¹. La vena yugular derecha se canuló para la administración de los fármacos. Una cánula llena de agua se colocó en el tercio medio del esófago para medir la presión intraesofágica, considerada como indicadora de la presión intrapleurales. Las presiones obtenidas de las cánulas esofágica y traqueal se registraron mediante un transductor de presión diferencial (SCXL004DN, SenSym ICT, Milpitas, CA). La presión dentro de la cámara pletismográfica se registró a través de otro transductor de presión diferencial. Esta última señal se convirtió en una señal de pseudoflujo mediante un software especial (Buxco Biosystem XA, version 1.0). Finalmente, la relación entre ambos parámetros calculó la RL a través de la fórmula $RL = \Delta P / \Delta V$, donde ΔP es la diferencia de presión y ΔV es la diferencia de flujo (Figura 22).

Modelo de la hiperreactividad de las vías aéreas

Después de una respuesta basal a solución salina (0.1 ml i.v.) se hicieron dos curvas dosis-respuesta a acetilcolina (1, 1.8, 3.2, 5.6, 10, 18, 32, 56 y 100 µg·kg⁻¹ intravenosa), una antes y otra después del reto antigénico. Para la construcción de estas curvas se consideró la respuesta máxima (es decir, el máximo incremento de RL) obtenida en los siguientes 3 min (la RL basal). La

curva se finalizaba cuando la respuesta a una dosis de acetilcolina alcanzaba 3 veces la RL basal. La hiperreactividad de las vías aéreas se expresó como la dosis provocativa 200% (PD₂₀₀), es decir, la dosis de acetilcolina requerida para obtener un 200% de incremento de la RL basal).

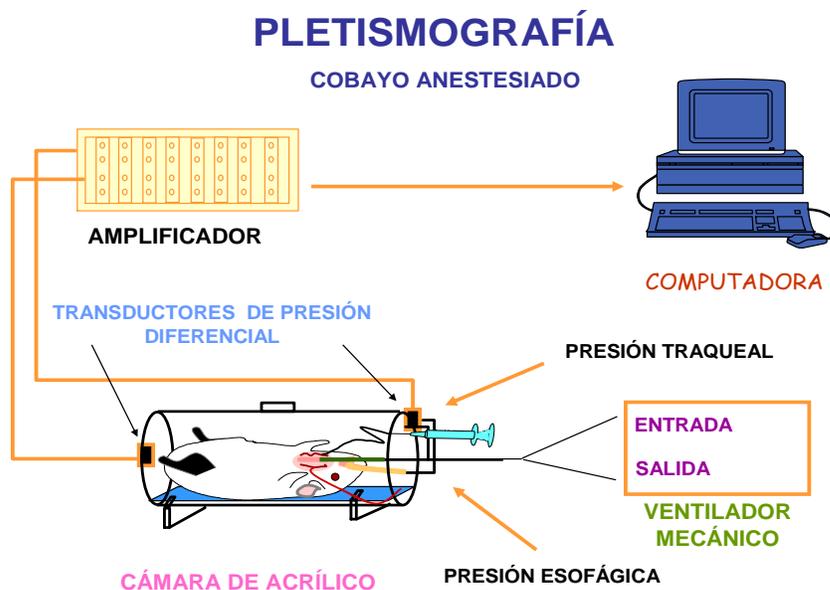


Figura 22. Sistema de pletismografía para animales anestesiados. Éste equipo permite evaluar la hiperreactividad inducida por el reto antigénico a ovoalbúmina in vivo.

Diez minutos antes de la segunda curva a acetilcolina se administraron por vía intravenosa antagonistas para receptores de serotonina o el vehículo (cuadro 3). Para asegurarse que el reto antigénico siempre producía hiperreactividad de las vías aéreas, se estudió un grupo control de 4-7 cobayos con modelo de asma sin la administración de los antagonistas, es decir, con solo la administración de vehículo. Corroboramos que los antagonistas para receptores de serotonina no causaran cambios de los valores basales de RL.

Cuadro 3. Antagonistas para receptores de serotonina usados en éste estudio

Receptor	Antagonista	Dosis
5-HT _{1B/1D}	GR 127935	0.3mg/Kg
5-ht _{5a}	SB 699551	1mg/Kg
5-HT ₆	SB 399885	1mg/Kg

Tratamiento de los tejidos usados para experimentos de qRT-PCR y Western-Blot

Los tejidos usados para los experimentos de qRT-PCR Y Western- blot tuvieron un tratamiento previo a realizarse los experimentos.

Para los experimentos de qRT-PCR, en el día de estudio los cobayos se anestesiaron profundamente con una inyección intraperitoneal de pentobarbital de sodio (35mg/kg). Para poder perfundir los pulmones de los cobayos, se les abrió el pecho y se canuló la arteria pulmonar a través del ventrículo derecho y se cortó el atrio izquierdo. Usando una bomba peristáltica, se pasó solución salina a los pulmones, a una baja presión con un flujo de ~18 ml/min, removiendo la sangre intravascular de los pulmones. Una vez que los pulmones estuvieran libres de sangre, se tomó el lóbulo derecho craneal e inmediatamente se puso en solución de RNAlater® (cat. AM7021; Ambion, Austin, Texas, USA). Y en menos de una hora se almacenaron los lóbulos de pulmón a -70°C hasta su análisis por qRT-PCR.

Por otra parte, la determinación del contenido protéico por Western-Blot se hizo en epitelio traqueal y bronquial, músculo liso traqueal y en parénquima pulmonar de cobayos controles y con modelo de asma.

La tráquea se cortó y se abrió por un corte longitudinal a través de los anillos cartilagosos. La tráquea se fijó con alfileres a una caja Petri con agar conteniendo solución de Krebs (concentración [mM]: NaCl 120, NaHCO₃ 25, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5 y glucosa 11) y burbujeado con oxígeno. Sobre estas condiciones, el epitelio traqueal fue obtenido levantando suavemente la membrana más superficial con unas pinzas quirúrgicas. Con el resto del tejido tráqueal, el músculo liso fue disecado después de quitar el tejido conectivo.

Con respecto al epitelio bronquial, el árbol bronquial fue disecado hasta la tercera y cuarta generación bronquial y se eliminó el tejido de parénquima pulmonar circundante.

Finalmente, un fragmento de parénquima pulmonar fue obtenido de lóbulo izquierdo diafragmático. Todos estos tejidos fueron almacenados separados en tubos criogénicos, e inmediatamente fueron congelados en nitrógeno líquido y después se almacenaron a -70°C hasta su análisis por Western-blot.

Cuando se hicieron las pruebas de Western-blot, nos percatamos que la cantidad de proteína para cada tejido a trabajar era escasa. Por lo tanto, cada Western-blot fue hecha con un pool de tejidos de 3 cobayos. En algunos animales, se tomó una muestra de cerebro para servir como control positivo para el receptor 5-HT₇.

PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

De las muestras de parénquima pulmonar se extrajo el RNA total usando TRIzol (Life Technologies, Grand Island, NY). La calidad del RNA se evaluó mediante resolución sobre geles de agarosa al 1%

desnaturalizada y la medición de la relación de absorbancia 260/280 nm. El DNA complementario (cDNA) fue sintetizado usando 1 µg de RNA total, 1 µg de DNasa y 1µl de buffer de DNasa (cat. EN0523; Fermentas, Waltham, MA, USA). El cDNA se transcribió de forma reversa usando la transcriptasa reversa de virus de leucemia murina Moloney de acuerdo a las instrucciones del fabricante (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor, cat. 4374966; Applied Biosystems, Carsbad, CA, USA). La amplificación qPCR fue hecha por el equipo i-Cycler iQ Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA). La qPCR se realizó con una mezcla de trabajo de cDNA en un volumen de reacción de 15 µl conteniendo 4 µl cDNA, 2 mM dNTP (cat. 10297-018; Invitrogen, Carsbad, CA, USA), 10 µM de primers específicos de 5' a 3', 50 mM MgCl₂, 10× PCR Buffer, 1.5 U Taq DNA polymerase (cat. 10966-018; Invitrogen), 500 nM fluoresceína (cat. 11636154910; Roche, Indianapolis, IN, USA) y tinción SYBR Green I Dye 1× (cat. 4707516001, Roche). Los pares de primers de los receptores de serotonina fueron diseñados en Profinder (<http://qpcr.profinder.com/organism.jsp>) (Cuadro 4).

Se utilizó como gen control interno a la 18s rRNA (cat.4352930E; Applied Biosystems). Todos los qPCR se hicieron por triplicado y los resultados se normalizaron transformando los valores resultantes a logaritmos (log). La expresión relativa de los receptores de serotonina fue comparada con la expresión de 18s rRNA en los mismos tejidos y esto fue calculado con la fórmula $2^{-\Delta CT}$. Además, la expresión relativa de los receptores de serotonina en tejidos de cobayos con modelo de asma fue comparada con los tejidos de cobayos controles usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Cuadro 4. Secuencia de primers para receptores de serotonina usados en éste estudio

Receptor	Primer sentido	Primer antisentido
5-HT _{1A}	5'CACTCTGTTGGGTGCCATAA'3	5'TGACGGGGTTTAGCAGAGAG'3
5-HT _{2A}	5'CTGCAGGATGATTCCAAGGT'3	5'AAATGCCACGAAAGAACCAA'3
5-HT ₃	5'CTACGTGGTCATCCGCCGGC'3	5'CCGGGGGCAGGTAGAAGCCC'3
5-HT ₄	5'AATAAGATGACCCCTCTGCGTA'3	5'CATGGGGATAACCCAGCA'3
5-ht _{5a}	5'CGCATCCAATGTAATGATCG'3	5'GGGGCCAGAGAGATGACAG'3
5-HT ₆	5'CTGCCCTTCGTCCTTG'3	5'TGCAGTAAGTGAAGCAGATGG'3
5-HT ₇	5'CACAGCGGTGGCATTTTAC'3	5'GCAGCCTTGTAATCCGGTA'3

Pletismografía barométrica

En el día 15 del modelo de asma, los cobayos se pusieron en una cámara barométrica para animales de libre movimiento. A esta cámara se le conecta un nebulizador y a su vez la cámara se conecta al equipo de pletismografía. Las bases de la pletismografía barométrica han sido extensamente descritas en los trabajos de Drorbaugh 1955 y Hamelmann 1997^{38, 39}.

En esta técnica, el equipo registra varios parámetros respiratorios de una manera no invasiva. A partir de estos parámetros, se calcula un índice sin unidades conocido como aumento en la pausa (Enhanced Pause, Penh); el cual ha sido altamente aceptado como una medida de resistencia de las vías aéreas⁴⁰. Dos periodos de 5 minutos de mediciones de Penh fueron

registrados, uno en condiciones basales y el segundo, 1 minuto después de la inhalación de ovoalbúmina.

Basado en nuestra experiencia, en el día 15 del modelo de asma con reto a ovoalbúmina el Penh tiende a aumentar de 2 a 6 veces con respecto al Penh en condiciones basales (valores de 0.22 a 0.32). Este incremento en el Penh se asocia con el grado de la dificultad respiratoria que experimentan los cobayos (disociación torácico-abdominal). La respuesta de las vías aéreas (Δ Penh= el valor de Penh después del reto antigénico menos el Penh basal) fue considerado como un indicador del grado de sensibilización alérgica.

El equipo de pletismografía calcula el Penh por cada respiración y lo hace promediando el Penh de todas las respiraciones cada 15 segundos y el promedio se calcula con estos valores durante 5 minutos. Todos los animales fueron estudiados para la expresión de los receptores de serotonina en los días 21-24.

Western-blot

Se hizo un pool de tejidos de tres cobayos de músculo liso traqueal (~12mg), epitelio traqueal (~6mg), epitelio bronquial (~18mg) y parénquima bronquial (~30mg).

Los tejidos se pusieron de manera separada cada uno en 500 μ l de solución de lisis que contenía: 50 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 120 mM NaCl, 0.5% Igepal®, 1 mM Na_3VO_4 , 5 mM NaF, 0.5% desoxicolato de sodio, 10 mg fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y coctel de inhibidor de proteasas (Set III, cat. 539134; Calbiochem, La Jolla, CA, USA), 1:200 v/v pH

7.4. Los tejidos fueron homogenados (Polytron PT 1200 E, Kinematica, Luzern, Switzerland) y después centrifugados a 4°C a 3000 rpm durante 5 minutos.

El contenido total de proteína fue determinado con el sobrenadante usando un kit comercial (DC Protein Assay, cat. 500-0116; Bio-Rad), 40 µg de éste sobrenadante fue cargado en diferentes carriles en un gel de SDS-poliacrilamida al 10% y se sometió a electroforesis en condiciones reductoras. Después, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y se bloqueó con leche en polvo sin grasa disuelta en TBS-Tween (Tween 20, 0.1%) durante una hora a temperatura ambiente.

Las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal de conejo contra el receptor 5-HT_{2A} (cat. ab16028; Abcam, Cambridge, MA, USA) 1:200 v/v, el receptor 5-HT₄ (cat. ab87337; Abcam) 2 µg/ml y para el receptor 5-HT₇ (cat. ab13898; Abcam) 1:200 v/v. Finalmente, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario de IgG de cabra contra conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (cat. 12-348; Millipore, CA, USA) 1:1000 v/v, durante 1 hora a 37°C.

Los inmunoblots se hicieron empleando un potenciador del reactivo de quimioluminiscencia (Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, cat. 34096; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Los inmunoblots de los receptores de serotonina fueron analizados por densitometría (Molecular Imaging ChemiDoc XRS; Bio-Rad). Se utilizó a la α -actina como control de carga y se usó un anticuerpo monoclonal de ratón para la α -actina (cat. A5228; Sigma–Aldrich) 1:1000 v/v. Estas membranas después fueron incubadas con un anticuerpo secundario de IgG de borrego contra

ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (cat. NA9310 V; Amersham, Buckinghamshire, UK) 1:2000 v/v.

Para determinar que los anticuerpos usados fueran específicos para los receptores de serotonina se utilizaron controles negativos. Se usaron los péptidos inhibidores para cada receptor de serotonina: 5-HT_{2A} (cat. ab161959; Abcam) and 5-HT₄ (cat. ab102731; Abcam) para saturar el anticuerpo primario (2 µg péptido/1 µg anticuerpo). El péptido inhibidor para el receptor 5-HT₇ no se encuentra disponible a la venta, así que se utilizó para éste receptor como control positivo tejido de cerebro de cobayo.

Análisis estadístico

En los experimentos *in vivo*, para cada curva dosis-respuesta a acetilcolina intravenosa se calculó la PD₂₀₀ mediante extrapolación en la línea de regresión (CurveExpert v1.3, Daniel G. Hyams, Hixson, TN). Los cambios de la PD₂₀₀ antes y después del reto antigénico se evaluaron a través de la prueba *t* de Student para datos pareados. Datos en el texto y Figuras corresponden al promedio ± error estándar.

Las diferencias entre los cobayos controles y los cobayos con modelo de asma en los experimentos de qRT-PCR y de Western-blot fueron analizados con *t* de Student para datos no pareados. Los datos en el texto y las ilustraciones corresponden a promedio ± error estándar. La significancia estadística se fijó en $p < 0.05$ a dos colas.

RESULTADOS

Caracterización Farmacológica

En la publicación de Segura 2010, analizamos la participación de algunos receptores de serotonina en la generación de hiperreactividad en cobayos con modelo de asma.

Se estudió sí los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT₄ y 5-HT₇ estaban involucrados en la generación de hiperreactividad en cobayos con modelo de asma. Pero, como se mencionó en la sección de antecedentes, la serotonina tiene aproximadamente 15 receptores.

Para extender el estudio de Segura 2010, evaluamos el papel de los receptores 5-HT_{1B/1D}, 5-HT_{5a} y 5-HT₆ sobre la hiperreactividad a la acetilcolina en cobayos con modelo de asma alérgica. Para medir la hiperreactividad bronquial, los cobayos recibieron dosis no acumulativas de acetilcolina. Se realizaron dos curvas a acetilcolina, una curva antes y otra curva después del reto antigénico. Antes de administrar la segunda curva de acetilcolina se administró un antiserotoninérgico selectivo. Las curvas fueron hechas con el equipo de pletismografía para animales anestesiados y se midió la resistencia pulmonar (RL).

Al bloquear al receptor 5-HT_{1B/1D} genera hiperreactividad en cobayos con modelo de asma

En este estudio encontramos que al bloquear a los receptores 5-HT_{1B/1D} con el antagonista selectivo GR 127935 se observó que se *evita* la hiperreactividad a la acetilcolina en cobayos con modelo de asma (Figura 23).

El promedio de los valores de la primera curva de acetilcolina en cobayos controles fue de $13.29 \pm 1.9 \mu\text{g}/\text{kg}$ y de la segunda curva $3.99 \pm 1.8 \mu\text{g}/\text{kg}$, $p < 0.02$. Con lo anterior se observa que necesita menos concentración de acetilcolina en la segunda curva con respecto a la primera; por lo tanto, se desarrolló hiperreactividad. Por el contrario, en los cobayos sometidos al modelo experimental de asma se necesitó casi la misma concentración de acetilcolina en la segunda curva en comparación con la primera curva a acetilcolina para llegar a la misma respuesta después de administrar el antagonista del receptor 5-HT_{1B/1D} (valores de la primera curva $12.76 \pm 2.24 \mu\text{g}/\text{kg}$ y valores de la segunda curva $8.25 \pm 3.4 \mu\text{g}/\text{kg}$, $p < 0.18$).

En consistencia con lo anterior, sugerimos que la activación de este receptor al activarlo por la serotonina endógena podría generar hiperreactividad, ya que al bloquearlo inhibe éste fenómeno.

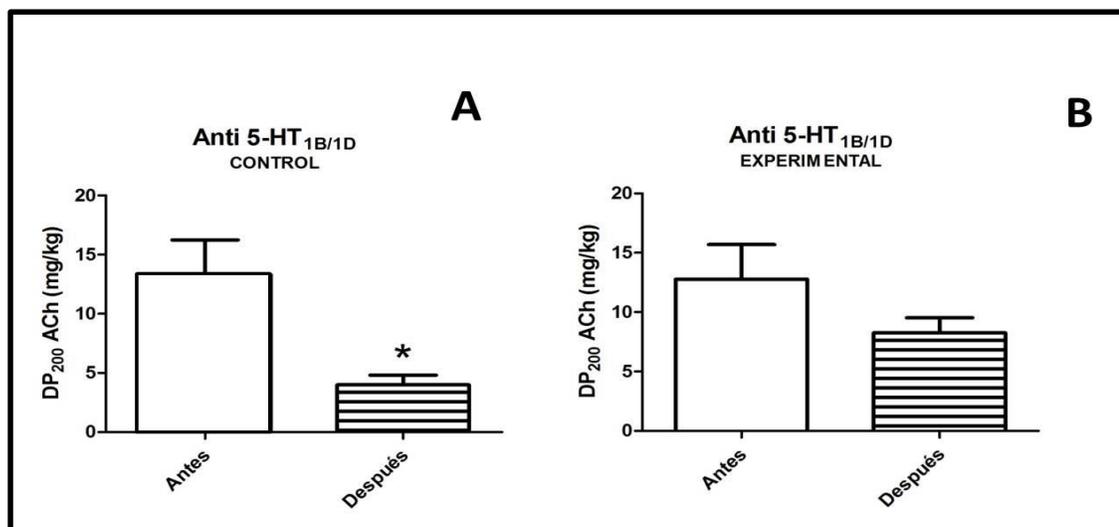


Figura 23. Receptores 5-HT_{1B/1D} de serotonina está involucrado en la generación de hiperreactividad. En el panel A (control), cobayos sometidos al modelo experimental de asma sin la administración del antagonista GR 127935, generaron hiperreactividad (n=5). En el panel B (experimental), los cobayos sometidos al modelo experimental de asma con la acción del antagonista GR 127935 (0.3 mg/kg) que evitó la hiperreactividad (n=6). Las barras corresponden al promedio y las líneas verticales con el error estándar. Las barras color blanco son la primera curva de acetilcolina antes del reto antigénico. Las barras rayadas son la segunda curva de acetilcolina después del reto antigénico. *t* de Student para datos pareados y el **p*<0.02.

El receptor 5-ht_{5a} no está involucrado en la hiperreactividad en cobayos con modelo de asma

Al bloquear a los receptores 5-ht_{5a} con el antagonista selectivo SB 699551 se observó que se generó hiperreactividad a la acetilcolina en cobayos sometidos al modelo experimental de asma (Figura 24).

El promedio de los valores de la DP₂₀₀ a acetilcolina en la primera curva en cobayos controles fue de $12.98 \pm 1.7 \mu\text{g/kg}$ y mientras que en la segunda curva $3.45 \pm 0.8 \mu\text{g/kg}$, *p*<0.04. Con lo anterior se observa que se necesita menos concentración de acetilcolina en la segunda curva con respecto a la primera para llegar a la misma respuesta; por lo tanto, se desarrolló hiperreactividad. En los cobayos sometidos al modelo experimental de asma se necesitó menos concentración de acetilcolina en la segunda curva en comparación con la primera curva a

acetilcolina para llegar a la misma respuesta después de administrar el antagonista del receptor 5-ht_{5a} (valores de la primera curva $6.11 \pm 1.8 \mu\text{g}/\text{kg}$ y valores de la segunda curva $2.8 \pm 1.1 \mu\text{g}/\text{kg}$, $p < 0.04$).

El resultado anterior, sugiere que cuando la serotonina endógena se une a este receptor no está relacionado con la génesis de la hiperreactividad; ya que su bloqueo farmacológico no previene la hiperreactividad inducida.

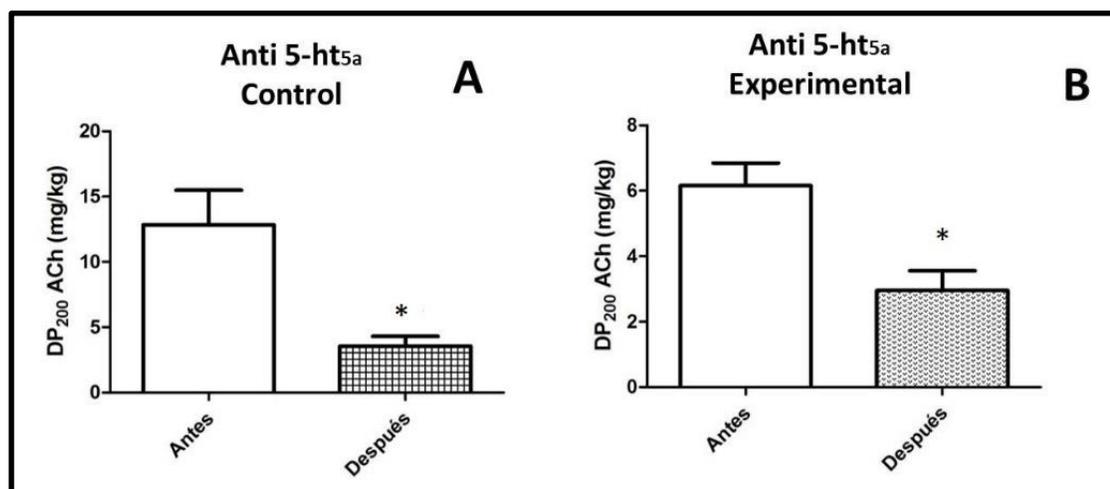


Figura 24. Receptores 5-ht_{5a} de serotonina no pueden evitar la generación de hiperreactividad. En el panel A (control), cobayos sometidos al modelo experimental de asma sin la administración del antagonista SB 699551 (1 mg/kg), generaron hiperreactividad (n=4). En el panel B (experimental), los cobayos sometidos al modelo experimental de asma con la acción del antagonista SB 699551 que generó la hiperreactividad (n=5). Las barras corresponden al promedio y las líneas verticales con el error estándar. Las barras color blanco son la primera curva de acetilcolina antes del reto antigénico. Las barras rayadas son la segunda curva de acetilcolina después del reto antigénico. *t* de Student para datos pareados; * $p < 0.04$.

El receptor 5-HT₆ tampoco evita la hiperreactividad en cobayos con modelo de asma

Al bloquear a los receptores 5-HT₆ con el antagonista selectivo SB 399885 se observó que generó hiperreactividad a la acetilcolina en cobayos sometidos al modelo experimental de asma (Figura 25).

El promedio de los valores de la primera curva de acetilcolina en cobayos controles fue de $10.98 \pm 2.6 \mu\text{g}/\text{kg}$ y de la segunda curva $3.4 \pm 2.2 \mu\text{g}/\text{kg}$, $p < 0.04$. Con lo anterior se observa que se necesita menos concentración de acetilcolina en la segunda curva con respecto a la primera para llegar a la misma respuesta; por lo tanto, se desarrolló hiperreactividad. Por otro lado, en los cobayos sometidos al modelo experimental de asma (experimentales) también se necesitó menos concentración de acetilcolina en la segunda curva en comparación con la primera curva a acetilcolina para llegar a la misma respuesta después de administrar el antagonista del receptor 5-HT₆ (valores de la primera curva $8.9 \pm 2.4 \mu\text{g}/\text{kg}$ y valores de la segunda curva $2.8 \pm 1.7 \mu\text{g}/\text{kg}$, $p < 0.02$).

Así, nuestros resultados sugieren que la activación del receptor 5-HT₆ al activarlo no participa en la generación de hiperreactividad; ya que su bloqueo previene la hiperreactividad inducida.

Caracterización farmacológica completa de los receptores de serotonina en el desarrollo de hiperreactividad en cobayos con modelo de asma

Al estudiar si los receptores 5-HT_{1B/1D}, 5-HT_{5a} y 5-HT₆ participan en la generación de hiperreactividad en cobayos con modelo de asma, completamos el objetivo de la caracterización farmacológica.

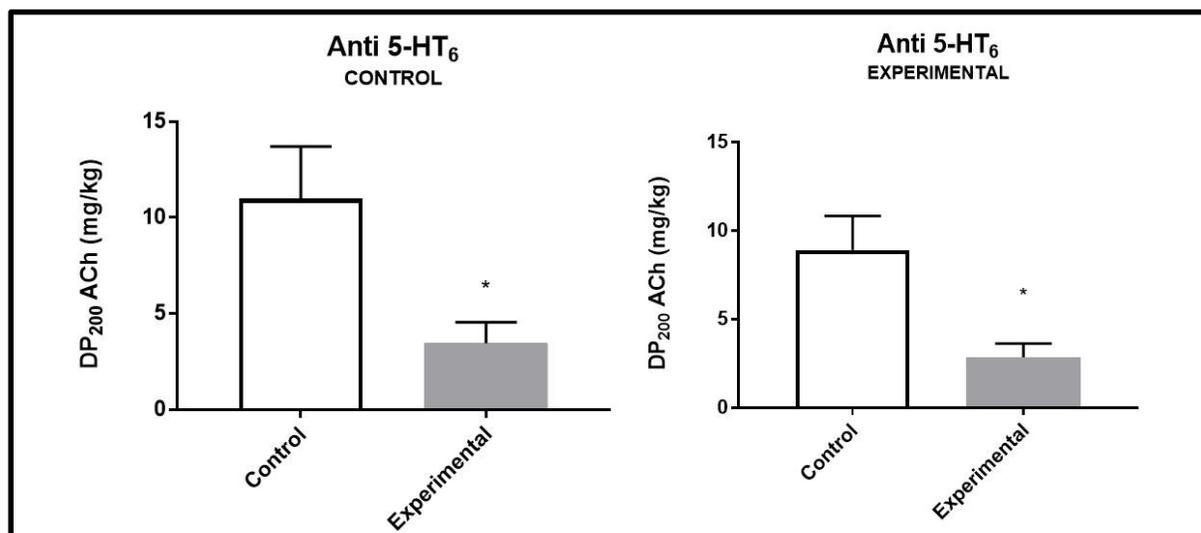


Figura 25. Receptores 5-HT₆ de serotonina no pueden evitar la generación de hiperreactividad. En el panel A (control), cobayos sometidos al modelo experimental de asma con la administración del antagonista SB 399885 (1 mg/kg), generaron hiperreactividad (n=4, *p<0.04). En el panel B (experimental), los cobayos sometidos al modelo experimental de asma con la acción del antagonista SB 699551 que generó la hiperreactividad (n=5, *p<0.02). Las barras corresponden al promedio y las líneas verticales con el error estándar. Las barras color blanco son la primera curva de acetilcolina antes del reto antigénico. Las barras rayadas son la segunda curva de acetilcolina después del reto antigénico. t de Student para datos pareados.

La Figura 26 es una modificación de ésta Figura del artículo de Segura y colaboradores del 2010. En éste artículo solo se estudiaron a los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT₄ y 5-HT₇ en la generación de hiperreactividad en cobayos con modelo de asma. Ahora, con éste estudio extendemos el hallazgo de Segura y cols³⁶; ya que evaluamos la participación de los receptores 5-HT_{1B/1D}, 5-HT_{5a} y 5-HT₆ y su posible participación en la generación de hiperreactividad en cobayos con modelo de asma.

Encontramos que los receptores 5-HT_{1B/1D} y no los 5-HT_{5a} y 5-HT₆ están involucrados en la generación de hiperreactividad en cobayos sometidos al modelo experimental de asma.

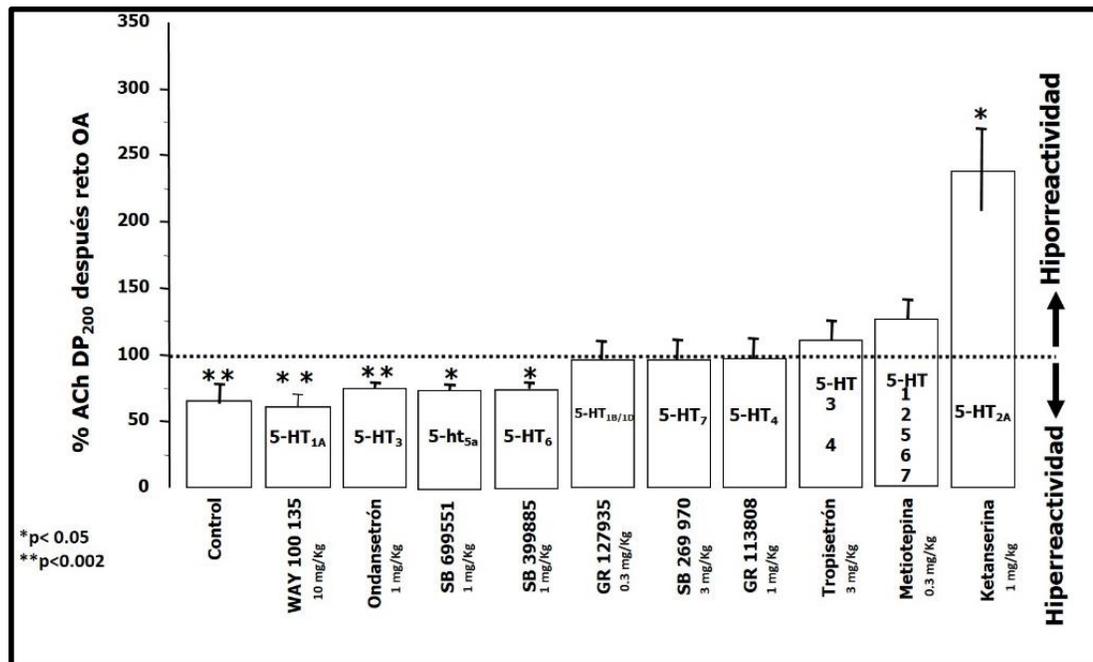


Figura 26. Efecto de diferentes antagonistas para los receptores de serotonina en la hiperreactividad en cobayos sometidos al modelo experimental de asma. Las barras muestran el cambio por el reto antigénico en la dosis provocativa 200 (DP₂₀₀) a la acetilcolina (ACh); éste cambio es expresado como el porcentaje de la DP₂₀₀ antes del reto antigénico. Cada grupo estuvo compuesto por n=4-8 cobayos, excepto el grupo control que es un pool de datos, n=38. La significancia estadística para cada grupo se obtuvo comparando el porcentaje de cambio de los valores de DP₂₀₀ después del reto antigénico con sus respectivos valores antes del reto antigénico usando *t* de Student para datos pareados. Las barras corresponden al promedio y las líneas verticales al error estándar (Modificado de Segura y cols. 2010).

Caracterización Molecular

En la caracterización farmacológica comprobamos que la mayoría de los receptores de serotonina están activándose en las vías aéreas. Como se explicó en el apartado de antecedentes, hay una estrecha relación entre la serotonina y el asma; pero no hay información de cómo es la expresión del mRNA de los receptores de serotonina en el asma.

Por esto, decidimos investigar en homogenados de pulmón la expresión del mRNA de los receptores de serotonina. Se usaron cobayos controles y cobayos con modelo de asma, y con la técnica de qRT-PCR se cuantificó el mRNA de los receptores de serotonina. Además, a los cobayos con modelo de asma, en el día 15 del modelo de sensibilización se registró el valor de Penh. Esto para hacer una correlación entre el valor de Penh (grado de broncoobstrucción) y la expresión relativa del mRNA para cada receptor de serotonina.

El mRNA de los receptores de serotonina se expresa en las vías aéreas

El mRNA de los receptores de serotonina se expresa en las vías aéreas de cobayos. De tal manera que, los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5a}, 5-HT₆ y 5-HT₇ se expresan constitutivamente en las vías aéreas de cobayos. En la Figura 27, se puede observar que en cobayos sin modelo de asma (controles) se expresan los siete receptores de serotonina que evaluamos en éste estudio. El orden completo de la expresión relativa del mRNA fue 5-HT_{2A} > 5-HT₄ > 5-HT₆ ≥ 5-HT₇ > 5-HT_{1A} = 5-HT₃.

La expresión del mRNA de los receptores 5-HT_{1A} depende del grado de broncoobstrucción en cobayos sometidos al modelo experimental de asma

Al medir la expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT_{1A} en homogenados de pulmón de cobayos sometidos al modelo experimental de asma se encontró que el proceso de sensibilización no modifica la expresión de éste receptor. Se observa en la figura 28, una tendencia a aumentar en el mRNA de receptor en cobayos sometidos al modelo experimental de asma al compararlo con

cobayos controles. Esta tendencia en aumento es de 1.679 veces más de mRNA en cobayos sometidos al modelo experimental de asma que en cobayos control.

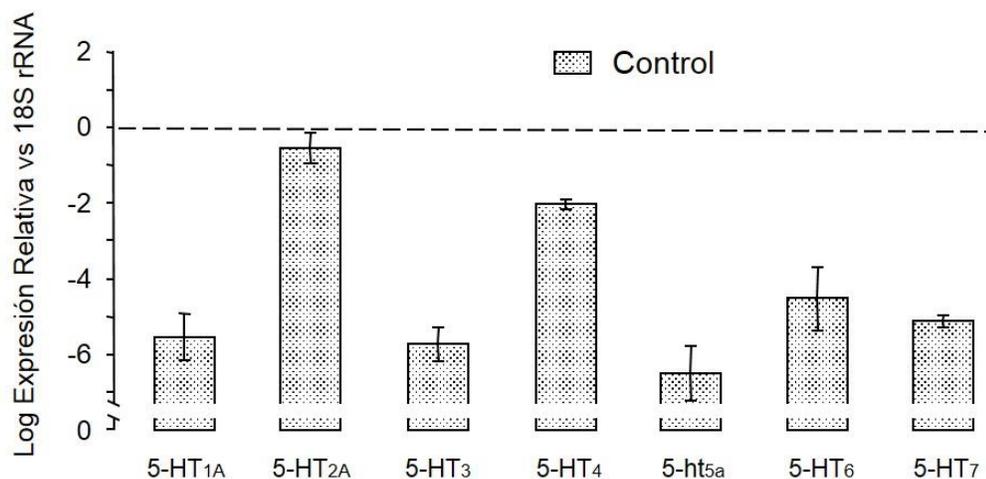


Figura 27. Expresión relativa del mRNA de los receptores de serotonina pulmón de cobayos control. La expresión relativa del mRNA de los receptores de serotonina en pulmón de cobayos control. Se normalizó con el gen constitutivo (RNA ribosomal 18S) y los datos se calcularon con el método $2^{-\Delta CT}$ (promedio geométrico \pm error estándar). La línea punteada indica el nivel basal de expresión del gen constitutivo (RNA ribosomal 18S).

Por otro lado, al correlacionar el valor de Penh de los cobayos sometidos al modelo experimental de asma con la expresión relativa de mRNA de los receptores 5-HT_{1A} se encontró que existe una correlación negativa. Esto es, entre más grave sea el episodio de broncoobstrucción menos mRNA hay del receptor 5-HT_{1A} en pulmón de cobayos con modelo de asma.

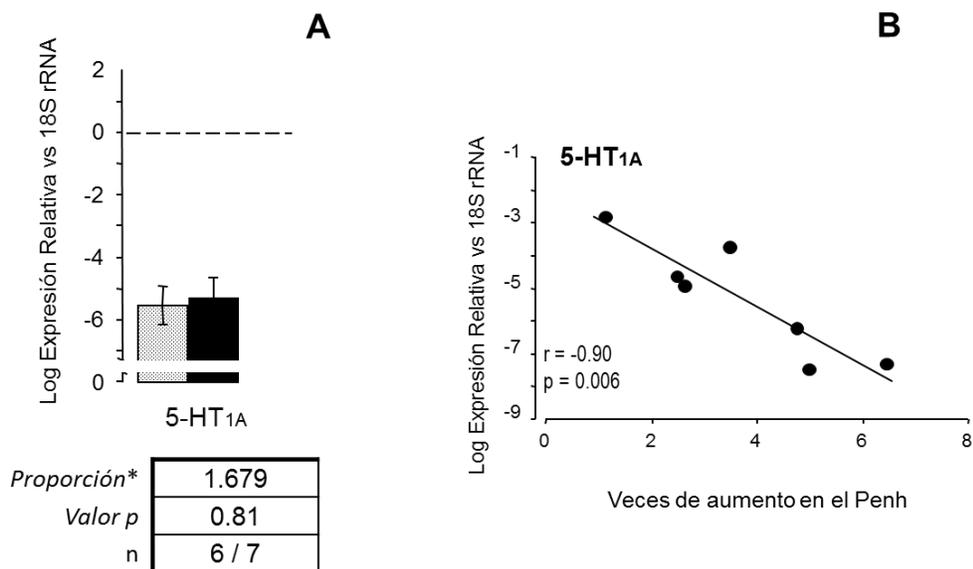


Figura 28. Expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT_{1A} en homogenados de pulmón de cobayos control y cobayos sometidos al modelo experimental de asma y su relación con el Penh. En el panel A; se muestra la expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT_{1A} en pulmón de cobayos control (barra gris) y cobayos sometidos al modelo experimental de asma (barra negra). Se normalizó con el gen constitutivo (RNA ribosomal 18S) y los datos se calcularon con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (promedio geométrico \pm error estándar). La tabla muestra la expresión normalizada del mRNA del receptor 5-HT_{1A} (proporción modelo de asma/ control) que se calculó con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. El número de animales utilizados se puso al final de la tabla (n). La línea punteada indica el nivel basal de expresión del gen constitutivo (RNA ribosomal 18S). En el panel B, relación entre la intensidad de la respuesta al reto antigénico en el día 15 de sensibilización y la expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT_{1A} en pulmón de cobayo. La respuesta de las vías aéreas se desarrolló después de inhalar el reto antigénico que fue evaluado por el incremento en el índice de pausa (Penh) con pletismografía barométrica.

La expresión del mRNA de los receptores 5-HT_{2A} de serotonina disminuye con el proceso de sensibilización

La expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT_{2A} en cobayos sometidos al modelo experimental de asma disminuye su expresión ($p < 0.04$) con respecto a la expresión relativa medida en cobayos control, siendo 0.145 veces menor (Figura 29).

Por otra parte, al correlacionar el Penh con la expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT_{2A} encontramos que no existe una relación entre el grado de broncoobstrucción y la cantidad del mRNA del receptor 5-HT_{2A} en pulmón de cobayos sometidos al modelo experimental de asma.

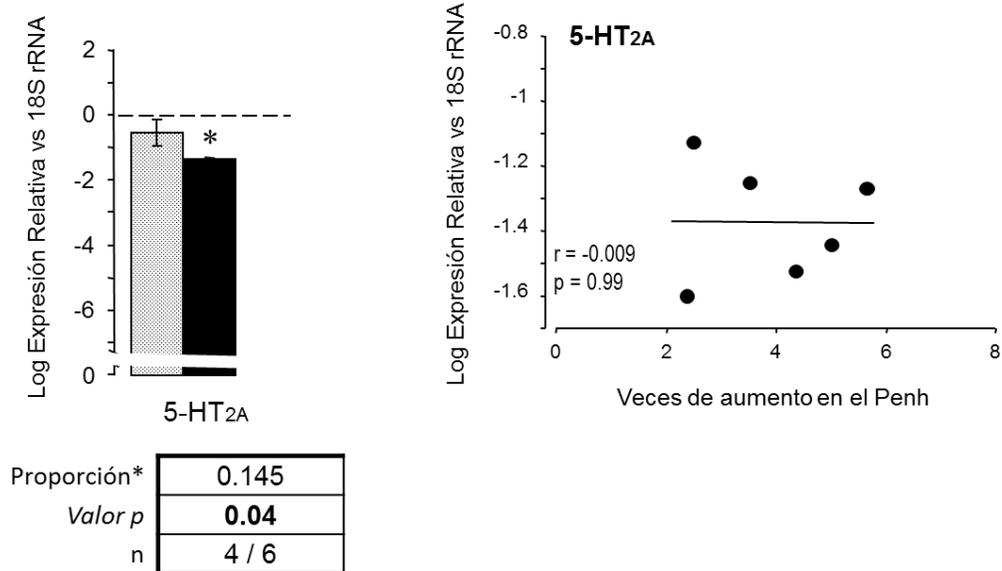


Figura 29. Expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT_{2A} en homogenados de pulmón de cobayos sanos y cobayos sometidos al modelo experimental de asma y su relación con el Penh. En el panel A; se muestra la expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT_{2A} en pulmón de cobayos control (barra gris) y cobayos sometidos al modelo experimental de asma (barra negra). Se normalizó con el gen constitutivo (RNA ribosomal 18S) y los datos se calcularon con el método 2^{-ΔCT} (promedio geométrico ± error estándar). La tabla muestra la expresión normalizada del mRNA del receptor 5-HT_{2A} (proporción modelo de asma/ control) que se calculó con el método 2^{-ΔCT}. El número de animales utilizados se puso al final de la tabla (n). La línea punteada indica el nivel basal de expresión del gen constitutivo (RNA ribosomal 18S). En el panel B, relación entre la intensidad de la respuesta al reto antigénico en el día 15 de sensibilización y la expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT_{2A} en pulmón de cobayo. La respuesta de las vías aéreas se desarrolló después de inhalar el reto antigénico que fue evaluado por el incremento en el índice de pausa (Penh) con pletismografía barométrica.

La expresión del mRNA de los receptores 5-HT₃ de serotonina no se modifica con el proceso de sensibilización

La expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₃ en pulmón de cobayos sometidos al modelo experimental de asma tiene una tendencia a aumentar en comparación con cobayos control. En la figura 30, se puede observar que tendencia en la expresión relativa del mRNA de éste receptor es de 89.138 veces con respecto a la expresión relativa en cobayos control.

Por otra parte, al correlacionar el Penh con la expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₃ encontramos que no existe una relación entre el grado de broncoobstrucción y la cantidad del mRNA del receptor 5-HT₃ en pulmón de cobayos sometidos al modelo experimental de asma.

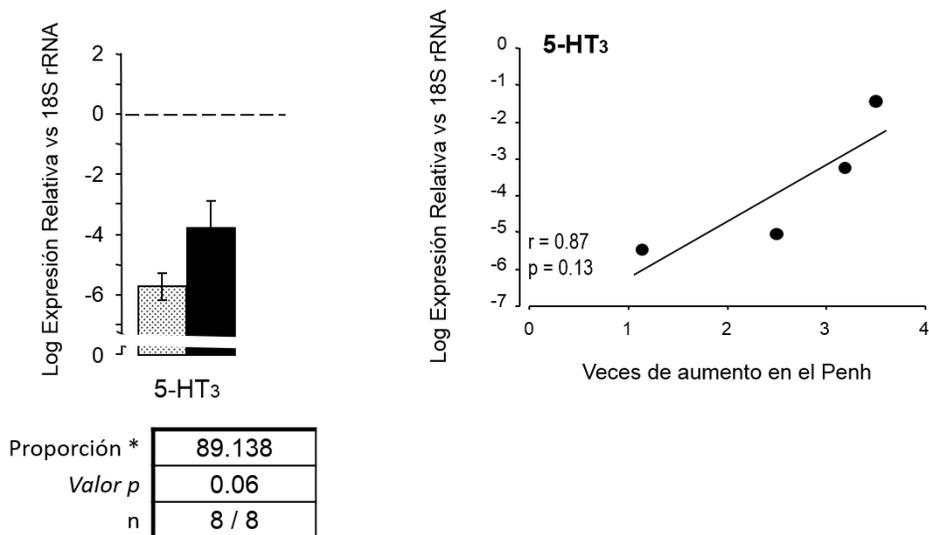


Figura 30. Expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₃ en homogenados de pulmón de cobayos control y cobayos sometidos al modelo experimental de asma y su relación con el Penh. En el panel A; se muestra la expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₃ en pulmón de cobayos control (barra gris) y cobayos sometidos al modelo experimental de asma (barra negra). Se normalizó con el gen constitutivo (RNA ribosomal 18S) y los datos se calcularon con el método $2^{-\Delta CT}$ (promedio geométrico \pm error estándar). La tabla muestra la expresión normalizada del mRNA del receptor 5-HT₃ (proportión modelo de asma/ control) que se calculó con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. El número de animales utilizados se puso al final de la tabla (n). La línea punteada indica el nivel basal de expresión del gen constitutivo (RNA ribosomal 18S). En el panel B, relación entre la intensidad de la respuesta al reto antigénico en el día 15 de sensibilización y la expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₃ en pulmón de cobayo. La respuesta de las vías aéreas se desarrolló después de inhalar el reto antigénico que fue evaluado por el incremento en el índice de pausa (Penh) con pletismografía barométrica.

La expresión del mRNA de los receptores 5-HT₄ de serotonina disminuye en las vías aéreas con el proceso de sensibilización

La expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₄ en pulmón de cobayos sometidos al modelo experimental de asma disminuye ($p < 0.001$) en comparación con cobayos sanos. En la figura 31, se

puede observar que la disminución de la expresión relativa del mRNA de éste receptor es de 0.003 veces con respecto a la expresión relativa en cobayos control.

Por otra parte, al correlacionar el Penh con la expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₄ encontramos que no existe una relación entre el grado de broncoobstrucción y la cantidad del mRNA del receptor 5-HT₄ en pulmón de cobayos con modelo de asma.

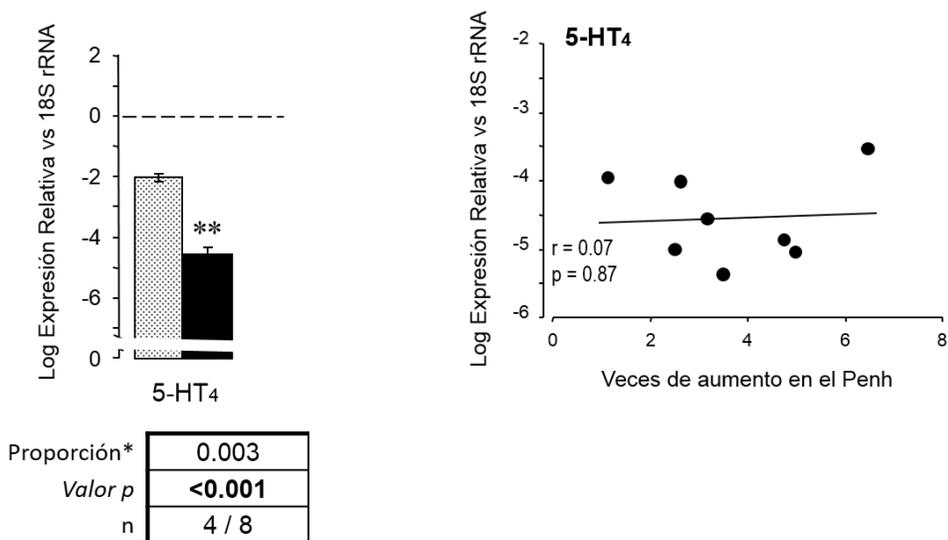


Figura 31. Expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₄ en homogenados de pulmón de cobayos control y cobayos sometidos al modelo experimental de asma y su relación con el Penh. En el panel A; se muestra la expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₄ en pulmón de cobayos control (barra gris) y cobayos sometidos al modelo experimental de asma (barra negra). Se normalizó con el gen constitutivo (RNA ribosomal 18S) y los datos se calcularon con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (promedio geométrico \pm error estándar). La tabla muestra la expresión normalizada del mRNA del receptor 5-HT₄ (proporción modelo de asma/ control) que se calculó con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. El número de animales utilizados se puso al final de la tabla (n). La línea punteada indica el nivel basal de expresión del gen constitutivo (RNA ribosomal 18S). En el panel B, relación entre la intensidad de la respuesta al reto antigénico en el día 15 de sensibilización y la expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₄ en pulmón de cobayo. La respuesta de las vías aéreas se desarrolló después de inhalar el reto antigénico que fue evaluado por el incremento en el índice de pausa (Penh) con pletismografía barométrica. **p<0.001.

La expresión de mRNA de los receptores 5-ht_{5a} de serotonina no cambia en las vías aéreas con el proceso de sensibilización

La expresión relativa del mRNA del receptor 5-ht_{5a} en pulmón de cobayos sometidos al modelo experimental de asma tiende a aumentar en comparación con cobayos control. En la figura 32, se puede observar que el posible aumento de la expresión relativa del mRNA de éste receptor es de 4.333 veces con respecto a la expresión relativa en cobayos control.

Por otra parte, al correlacionar el Penh con la expresión relativa del mRNA del receptor 5-ht_{5a} encontramos que no existe una relación entre el grado de broncoobstrucción y la cantidad del mRNA del receptor 5-ht_{5a} en pulmón de cobayos con modelo de asma.

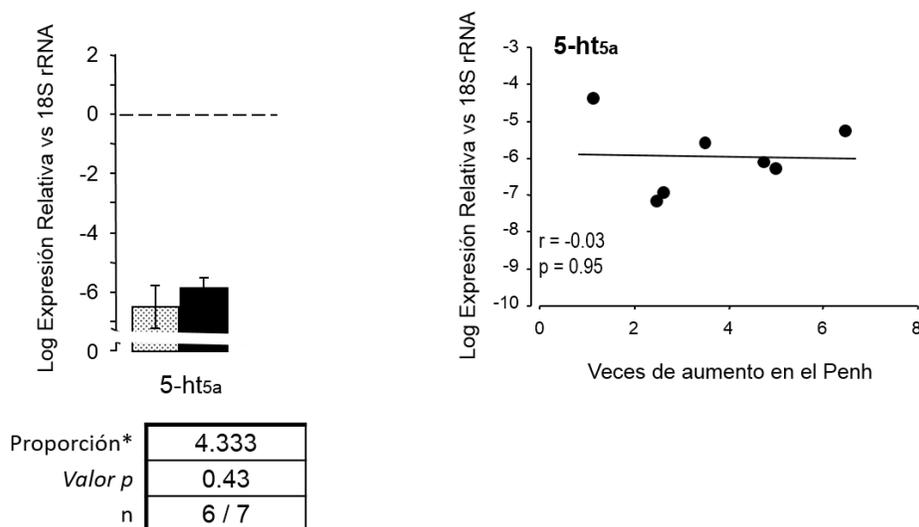


Figura 32. Expresión relativa del mRNA del receptor 5-ht_{5a} en homogenados de pulmón de cobayos control y cobayos sometidos al modelo experimental de asma y su relación con el Penh. En el panel A; se muestra la expresión relativa del mRNA del receptor 5-ht_{5a} en pulmón de cobayos control (barra gris) y cobayos sometidos al modelo experimental de asma (barra negra). Se normalizó con el gen constitutivo (RNA ribosomal 18S) y los datos se calcularon con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (promedio geométrico \pm error estándar). La tabla muestra la expresión normalizada del mRNA del receptor 5-ht_{5a} (proporción modelo de asma/ control) que se calculó con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. El número de animales utilizados se puso al final de la tabla (n). La línea punteada indica el nivel basal de expresión del gen constitutivo (RNA ribosomal 18S). En el panel B, relación entre la intensidad de la respuesta al reto antigénico en el día 15 de sensibilización y la expresión relativa del mRNA del receptor 5-ht_{5a} en pulmón de cobayo. La respuesta de las vías aéreas se desarrolló después de inhalar el reto antigénico que fue evaluado por el incremento en el índice de pausa (Penh) con pletismografía barométrica.

La expresión del mRNA de los receptores 5-HT₆ de serotonina no cambia en las vías aéreas con el proceso de sensibilización

La expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₆ en pulmón de cobayos sometidos al modelo experimental de asma tiende a aumentar en comparación con cobayos control. En la figura 33, se puede observar que el presumible aumento de la expresión relativa del mRNA de éste receptor es de 380.415 veces con respecto a la expresión relativa en cobayos control.

Por otra parte, al correlacionar el Penh con la expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₆ encontramos que no existe una relación entre el grado de broncoobstrucción y la cantidad del mRNA del receptor 5-HT₆ en pulmón de cobayos con modelo de asma.

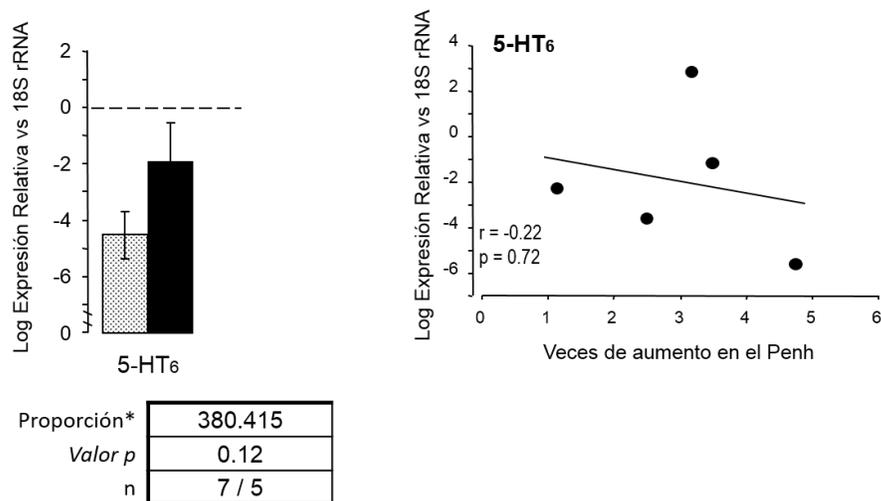


Figura 33. Expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₆ en homogenados de pulmón de cobayos control y cobayos sometidos al modelo de asma y su relación con el Penh. En el panel A; se muestra la expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₆ en pulmón de cobayos control (barra gris) y cobayos sometidos al modelo experimental de asma (barra negra). Se normalizó con el gen constitutivo (RNA ribosomal 18S) y los datos se calcularon con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (promedio geométrico \pm error estándar). La tabla muestra la expresión normalizada del mRNA del receptor 5-HT₆ (proporción modelo de asma/ control) que se calculó con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. El número de animales utilizados se puso al final de la tabla (n). La línea punteada indica el nivel basal de expresión del gen constitutivo (RNA ribosomal 18S). En el panel B, relación entre la intensidad de la respuesta al reto antigénico en el día 15 de sensibilización y la expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₆ en pulmón de cobayo. La respuesta de las vías aéreas se desarrolló después de inhalar el reto antigénico que fue evaluado por el incremento en el índice de pausa (Penh) con pletismografía barométrica.

La expresión del mRNA de los receptores 5-HT₇ de serotonina aumenta en las vías aéreas con el proceso de sensibilización

La expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₇ en pulmón de cobayos sometidos al modelo experimental de asma aumenta ($p < 0.03$) en comparación con cobayos control. En la figura 34, se puede observar que el aumento de la expresión relativa del mRNA de éste receptor es de 15.389 veces con respecto a la expresión relativa en cobayos control.

Por otra parte, al correlacionar el Penh con la expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₇ encontramos que no existe una relación entre el grado de broncoobstrucción y la cantidad del mRNA del receptor 5-HT₇ en pulmón de cobayos con modelo de asma.

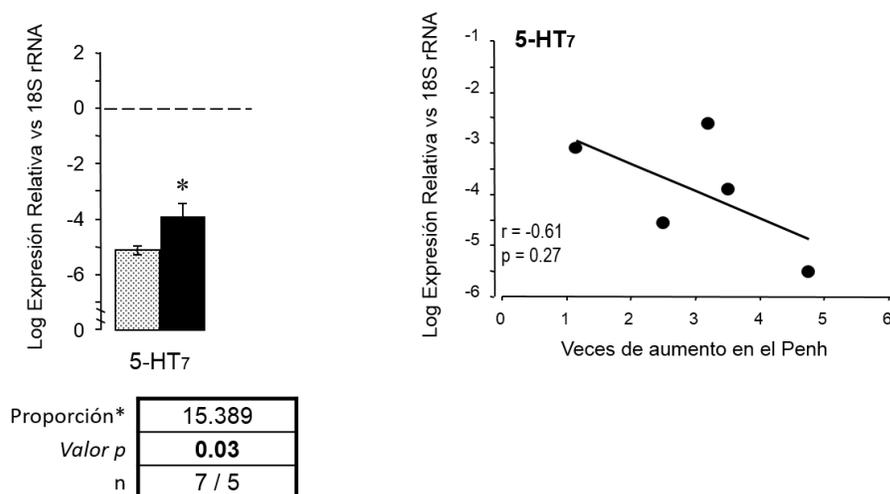


Figura 34. Expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₇ en homogenados de pulmón de cobayos sanos y cobayos con modelo y su relación con el Penh. En el panel A; se muestra la expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₇ en pulmón de cobayos sanos (barra gris) y cobayos sometidos al modelo experimental de asma (barra negra). Se normalizó con el gen constitutivo (RNA ribosomal 18S) y los datos se calcularon con el método $2^{-\Delta CT}$ (promedio geométrico \pm error estándar). La tabla muestra la expresión normalizada del mRNA del receptor 5-HT₇ (proporción modelo de asma/ sanos) que se calculó con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. El número de animales utilizados se puso al final de la tabla (n). La línea punteada indica el nivel basal de expresión del gen constitutivo (RNA ribosomal 18S). En el panel B, relación entre la intensidad de la respuesta al reto antigénico en el día 15 de sensibilización y la expresión relativa del mRNA del receptor 5-HT₇ en pulmón de cobayo. La respuesta de las vías aéreas se desarrolló después de inhalar el reto antigénico que fue evaluado por el incremento en el índice de pausa (Penh) con pletismografía barométrica.

La expresión del mRNA de los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT₄ y 5-HT₇ cambia su expresión en las vías aéreas con el proceso de sensibilización

En la cuantificación del mRNA de los receptores de serotonina en pulmón de cobayos sometidos al modelo experimental de asma por qRT-PCR encontramos que los receptores de serotonina son constitutivos del pulmón de cobayos.

El mRNA de los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT₄ y 5-HT₇ fueron los únicos que se modificaron por el proceso de sensibilización en cobayos con modelo de asma. El mRNA de los receptores 5-HT₇ aumentó en cobayos sometidos al modelo experimental de asma en comparación con cobayos control. Mientras que, el mRNA de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₄ disminuyen su expresión en cobayos sometidos al modelo experimental de asma en comparación con cobayos control (Figura 35).

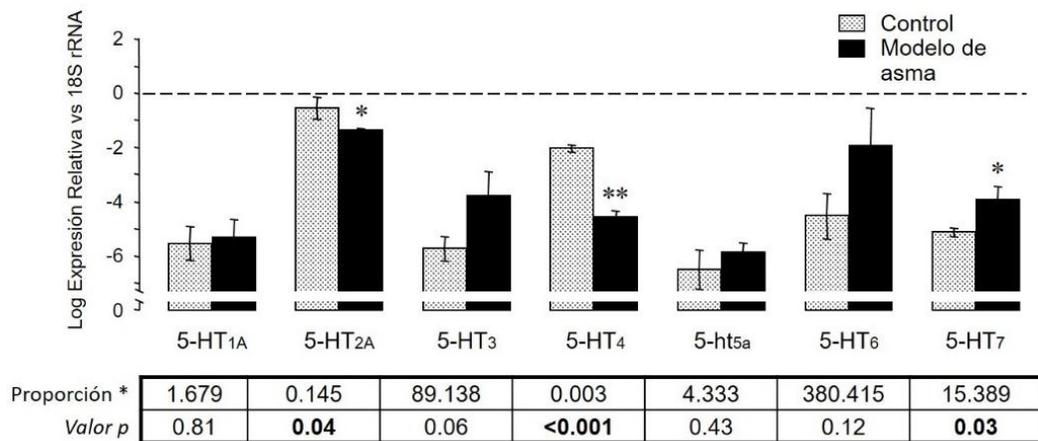


Figura 35. Expresión relativa del mRNA de los receptores de serotonina en homogenados de pulmón de cobayos control y cobayos sometidos al modelo experimental de asma. Se muestra la expresión relativa del mRNA de los receptores de serotonina en pulmón de cobayos controles (barra gris) y cobayos sometidos al modelo experimental de asma (barra negra). Se normalizó con el gen constitutivo (RNA ribosomal 18S) y los datos se calcularon con el método 2^{-ΔCT} (promedio geométrico ± error estándar). La tabla muestra la expresión normalizada del mRNA del receptor 5-HT₇ (proporción modelo de asma/ control) que se calculó con el método 2^{-ΔΔCT}. El número de animales utilizados se puso al final de la tabla (n). La línea punteada indica el nivel basal de expresión del gen constitutivo (RNA ribosomal 18S).

Caracterización Bioquímica

En la caracterización molecular se descubrió que el mRNA de los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT₄ y 5-HT₇ son en los que se modifica su expresión relativa por el proceso de sensibilización en cobayos con modelo de asma. El mRNA de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₄ disminuye su expresión relativa y en los receptores 5-HT₇ aumenta su expresión relativa en cobayos con modelo de asma.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la caracterización molecular, decidimos evaluar la cantidad de proteína que se expresa de los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT₄ y 5-HT₇ en diferentes tejidos de las vías aéreas en cobayos con modelos de asma y cobayos control. Para hacer la cuantificación de los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT₄ y 5-HT₇ usamos la técnica de Western blot en tejidos de músculo liso traqueal, epitelio traqueal, epitelio bronquial y en parénquima pulmonar de cobayos control y del modelo de asma.

El receptor 5-HT_{2A} aumenta su expresión en epitelio bronquial de cobayos sometidos al modelo experimental de asma

La expresión del receptor 5-HT_{2A} en tejidos pulmonares de cobayos control al compararlo con α -actina podemos observar que en músculo liso traqueal y en epitelio bronquial, éste receptor tiende a expresarse en menor cantidad que la proteína constitutiva. Por el contrario, en epitelio traqueal y en parénquima pulmonar el receptor 5-HT_{2A} tiende a expresarse en mayor cantidad.

Pero, al cuantificar la proteína de los receptores 5-HT_{2A} en estos mismos tejidos, pero en cobayos con modelo de asma, se encontró lo siguiente. Existe una tendencia en aumentar en la

cantidad de los receptores 5-HT_{2A} en músculo liso y epitelio traqueal y en parénquima pulmonar en cobayos con modelo de asma.

Sin embargo, la tendencia en aumentar en músculo liso y epitelio traqueal del receptor 5-HT_{2A}, es casi del doble de cantidad en cobayos sometidos al modelo experimental de asma que en cobayos control. Y en parénquima pulmonar es menos del doble en cantidad en cobayos sometidos al modelo experimental de asma que en cobayos control.

Por último, en el epitelio bronquial de cobayos sometidos al modelo experimental de asma aumentó ($p < 0.05$) la expresión del receptor 5-HT_{2A} en comparación con cobayos control (Figura 36).

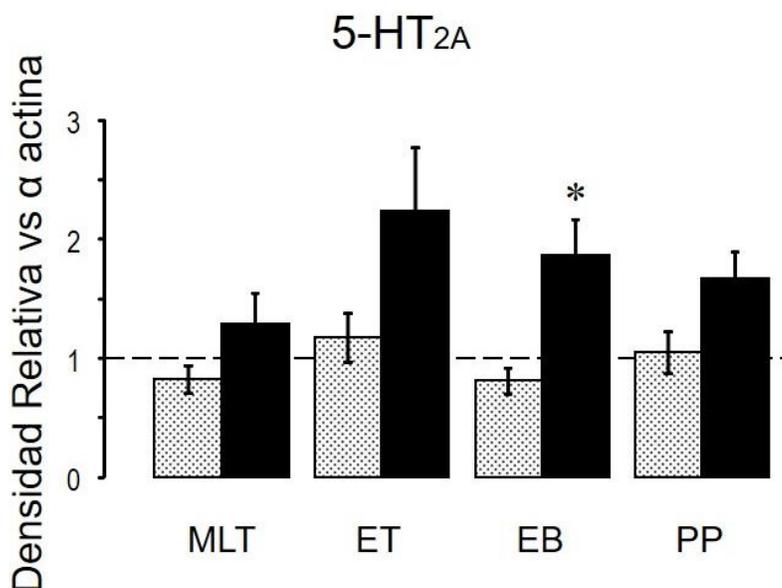


Figura 36. Expresión de la proteína del receptor 5-HT_{2A} analizado por Western blot en tejidos pulmonares de cobayos control y cobayos con modelo de asma. Los datos son expresados como densidad relativa (la proporción de densidades entre receptor de serotonina / α actina) en músculo liso traqueal (MLT), epitelio traqueal (ET), epitelio bronquial (EB) y parénquima pulmonar (PP) de cobayos control (barras punteadas) y de cobayos sometidos al modelo experimental de asma (barras negras). Las barras con el promedio \pm error estándar de 4-5 determinaciones de Western blot (cada determinación fue hecha con un pool de tejidos de tres cobayos). La línea punteada horizontal es el nivel basal de expresión de la proteína constitutiva (α actina). * $p < 0.05$ vs cobayos control.

El receptor 5-HT₄ aumenta su expresión en parénquima pulmonar de cobayos con modelo de asma

La proteína del receptor 5-HT₄ se expresa de múltiples maneras en tejidos pulmonares en cobayos con modelo de asma. En los epitelios traqueal y bronquial de cobayos control, la expresión de éste receptor tiende a ser menor que la α -actina. Y en el músculo liso traqueal y en parénquima pulmonar, el receptor 5-HT₄ tiende a expresarse en mayor cantidad que la proteína constitutiva.

Sin embargo, en estos mismos tejidos la expresión del receptor 5-HT₄ en cobayos sometidos al modelo experimental de asma es diferente. En epitelio bronquial, éste receptor parece no modificarse en su expresión en comparación con cobayos control.

Por otro lado, en músculo liso traqueal, éste receptor tiende a aumentar su expresión en cobayos con asma en comparación con cobayos control. Y éste posible aumento es casi el doble de cantidad del receptor 5-HT₄ en cobayos sometidos al modelo experimental de asma que en cobayos control. En epitelio traqueal, también existe una tendencia en aumentar éste receptor en cobayos con modelo de asma.

Sin embargo, en parénquima pulmonar el receptor 5-HT₄ aumenta ($p < 0.05$) su expresión en cobayos sometidos al modelo experimental de asma en comparación con cobayos control (Figura 37).

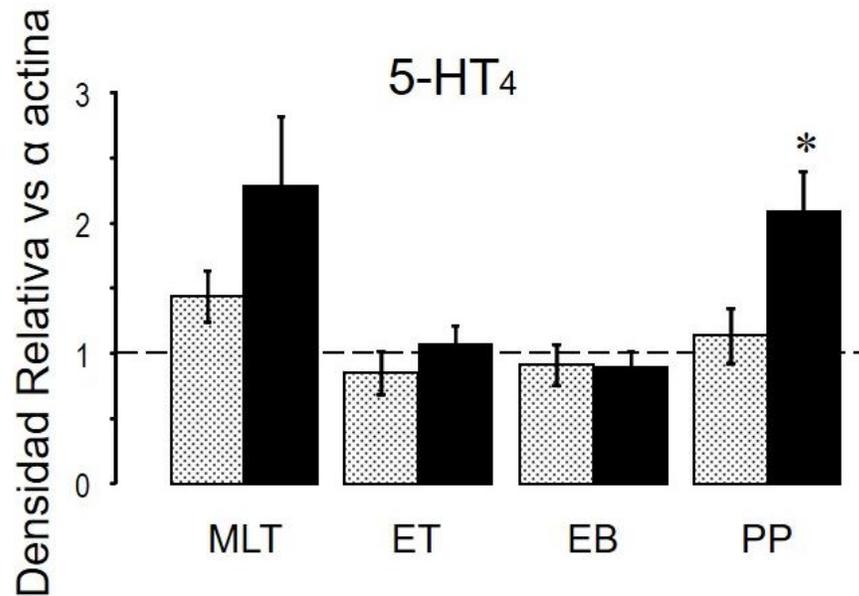


Figura 37. Expresión de la proteína del receptor 5-HT₄ analizado por Western blot en tejidos pulmonares de cobayos control y cobayos con modelo de asma. Los datos son expresados como densidad relativa (la proporción de densidades entre receptor de serotonina / α actina) en músculo liso traqueal (MLT), epitelio traqueal (ET), epitelio bronquial (EB) y parénquima pulmonar (PP) de cobayos control (barras punteadas) y de cobayos sometidos al modelo experimental de asma (barras negras). Las barras con el promedio \pm error estándar de 4-5 determinaciones de Western blot (cada determinación fue hecha con un pool de tejidos de tres cobayos). La línea punteada horizontal es el nivel basal de expresión de la proteína constitutiva (α actina). * $p < 0.05$ vs cobayos control.

El receptor 5-HT₇ no aumenta ni disminuye su expresión en tejidos pulmonares de cobayos con modelo de asma

El receptor 5-HT₇ en tejidos pulmonares de cobayos control tiende a expresarse en mayor cantidad al compararlo con la expresión de α -actina. En los tejidos de músculo liso traqueal, epitelio traqueal y en epitelio bronquial, la expresión del receptor 5-HT₇ es más del doble en cobayos control que la α -actina. Y en el parénquima pulmonar, éste receptor se expresa más de cuatro veces en cobayos control que la proteína constitutiva.

Al comparar la expresión del receptor 5-HT₇ en los mismos tejidos pulmonares se encontró lo siguiente. En el músculo liso traqueal, éste receptor al parecer se expresa en igual cantidad en cobayos sometidos al modelo experimental de asma que en cobayos sanos.

En epitelio traqueal y en parénquima pulmonar, el receptor 5-HT₇ tiende ligeramente a disminuir su expresión en cobayos sometidos al modelo experimental de asma al compararlo con cobayos control. Por el contrario, éste receptor en epitelio bronquial se observa que existe una ligera tendencia en aumentar en cobayos sometidos al modelo experimental de asma en comparación con cobayos control (Figura 38).

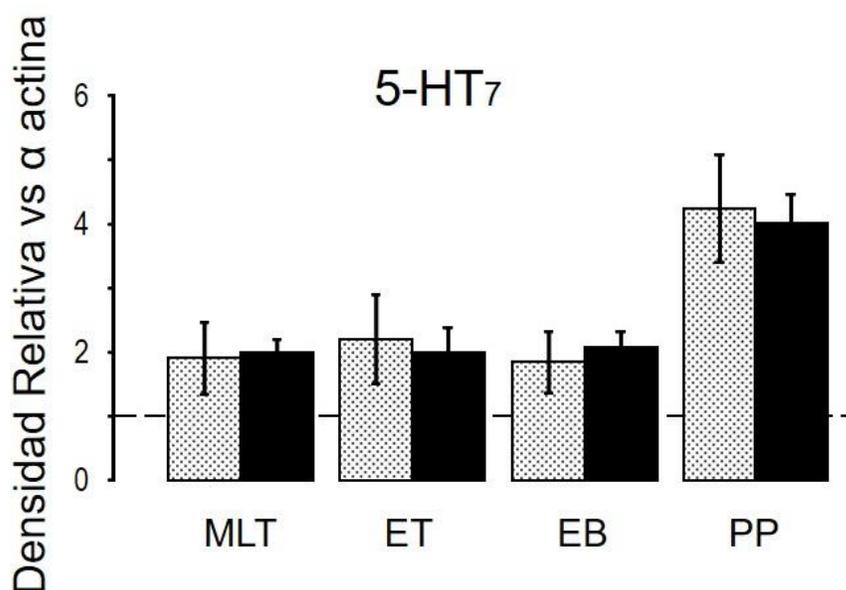


Figura 38. Expresión de la proteína del receptor 5-HT₇ analizado por Western blot en tejidos pulmonares de cobayos control y cobayos con modelo de asma. Los datos son expresados como densidad relativa (la proporción de densidades entre receptor de serotonina / α actina) en músculo liso traqueal (MLT), epitelio traqueal (ET), epitelio bronquial (EB) y parénquima pulmonar (PP) de cobayos control (barras punteadas) y de cobayos sometidos al modelo experimental de asma (barras negras). Las barras con el promedio \pm error estándar de 4-5 determinaciones de Western blot (cada determinación fue hecha con un pool de tejidos de tres cobayos). La línea punteada horizontal es el nivel basal de expresión de la proteína constitutiva (α actina).

DISCUSIÓN

El asma es una enfermedad de gran impacto en el área clínica a nivel mundial. Aproximadamente, 300 millones de personas en el mundo padecen de ésta enfermedad; puede haber una variación entre el 2% hasta el 30% en la incidencia de ésta enfermedad en el mundo. En México, ésta variación en la incidencia en el asma va desde en la Ciudad de México del ~5% y Mérida ~12%; y la población que más es afectada por el asma es la infantil⁴¹.

El asma es una enfermedad respiratoria que es definida como una enfermedad inflamatoria crónica y con una broncoconstricción reversible espontáneamente o con tratamiento. También, en el asma se desarrolla la hiperreactividad de las vías aéreas que es la principal anomalía fisiológica en ésta enfermedad. Debido a la enorme cantidad de mediadores que están involucrados⁴², el asma es considerada una enfermedad de gran complejidad. De tal forma, estudiar los mecanismos específicos que conllevan al desarrollo del asma son de gran relevancia clínica.

En la clínica, se puede llegar a usar biomarcadores asociados al asma y estos son típicos de una respuesta inflamatoria del tipo Th2. Por ejemplo, proteína C-reactiva, la proteína Periostina (se produce en respuesta a la estimulación de IL-13 e IL-4), IL-6, IL-17 y la infiltración de eosinófilos y neutrófilos⁴³. Por otro lado, en la literatura se menciona que existen moléculas preformadas que se liberan durante el proceso inflamatorio y por lo regular se hace referencia a la histamina y prostaglandinas^{16, 29, 42, 44}.

La serotonina, al igual que la histamina, se puede comportar como un neurotransmisor o como una molécula preformada que se libera durante un reto antigénico. La mayoría de las investigaciones sobre serotonina se enfocan principalmente en el sistema nervioso central, tracto gastrointestinal y en vasos sanguíneos^{3, 7, 11, 45}. Sin embargo, existe suficiente evidencia, tanto en estudios clínicos como en estudios en modelos animales, sobre el papel importante que tiene la serotonina y sus receptores en el asma^{28, 33, 35, 36, 47}.

Entonces, haciendo una recapitulación sobre las investigaciones sobre el papel de la serotonina y sus receptores en el asma tenemos lo siguiente. Enfocándonos en nuestro grupo de trabajo, hasta antes de éste estudio, hemos encontrado que los receptores de serotonina están involucrados en la generación de broncoespasmo y la hiperreactividad en cobayos con modelo de asma. Al menos, en la generación de hiperreactividad los receptores de serotonina que están involucrados son los 5-HT_{2A}, 5-HT₄ y 5-HT₇. Además, la serotonina es activamente liberada después de un reto antigénico en pulmón de cobayos con modelo de asma. Probablemente ésta serotonina se libera de las células neuroendócrinas pulmonares^{35, 36}.

Con lo anteriormente descrito, tenemos suficiente información sobre las funciones fisiológicas de los receptores de serotonina en el asma. Sin embargo, hasta éste momento en la literatura no se tenía reportado cómo es la expresión de los receptores de serotonina en las vías aéreas o en alguna patología relacionada.

Así, para mejorar la comprensión de los mecanismos serotoninérgicos vinculados al desarrollo del asma, llevamos a cabo la **caracterización molecular y bioquímica** de los receptores

de serotonina en cobayos controles y sometidos al modelo experimental de asma. Por lo cual, hicimos una cuantificación del mRNA de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5a}, 5-HT₆ y 5-HT₇ con la técnica de qRT-PCR y una cuantificación de la proteína por medio de Western blot de los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT₄ y 5-HT₇.

Empezamos cuantificando el mRNA de los receptores de serotonina con la técnica de qRT-PCR en homogenados de pulmón de cobayos control y cobayos sometidos al modelo experimental de asma. Encontramos que los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5a}, 5-HT₆ y 5-HT₇ se expresan de manera constitutiva en pulmón de cobayo. Es importante resaltar que, detección de los receptores de serotonina en tejidos pulmonares en modelos animales no ha sido descrito exhaustivamente.

Existe un reporte sobre el mRNA del receptor 5-HT_{2A}, que se expresa en tráqueas de cobayos y ratas. Además, estos autores demostraron que la densidad del receptor 5-HT_{2A} coincide con el aumento en la respuesta contráctil a la serotonina⁴⁸.

En otro estudio que se enfocó en la expresión de los receptores de serotonina en vasos sanguíneos, los autores encontraron que en la arteria pulmonar de cerdo el orden de expresión del mRNA de los receptores de serotonina es: 5-HT_{2A} > 5-HT_{2B} = 5-HT₇ > 5-HT₄ = 5-HT_{1B/Dβ}. De forma similar, en las células endoteliales de la arteria pulmonar el mRNA de los receptores que se expresan son: 5-HT_{2B} = 5-HT_{1B/Dβ} » 5-HT₄. Finalmente, en el músculo liso de la arteria pulmonar se expresa el mRNA de los receptores: 5-HT_{2A} > 5-HT_{1B/Dβ} = 5-HT₇ > 5-HT_{2B}⁴⁹.

Por último, hay dos estudios más sobre la expresión del mRNA los receptores de serotonina en tejidos pulmonares. En un estudio, los autores encontraron que se expresa el mRNA del receptor 5-HT_{2C} en neumocitos del tipo II de ratas⁵⁰. En el segundo estudio, se encontró que se incrementa la expresión del mRNA y la proteína del receptor 5-HT_{2A} en tejidos pulmonares de ratas con modelo de hernia diafragmática congénita⁵¹.

Además, de la localización pulmonar de los receptores de serotonina, algunos autores también se han enfocado en estudiar la modificación de estos receptores después de alguna exposición a un estímulo nocivo. Por ejemplo, después de describir la expresión basal del receptor 5-HT_{2A} en bronquios de rata, los autores encontraron que la expresión del mRNA y de la proteína del receptor 5-HT_{2A} se incrementa después de la exposición a humo de cigarro⁵². Igualmente, Dupont en el 2014⁷³ describió que se incrementa la expresión de mRNA del receptor 5-HT₄ en pulmón de ratón después de estar expuestos a humo de tabaco. Por otro lado, se ha reportado que el mRNA y la proteína de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₄ en epitelio de vías aéreas centrales y periféricas de monos Rhesus, tiende a aumentar después de una exposición aguda o intermitente de ozono⁵³. Finalmente, se encontró que los receptores 5-HT₇ tienen un bajo nivel de expresión en el intersticio pulmonar de ratas, pero dicha expresión se distribuye ampliamente y en un nivel mayor en un modelo de rata de shock séptico⁵⁴.

Por otro lado, en estudios con humanos, se encontró al comparar personas sanas con pacientes asmáticos que la expresión del mRNA del receptor 5-HT_{2A} aumenta en los últimos^{55, 56}.

Así como, el receptor 5-HT₃ que se expresa en las células sanguíneas mononucleares periféricas⁵⁷,
58.

De acuerdo con estos trabajos, en este trabajo nosotros encontramos que el desarrollo de la inflamación pulmonar fue acompañado con cambios en la expresión relativa del mRNA de los receptores de serotonina pulmonares. De éste modo, el proceso de sensibilización hizo que disminuyera el mRNA de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₄ y del receptor 5-HT₇ aumentara. Con la finalidad de darle más peso a estos cambios en la expresión del mRNA en tejidos pulmonares específicos, también analizamos la expresión de la proteína de estos tres receptores en epitelio y músculo liso de las vías aéreas y en parénquima pulmonar. Sin embargo, a pesar de que detectamos que el proceso de sensibilización modifica la expresión protéica de los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT₄ y 5-HT₇; contrario a nuestra hipótesis, estas modificaciones no son totalmente concordantes con los cambios observados con la expresión del mRNA de estos receptores. Por ejemplo, los niveles de expresión del mRNA de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₄ disminuyen con el proceso de sensibilización, pero en la mayoría de los tejidos estudiados la proteína de estos receptores tiende a incrementar. Por otro lado, el mRNA del receptor 5-HT₇ aumenta con el proceso de sensibilización, aunque sin cambios en la expresión de la proteína.

No obstante, nosotros esperábamos que el nivel de expresión del mRNA de los receptores de serotonina correlacionaran con el nivel de expresión de sus proteínas. Aparentemente, esto parece ya no ser una regla, ya que existen estudios en dónde reportan una mínima o una modesta correlación entre los niveles de mRNA con la síntesis de proteínas^{59, 60, 61, 62}.

En la literatura se han propuesto explicaciones potenciales para la discrepancia en correlación entre los niveles de mRNA y la síntesis de proteínas. Algunas explicaciones se basan en la existencia de complejos transcripcionales que regulan estos mecanismos, la vida media de las proteínas y el grado de estabilidad del mRNA^{60, 62, 63}. Por ejemplo, la eficiencia transcripcional es aumentada por la acción de YTHDF1 en la presencia de N⁶-metiladenosina⁶⁴. Además, en el artículo de Esquerré 2015⁶², revisaron bases de datos de la vida media de algunos mRNA de *Escherichia coli* y encontraron que el principal factor en la vida media del mRNA (con un rango de 1 a 53 minutos) era la propia concentración del mRNA. Por lo tanto, entre más baja sea la concentración de mRNA, más larga es la vida media del mRNA. Así, en el presente estudio los niveles de expresión proteica de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₄ fue más grande a pesar de tener una baja expresión de su mRNA. Esto se puede explicar con la hipótesis anterior, al tener estos receptores un mRNA con vida media larga, tienen más oportunidad en traducirse en proteína. De hecho, se ha reportado que los receptores de serotonina pueden ser modificados por éste tipo de mecanismos moleculares. Se ha reportado que el mRNA del receptor 5-HT_{2A} puede incrementar su estabilidad y su vida media después de una estimulación con serotonina en estudios *in vitro*^{65, 66}.

Como se ha mencionado, en un estudio previo hecho por nosotros mismos al administrar antagonistas selectivos de los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT₄ y 5-HT₇ en cobayos con modelo de asma observamos que podemos evitar la hiperreactividad. Con base en estos resultados, concluimos que estos tres receptores están involucrados en la generación de hiperreactividad en cobayos con modelo de asma³⁶. Por consiguiente, en el presente estudio encontramos que los receptores 5-

HT_{2A} y 5-HT₄ son los que expresan altos niveles de proteína y esto concuerda completamente con el papel relevante de estos receptores en cobayos con modelo de asma.

Por otro lado, no tenemos una explicación clara y específica sobre la correlación inversamente proporcional entre el grado de sensibilización (respuesta de las vías aéreas al antígeno en el día 15) y la expresión del mRNA del receptor 5-HT_{1A}. No obstante, si esta asociación es una relación causa-efecto, entonces podemos decir que el proceso de sensibilización induce una regulación a la baja del mRNA del receptor 5-HT_{1A}.

Una exposición alternativa, sobre que el proceso de sensibilización puede determinar los niveles de expresión del mRNA del receptor 5-HT_{1A}; es descartada totalmente. Sin embargo, además de tener un importante papel del en el sistema nervioso central, se ha reportado que el receptor 5-HT_{1A} está ampliamente expresado en células inflamatorias como monocitos/macrófagos, células cebadas, eosinófilos, células dendríticas y linfocitos. En términos generales, la activación de los receptores 5-HT_{1A} en estas células provoca efectos proinflamatorios⁶⁷.

De ésta manera, se podría esperar que el aumento en la expresión del mRNA del receptor 5-HT_{1A} se tradujera en una gran cantidad de proteína, y aparentemente no es así. Pero, una limitación potencial en esta parte del estudio fue la disociación temporal de entre el registro de la respuesta fisiológica al antígeno (Δ Penh en el día 15) y la medición de la expresión de los receptores de serotonina en el día 21-24). Ya que, nuestro objetivo era evaluar la expresión de los receptores de serotonina es un estado homeostático. Sin embargo, tomar éste tiempo entre la

medición del Penh y medición de la expresión del mRNA era necesaria; ya que se tiene que evitar cualquier efecto residual de la exposición al alérgeno en la expresión de los receptores de serotonina.

Finalmente, extendimos la **caracterización farmacológica** de los receptores de serotonina involucrados en la generación de hiperreactividad en cobayos sometidos al modelo experimental de asma. Además, de los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT₄ y 5-HT₇, el receptor 5-HT_{1B/1D} está involucrado en la generación de hiperreactividad bronquial. Se ha reportado que los receptores 5-HT_{1B/1D} promueven la contracción del músculo liso en episodios de migraña en perros y cerdos^{68, 69, 70}. También se ha reportado que la contracción inducida por serotonina en la arteria pulmonar humana fue mimetizada por un agonista de los receptores 5-HT_{1B/1D}⁷¹ (Sumatriptan).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Con los resultados de éste trabajo podemos concluir que los receptores de serotonina 5-HT_{1B/1D} también están involucrados en la generación de hiperreactividad en cobayos sometidos al modelo experimental de asma.

Por otro lado, el mRNA de los receptores de serotonina 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5a}, 5-HT₆ y 5-HT₇ se expresan de manera constitutiva en el pulmón de cobayos. Además, el proceso de sensibilización alérgica en cobayos sometidos al modelo experimental de asma modifica la expresión tanto a nivel de mRNA como en la síntesis de proteínas de los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT₄, y 5-HT₇.

Este trabajo es una parte de la línea de investigación sobre el papel de la serotonina en el asma. Hemos explorado el papel de los receptores de serotonina en la generación de broncoobstrucción e hiperreactividad en cobayos con modelo de asma. También, ya reportamos que la serotonina se libera en grandes cantidades del pulmón después de un reto antigénico.

Para continuar con ésta línea de investigación, nos falta explorar la función de SERT (transportador de serotonina) y de TPH1 (enzima que sintetiza serotonina) en cobayos con modelo de asma. Para así, poder proponer la existencia de un sistema serotoninérgico en las vías aéreas.

También, se podría utilizar la técnica de inmunohistoquímica para determinar que poblaciones celulares expresan a los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT₄ y 5-HT₇ en pulmón de cobayos con

modelo de asma. Y así, extender el conocimiento generado por los experimentos del presente estudio.

REFERENCIAS

1. Mawe, G M Hoffman, J M. (2013). Serotonin signalling in the gut--functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 8, 473-486.
2. Iceta Echave R. (2008). Caracterización del transportador de serotonina humano de células CACO-2: estudio de los mecanismos de regulación fisiológica. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, España.
3. Gershon, M D Tack, Jan. (2007). The Serotonin Signaling System: From Basic Understanding To Drug Development for Functional GI Disorders. *Gastroenterology*, 132:1, 397-414.
4. Livermore, S Zhou, Y Pan, J Yeager, H Nurse, C A Cutz, E. (2015). Pulmonary neuroepithelial bodies are polymodal airway sensors: evidence for CO₂/H⁺ sensing. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 308:8, L807-L815.
5. Kushnir-Sukhov, N. M. Brittain, E. Scott, L. Metcalfe, D. D. (2008). Clinical correlates of blood serotonin levels in patients with mastocytosis. *European Journal of Clinical Investigation*, 38:12, 953-958.
6. Duerschmied, Daniel Suidan, Georgette L. Demers, Melanie Herr, Nadine Carbo, Carla Brill, Alexander Cifuni, Stephen M. Mauler, Maximilian Cicko, Sanja Bader, Michael Idzko, Marco Bode, Christoph Wagner, Denisa D. (2013). Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood*, 121:6, 1008-1015.
7. Ni, Wei Watts, Stephanie W. (2006). 5-Hydroxytryptamine in the cardiovascular system: Focus on the serotonin transporter (SERT). *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33:7, 575-583.
8. Hoyer D, Martin G. (1997). 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology*, 36:4-5, 419-428.
9. Saxena, P. R. De Vries, P. Villalón, C. M. (1998). 5-HT₁-like receptors: A time to bid goodbye. *Trends in Pharmacological Sciences*, 19:8, 311-316.
10. Villalón, Carlos M. Centurión, David. (2007). Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: A pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and therapeutic implications. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 376:1-2, 45-63.

11. Pytliak, M Vargová, V Mechírová, V Felšöci, M. (2011). Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications.. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 60:1, 15-25.
12. IUPHAR/BPS. (2016). 5-Hydroxytryptamine receptors. IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology. 10.04.2016, de International Union of Basic and Clinical Pharmacology/British Pharmacological Society Sitio web: <http://www.guidetopharmacology.org>.
13. Yubero-Lahoz, S Robledo, P Farré, M de la Torre, R Yubero-Lahoz S, Robledo P, Farré M, de la Torre R. (2013). Platelet SERT as a Peripheral Biomarker os Serotonergic Neurotransmission in the Central Nervous System. *Current medicinal chemistry*, 20:11, 1382-1396.
14. Jorge Salas Hernández, Rocío Chapela Mendoza, Mario H. Vargas. (2015). ASMA y condiciones especiales. México, DF: PyDESA.
15. Global Initiative for Asthma. Update 2015. Global strategy for asthma management and prevention.
16. Agrawal, Devendra K. Shao, Zhifei. (2010). Pathogenesis of allergic airway inflammation. *Current Allergy and Asthma Reports*, 10:1, 39-48.
17. Barnes, Peter J. (2003). Pulmonology Update Update on Asthma. *Israel Medical Association Journal*, 5-January, 68-72.
18. Kim, Hye Young DeKruyff, Rosemarie H Umetsu, Dale T. (2010). The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nature immunology*, 11:7, 577-584.
19. Bloemen, Karolien Verstraelen, Sandra Van Den Heuvel, Rosette Witters, Hilda Nelissen, Inge Schoeters, Greet. (2007). The allergic cascade: Review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunology Letters*, 113-1, 6-18.
20. Galli, Stephen J Tsai, Mindy Piliponsky, Adrian M. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature*, 454-7203, 445-454.
21. Busse, William W. (2010). The relationship of airway hyperresponsiveness and airway inflammation: Airway hyperresponsiveness in asthma: Its measurement and clinical significance. *Chest*, 138-2 Supplement, 4S-10S.
22. Soto, Angulo Syomara Partida, Gaytán Armando Romero, Pérez María Soledad Martínez, Viveros Angélica Díaz, García Luisa Bautista, García Sandra Guadalupe. (2015). Análisis descriptivo

de la sensibilización a alérgenos en una población pediátrica. *Alwegía, Asma e Inmunología. Pediátricas*, 24-2, 40-53.

23. Cockcroft, Donald W Davis, Beth E. (2006). Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118-3, 551-559.

24. Lauzon, Anne-Marie Martin, James G. (2016). Airway hyperresponsiveness; smooth muscle as the principal actor. *F1000Research*, 5, 1-9.

25. Global Initiative for Asthma. Update 2010. Global strategy for asthma management and prevention.

26. Anderson SD. (2010). Indirect challenge tests: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest*, 138:2 Supplement, 25S-30S.

27. O'Byrne, Paul M Mark, D. Inman. (2003). Airway Hyperresponsiveness. *Chest*, 123, 411S–416S.

28. Lechin, F van der Dijs, B Orozco, B Lechin, M Lechin, A E. (1996). Increased levels of free serotonin in plasma of symptomatic asthmatic patients.. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 77:3, 245-253.

29. Barnes, Peter J. (2011). 21 – Pathophysiology of Allergic Inflammation. *Middleton's Allergy*, 242, 327-342.

30. Müller, Tobias Dürk, Thorsten Blumenthal, Britta Grimm, Melanie Cicko, Sanja Panther, Elisabeth Sorichter, Stephan Herouy, Yared Di Virgilio, Francesco Ferrari, Davide Norgauer, Johannes Idzko, Marco. (2009). 5-hydroxytryptamine modulates migration, cytokine and chemokine release and T-cell priming capacity of dendritic cells in vitro and in vivo. *PLoS ONE*, 4:7, 1-8.

31. Dürk, Thorsten Panther, Elisabeth Müller, Tobias Sorichter, Stephan Ferrari, Davide Pizzirani, Cinzia Di Virgilio, Francesco Myrtek, Daniel Norgauer, Johannes Idzko, Marco. (2005). 5-Hydroxytryptamine modulates cytokine and chemokine production in LPS-primed human monocytes via stimulation of different 5-HTR subtypes. *International Immunology*, 17:5, 599-606.

32. Bayer, Hans Müller, Tobias Myrtek, Daniel Sorichter, Stephan Ziegenhagen, Manfred Norgauer, Johannes Zissel, Cernot Idzko, Marco. (2007). Serotonergic receptors on human airway epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 36:1, 85-93.

33. Dürk, Thorsten Duerschmied, Daniel Müller, Tobias Grimm, Melanie Reuter, Sebastian Vieira, Rodolfo Paula Ayata, Korcan Cicko, Sanja Sorichter, Stephan Walther, Diego J. Virchow, J. Christian Taube, Christian Idzko, Marco. (2013). Production of serotonin by tryptophan hydroxylase 1 and release via platelets contribute to allergic airway inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187:5, 476-485.
34. Campos-Bedolla, Patricia Vargas, Mario H. Segura, Patricia Carbajal, Verónica Calixto, Eduardo Figueroa, Alejandra Flores-Soto, Edgar Barajas-López, Carlos Mendoza-Patiño, Nicandro Montaña, Luis M. (2008). Airway smooth muscle relaxation induced by 5-HT_{2A} receptors: Role of Na⁺/K⁺-ATPase pump and Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Life Sciences*, 83:11-12, 438-446.
35. Arreola-Ramírez, José Luis Vargas, Mario H Manjarrez-Gutiérrez, Gabriel Alquicira, Jesús Gutiérrez, Julio Córdoba, Guadalupe Campos-Bedolla, Patricia Segura-Medina, P. (2013). Modifications of plasma 5-HT concentrations during the allergic bronchoconstriction in guinea pigs. *Experimental lung research*, 39:7, 269-274.
36. Segura, P. Vargas, M. H. Córdoba-Rodríguez, G. Chávez, J. Arreola, J. L. Campos-Bedolla, P. Ruiz, V. García-Hernández, L. M. Méndez, C. Montaña, L. M. (2010). Role of 5-HT_{2A}, 5-HT₄ and 5-HT₇ receptors in the antigen-induced airway hyperresponsiveness in guinea-pigs. *Clinical and Experimental Allergy*, 40:2, 327-338.
37. Livak, K J Schmittgen, T D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods*, 25, 402-408.
38. Drorbaug, E Wallace, F. (1955). A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics*, 16, 81-87.
39. Hamelmann, E. Schwarze, J. Takeda, K. Oshiba, A. Larsen, G. L. Irvin, C. G. Gelfand, E. W. (1997). Noninvasive Measurement of Airway Responsiveness in Allergic Mice Using Barometric Plethysmography. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 156:3, 766-775.
40. Vargas, Mario H. Sommer, Bettina Bazán-Perkins, Blanca Montaña, Luis M. (2010). Airway responsiveness measured by barometric plethysmography in guinea pigs. *Veterinary Research Communications*, 34:7, 589-596.
41. Vargas-Becerra, Mario. (2009). Epidemiología del asma. *Neumología y Cirugía de Tórax*, 68: S2, S91-S97.

42. Holgate, Stephen T. (2011). Asthma: A simple concept but in reality a complex disease. *European Journal of Clinical Investigation*, 41:12, 1339-1352.
43. Wan, X C, Woodruff, P G . (2016). Biomarkers in Severe Asthma. *Immunology And Allergy Clinics of North America*, 36, 547–557.
44. O'Mahony, L Akdis, M, Akdis, C A. (2011). Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128:6, 1153-1162.
45. MacLean, M R Herve, P Eddahibi, S Adnot, S. (2000). 5-Hydroxytryptamine and the Pulmonary Circulation: Receptors, Transporters and Relevance To Pulmonary Arterial Hypertension.. *British Journal of Pharmacology*, 131:2, 161-168.
46. Lechin, Fuad Van Der Dijs, Bertha Lechin, Alex E. Boushey, Homer A. (2004). Tianeptine: A New Exploratory Therapy for Asthma [1] (multiple letters). *Chest*, 125:1, 348-349.
47. Lechin, Fuad Dijs, Bertha Van Der Jara, Hector Rada, Isais Lechin, Marcel E Lechin, Alex E. (1998). Neuropharmacologic treatment of bronchial asthma with the antidepressant tianeptine : A double- blind , crossover placebo-controlled study. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 64:2, 223-232.
48. Baez, M Mercurio, L, Schenck K Cohen, ML. (1994). Relationship between 5-HT_{2A} receptor mRNA density and contractility in trachea and aorta from guinea pig and rat. *Life Science*, 55:6, PL105-PL114.
49. Ullmer, C Schmuck, K Kalkman, HO Lübbert, H. (1995). Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Lett*, 370:3, 215:221.
50. Wang, D Post, M Cutz, E. (1999). Expression of serotonin receptor 2c in rat type II pneumocytes. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 20:6, 1175-1180.
51. Hofmann, AD Friedmacher, F Hunziker, M Takahashi, H Duess, JW Gosemann, JH Puri, P. (2014). Upregulation of serotonin-receptor-2a and serotonin transporter expression in the pulmonary vasculature of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *Journal of Pediatric Surgery*, 49:6, 871-874.
52. Cao, Lei Zhang, Yaping Cao, Yong Xiao Edvinsson, Lars Xu, Cang Bao. (2012). Secondhand smoke exposure causes bronchial hyperreactivity via transcriptionally upregulated endothelin and 5-hydroxytryptamine 2A receptors. *Plos One*, 7:8, 1-9.

53. Murphy, S R Schelegle, E S Miller, L A Hyde, D M Van Winkle, L S. (2013). Ozone exposure alters serotonin and serotonin receptor expression in the developing lung. *Toxicological Sciences*, 134:1, 168-179.
54. Cadirci, Elif Halici, Zekai Bayir, Yasin Albayrak, Abdulmecit Karakus, Emre Polat, Beyzagul Unal, Deniz Atamanalp, Sabri S. Aksak, Selina Gundogdu, Cemal. (2013). Peripheral 5-HT7 receptors as a new target for prevention of lung injury and mortality in septic rats. *Immunobiology*, 218:10, 1271-1283.
55. Ahangari, G Koochak, SE Amirabad, LM Deilami, GD. (2015). Investigation of 5-HT2A gene expression in PBMCs of patients with allergic asthma. *Inflammation Allergy Drug Targets*, 14:1, 60-64.
56. Sheikha H, Emadi S, Jorbozedar S, Deilami, GD Ahangari, G. (2014). Investigation of gene expression pattern of 5HT2a and MAO-A in PBMCs of individuals who had been exposed to air pollution in highly polluted area. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 8:3, 203-210.
57. Ahangari, G Amirabad, LM Mozafari, S Majeidi, A Deilami, GD. (2013). Investigation of 5-HT3A receptor gene expression in peripheral blood mononuclear cells of individuals who had been exposed to air pollution. *Inflammation Allergy Drug Targets*, 12:6, 433:438.
58. Mohammadi Amirabad, L Ahangari, G Derakhshan, Deilami G. (2014). Significant changes of 5-Hydroxytryptamine 3A receptor gene expression in peripheral blood mononuclear cells of allergic asthmatic patients. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 13:1, 33-39.
59. Anderson, Leigh Seilhamer, Jeff. (1997). A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*, 18:3-4, 533-537.
60. Greenbaum, Dov Colangelo, Christopher Williams, Kenneth Gernstein, Mark. (2003). Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biology*, 4, 117.1-117.8
61. Ideker, Trey Thorsson, Vestein Ranish, Jeffrey A Bumgarner, Roger Goodlett, David R Aebersold, Ruedi. (2014). Integrated Genomic and Proteomic Analyses of a Systematically Perturbed Metabolic Network. *Science*, 929:2001, 929-934.
62. Esquerré, Thomas Moisan, Annick Chiapello, Hélène Arike, Liisa Vilu, Raivo Gaspin, Christine Cocaign-Bousquet, Muriel Girbal, Laurence. (2015). Genome-wide investigation of mRNA

lifetime determinants in *Escherichia coli* cells cultured at different growth rates. *BMC genomics*, 16:1, 275.

63. Nie, Lei Wu, Gang Zhang, Weiwen. (2006). Correlation of mRNA expression and protein abundance affected by multiple sequence features related to translational efficiency in *Desulfovibrio vulgaris*: A quantitative analysis. *Genetics*, 174:4, 2229-2243.

64. Wang, Xiao Zhao, Boxuan Simen Roundtree, Ian A. Lu, Zhike Han, Dali Ma, Honghui Weng, Xiaocheng Chen, Kai Shi, Hailing He, Chuan. (2015). N6-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*, 161:6, 1388-1399.

65. Ferry, R C Unsworth, C D Artymyshyn, R P Molinoff, P B. (1994). Regulation of mRNA encoding 5-HT_{2A} receptors in P11 cells through a post-transcriptional mechanism requiring activation of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, 259:25, 31850-31857.

66. Wohlpart, KL Molinoff, PB. (1998). Regulation of levels of 5-HT_{2A} receptor mRNA. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 186:1, 128-135.

67. Arreola, Rodrigo Becerril-Villanueva, Enrique Cruz-Fuentes, Carlos Velasco-Velázquez, Marco Antonio Garces-Alvarez, Maria Eugenia Hurtado-Alvarado, Gabriela Quintero-Fabian, Saray Pavon, Lenin. (2015). Immunomodulatory effects mediated by serotonin. *Journal of Immunology Research*, 2015, 354957.

68. Villalón, C M De Vries, P Rabelo, G Centurión, D Sánchez-López, A Saxena, P. (1999). Canine external carotid vasoconstriction to methysergide, ergotamine and dihydroergotamine: role of 5-HT_{1B/1D} receptors and alpha₂-adrenoceptors. *British journal of pharmacology*, 126:3, 585-594.

69. Willems, E De Vries, P Heiligers, JP Saxena, PR. (1998). Porcine carotid vascular effects of eletriptan (UK-116,044): a new 5-HT_{1B/1D} receptor agonist with anti-migraine activity. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 358:2, 212-219.

70. Villalón, Carlos M Centurión, David Valdivia, Luis Felipe Vries, Peter De Saxena, Pramod R. (2003). Migraine: Pathophysiology, Pharmacology, Treatment and Future Trends. *Current Vascular Pharmacology*, 1, 71-84.

71. Morecroft, I Heeley, R P Prentice, H M Kirk, A MacLean, M R. (1999). 5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in human small muscular pulmonary arteries: importance of the 5-HT_{1B} receptor. *British Journal of Pharmacology*, 128:3, 730-734.

72. Müller T, Dürk T, Blumenthal B, Grimm M, Cicko S, Panther E, Sorichter S, Herouy Y, Di Virgilio F, Ferrari D, Norgauer J, Idzko M. (2009). 5-Hydroxytryptamine modulates migration, cytokine and chemokine release and T-cell priming capacity of dendritic cells in vitro and in vivo. *Plos One*, 4:7, e6453.
73. Dupont LL, Bracke KR, De Maeyer JH, Compan V, Joos GF, Lefebvre RA, Brusselle GG. (2014). Investigation of 5-HT₄ receptors in bronchial hyperresponsiveness in cigarette smoke-exposed mice. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 28(1), 60-67.
74. Karol MH. (1994). Animal models of occupational asthma. *European Respiratory Journal*, 7(3), 555-568.
75. Ricciardolo FL, Nijkamp F, De Rose V, Folkerts G. (2008). The guinea pig as an animal model for asthma. *Current Drug Targets*, 9(6), 452-465.
76. Ramos-Ramírez Patricia. (2013). Análisis de la respuesta inmune asociada al proceso inflamatorio de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica en cobayo. México, D.F.: Tesis de Doctorado-UNAM.



Contents lists available at ScienceDirect

Respiratory Physiology & Neurobiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/resphysiol



Allergic sensitization modifies the pulmonary expression of 5-hydroxytryptamine receptors in guinea pigs



Guadalupe Córdoba-Rodríguez^a, Mario H. Vargas^a, Víctor Ruiz^b, Verónica Carbajal^a, Patricia Campos-Bedolla^c, Paulina Mercadillo-Herrera^d, José Luis Arreola-Ramírez^a, Patricia Segura-Medina^{a,*}

^a Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México DF, Mexico

^b Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Investigación en Fibrosis Pulmonar, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México DF, Mexico

^c Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México DF, Mexico

^d Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Ciudad de México, México DF, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 August 2015

Received in revised form

24 November 2015

Accepted 26 November 2015

Available online 1 December 2015

Keywords:

Guinea pig

5-HT receptors

Serotonin receptors

Allergic sensitization

Asthma model

ABSTRACT

There is mounting evidence that 5-hydroxytryptamine (5-HT) plays a role in asthma. However, scarce information exists about the pulmonary expression of 5-HT receptors and its modification after allergic sensitization. In the present work, we explored the expression of 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5A}, 5-HT₆, and 5-HT₇ receptors in lungs from control and sensitized guinea pigs through qPCR and Western blot. In control animals, mRNA from all receptors was detectable in lung homogenates, especially from 5-HT_{2A} and 5-HT₄ receptors. Sensitized animals had decreased mRNA expression of 5-HT_{2A} and 5-HT₄ receptors and increased that of 5-HT₇ receptor. In contrast, they had increased protein expression of 5-HT_{2A} receptor in bronchial epithelium and of 5-HT₄ receptor in lung parenchyma. The degree of airway response to the allergic challenge was inversely correlated with mRNA expression of the 5-HT_{1A} receptor. In summary, our results showed that major 5-HT receptor subtypes are constitutively expressed in the guinea pig lung, and that allergic sensitization modifies the expression of 5-HT_{2A}, 5-HT₄, and 5-HT₇ receptors.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

5-Hydroxytryptamine (5-HT, serotonin) is a neurotransmitter synthesized in the central nervous system, which is involved in numerous physiological responses and behavioral disorders (Filip and Bader, 2009). In non-neural tissues, 5-HT is synthesized, stored, and released mainly by enterochromaffin cells (Gershon and Tack, 2007). The majority of 5-HT released into the blood is captured by and stored in platelets, from which it can be released in any organ (Duerschmied et al., 2013). 5-HT plays a fundamental role in the functioning of the gastrointestinal tract and vascular system, and in the lungs it appears to be involved in chronic inflammatory diseases (Nichols and Nichols, 2008). Nearly all of the 5-HT found in the lung

is released by intravascular platelets, but an additional source of 5-HT can be the neuroendocrine cells/neuroepithelial bodies located in airway epithelia (Cazzola and Matera, 2000; Livermore et al., 2015).

There are seven families of 5-HT receptors (5-HT₁₋₇), comprising 15 receptor subtypes, through which 5-HT exerts its physiological or pathological effects (IUPHAR/BPS, 2015). All 5-HT receptors are metabotropic receptors, i.e., associated with G proteins, except for 5-HT₃, which is a ligand-gated ionotropic receptor. The type of G protein coupled to the 5-HT receptor determines its mode of action. 5-HT₁ and 5-HT₅ receptors are coupled to G_{i/o}, thus inducing diminution of cAMP. 5-HT₂ receptor is coupled to G_{q/11}, thus leading to Ca²⁺ mobilization. Finally, 5-HT₄, 5-HT₆, and 5-HT₇ receptors are coupled to G_s, hence favoring cAMP production.

From the pathophysiological point of view, asthma is characterized by two phenomena, namely increased airway responsiveness and intermittent periods of acute or subacute airway obstruction. Some human and animal studies suggest that 5-HT might play a role in both phenomena. With respect to airway responsiveness, Lechin et al. (1998) found that tianeptine, a drug that lowers plasma 5-

* Corresponding author at: Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Calzada de Tlalpan 4502, CP 14080, México DF, Mexico.

E-mail addresses: psegura@unam.mx, psegura@iner.gob.mx (P. Segura-Medina).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2015.11.018>

1569-9048/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

HT levels, improved pulmonary function in children with asthma. In guinea pigs sensitized to ovalbumin (OA), we found that 5-HT levels in lung homogenates increased 9-fold as compared with non-sensitized animals (Segura et al., 2010). In this same study, we found that 5-HT_{2A}, 5-HT₄, and 5-HT₇ receptors were involved in the development of non-specific, allergen-induced airway hyper-responsiveness.

Regarding the potential involvement of 5-HT in acute or sub-acute airway obstruction, it has been found that during an asthma exacerbation, plasma concentrations of free 5-HT notably increase and correlate with the severity of airway narrowing (Lechin et al., 1996). In another study, a local antigenic challenge in patients with allergic asthma was associated with an increment of 5-HT levels in the bronchoalveolar lavage 24 h later (Durk et al., 2013). Finally, we found that 5-HT was actively released by guinea pig lung during an antigenic challenge, and that this release was related with the degree of the bronchoconstriction (Arreola-Ramírez et al., 2013). Although these last studies suggest that 5-HT may be involved in the development of airway obstruction, there is scant published information about the pulmonary expression of 5-HT receptors, either under healthy conditions or in the presence of allergic sensitization, and on how this expression is related with the degree of allergic airway obstruction. Therefore, in the present study, we used a guinea pig model of allergic asthma to explore the mRNA and protein expression of major 5-HT receptors, and to evaluate to what extent mRNA expression correlates with the degree of acute allergic bronchoconstriction. Taking into account our previous studies, we hypothesized that the same 5-HT receptors found to be involved in airway hyperresponsiveness, i.e., 5-HT_{2A}, 5-HT₄, and 5-HT₇ receptors (Segura et al., 2010), may be also involved in the acute airway obstruction.

2. Materials and methods

Male Hartley guinea pigs bred at our laboratory animal facilities under conventional conditions (conditioned filtered air, 21 ± 1 °C, 50–70% humidity, sterilized bed, and 12/12 h light/dark cycles) were utilized. The experimental group comprised guinea pigs (350–400 g body weight) submitted to the sensitization procedure described in the following section, while the non-sensitized control group comprised healthy guinea pigs exclusively used for the purpose of the present study and weighing 500–650 g, a body weight similar to that of experimental animals at the end of the sensitization procedure. For the analysis of mRNA expression, lung homogenates from 12 control and 12 sensitized guinea pigs were used (each individual lung homogenate served for the analysis of several 5-HT receptors). Regarding protein determination, tissues from 15 control and 12 sensitized animals were employed, taking into account that each Western blot determination required the pooled tissues from three guinea pigs. While both control and sensitized animals provided tissue for qPCR and Western blot analyses, only the latter group was submitted to barometric plethysmography to evaluate the airway response to an antigenic challenge. The protocol was approved by the institutional review boards of the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (approval B17-12) and the Instituto Mexicano del Seguro Social (approval 2010-785-033). The study was conducted following the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institutes of Health, revision 2011.

2.1. Sensitization procedure and barometric plethysmography

At commencement of the sensitization process (day 0), animals received 60 µg OA (cat. A-5253; Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) plus 1 mg aluminum hydroxide as adjuvant, both

dissolved in 1 ml saline and administered in equal proportions by intraperitoneal and subcutaneous routes. On days 7 and 15, booster inhalations of aerosolized OA in saline were administered (3 mg/ml during 5 min, and 1 mg/ml during 60 s, respectively, both delivered at a flow rate of 2 ml/min). Aerosols were generated with an ultrasonic nebulizer (model WH-2000, Guangdong Yuehua Medical Instrument Factory Co., Ltd., Guangdong, China, particle diameter 1–5 µm). These booster stimuli were conducted with the animal placed inside a whole-body, single-chamber, barometric plethysmograph for freely moving animals (Buxco Electronics Inc., Troy, NY, USA). The basis of barometric plethysmography has been comprehensively described elsewhere (Drorbaugh and Fenn, 1955; Hamelmann et al., 1997). In this technique, the equipment records several respiratory parameters in a non-invasive fashion, and from these it calculates a unitless index known as enhanced pause (Penh), which has been shown to be an acceptable surrogate of airway resistance (Vargas et al., 2010). Two 5-min periods of Penh measurements were recorded under baseline conditions and shortly (1 min) after OA inhalation, respectively. In our experience, at day 15 the OA challenge usually causes a 2- to 6-fold increment of the Penh with respect to their baseline value (which typically ranges from 0.22 to 0.32), and this increment is associated with some degree of respiratory distress (thoraco-abdominal dissociation). This airway response (Δ Penh, i.e., post-challenge Penh minus baseline Penh) was considered an indicator of the degree of allergic sensitization. Because the equipment calculates the Penh for each breath, adjustments were made to the software in order to average Penh values from all breaths occurring during 15 s, and then to average these values during the 5-min period. All animals were studied for expression of 5-HT receptors on days 21–24 (at this time period, animals are considered to be fully sensitized, and any potential change caused by antigen exposure at day 15 has subsided). All solutions were prepared on the same day of their use.

2.2. Tissue procurement

On the study day, the guinea pig was deeply anesthetized with intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (35 mg/kg), the chest was opened, and the pulmonary artery was cannulated through the right ventricle. After the left atrium was cut, a low-pressure constant flow of ~18 ml/min saline was delivered to the lungs until intravascular blood was completely drawn. Thereafter, the lungs were obtained and the right cranial lobe was excised, immediately placed into an RNAlater[®] solution (cat. AM7021; Ambion, Austin, Texas, USA) and in less than an hour it was stored at –70 °C until its analysis by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR).

On the other hand, for protein content determination by Western blot, the tracheal epithelium, the tracheal smooth muscle, and the bronchial epithelium were obtained as follow. The whole trachea was excised, opened by a longitudinal cut through the cartilage rings, and fixed with pins in a Petri dish with agar containing Krebs solution (composition [mM]: NaCl 120, NaHCO₃ 25, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, and glucose 11) aerated with oxygen. Under these conditions, the epithelium was obtained by lifting the most superficial membrane with surgical forceps and gently pulling it apart from the trachea. From the remaining tracheal tissue, the smooth muscle was dissected after removing the excessive connective tissue. The bronchial tree was dissected up to the third or fourth bronchi generation by eliminating the surrounding lung parenchyma, and it was subsequently processed as described for the trachea until the epithelium was obtained. Finally, a fragment of lung parenchyma was obtained from the left diaphragmatic lobe. Because the available amount of tracheal and bronchial tissue from each animal was so scant, each Western blot determination was performed in a pool from tissues obtained from three guinea pigs.

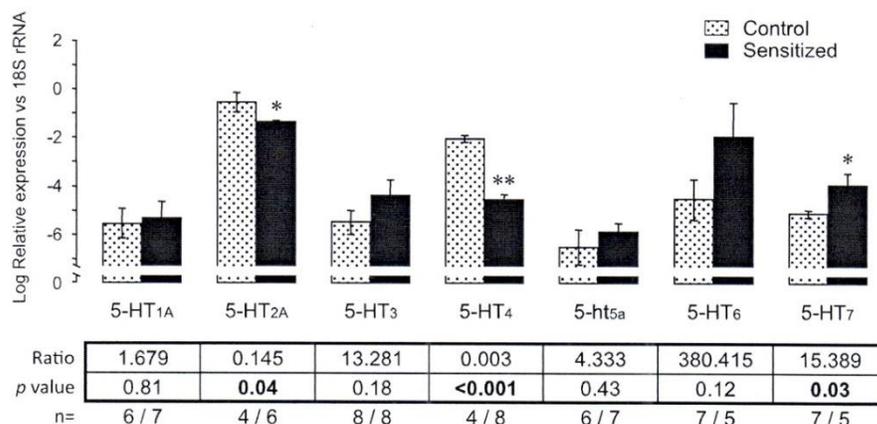


Fig. 1. Relative expression of 5-HT receptors mRNA in lung homogenates from guinea pigs with or without sensitization to ovalbumin. Each bar corresponds to the expression of a 5-HT receptor mRNA in either non-sensitized control (grey bars) or sensitized (closed bars) animals, normalized by the constitutive gene (ribosomal 18S rRNA) and calculated with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (geometric mean \pm standard error). The inset table shows the corresponding normalized expression of 5-HT receptor mRNA (sensitized/control ratio) calculated with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. The number of control and sensitized animals for each group is showed at the bottom of the table (n). The horizontal broken line indicates the baseline level of expression of the constitutive gene (18S rRNA).

In some animals, a sample of brain tissue was obtained to serve as a positive control for Western blotting of 5-HT₇. All of these tissues were placed separately into cryogenic tubes, immediately frozen in liquid nitrogen, and then stored at -70°C until their analysis by Western blot.

2.3. Quantitative PCR

Total RNA was extracted from lung tissue using TRIzol reagent (cat. 10296028; Life Technologies, Grand Island, NY, USA). RNA quality was assessed by resolution on denatured 1% agarose gels and measurement of absorbance ratios at 260/280 nm. Complementary DNA (cDNA) was synthesized using 1 μg of total RNA, 1 μg of DNase, and 1 μl Buffer DNase (cat. EN0523; Fermentas, Waltham, MA, USA). cDNA was reverse transcribed utilizing Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase according to the manufacturer's protocol (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor, cat. 4374966; Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). qPCR amplification was performed in an i-Cycler iQ Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizing cDNA working mixture in a 15- μl reaction volume containing 4 μl cDNA, 2 mM dNTP (cat. 10297-018; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10 μM of specific 5' and 3' primers, 50 mM MgCl₂, 10 \times PCR Buffer, 1.5 U Taq DNA polymerase (cat. 10966-018; Invitrogen), and 500 nM fluorescein (cat. 11636154910; Roche, Indianapolis, IN, USA) and dye SYBR Green I Dye 1 \times (cat. 4707516001, Roche). Pairs of primers for 5-HT receptors were designed in Probefinder (<http://qpcr.probefinder.com/organism.jsp>) (Table 1). Amplification of 18S rRNA was used as internal control gene (cat.4352930E; Applied Biosystems). All qPCR were performed in triplicate. Results were normalized by log-

transforming individual values, and relative expression of the 5-HT receptor, as compared with the expression of the internal control gene (18S rRNA) in the same tissue, was calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula. In addition, the relative expressions of 5-HT receptors in tissues from sensitized guinea pigs were compared with those observed in non-sensitized animals by using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

2.4. Western blot

Tissues from three guinea pigs were pooled to obtain tracheal smooth muscle ($\sim 12\text{ mg}$), tracheal epithelium ($\sim 6\text{ mg}$), bronchial epithelium ($\sim 18\text{ mg}$), and lung parenchyma ($\sim 30\text{ mg}$), which were separately submerged into 500 μl of lysis solution containing 50 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 120 mM NaCl, 0.5% Igepal[®], 1 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF, 0.5% sodium deoxycholate, 10 mg phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and a protease inhibitor cocktail (Set III, cat. 539134; Calbiochem, La Jolla, CA, USA), 1:200 v/v pH 7.4. Tissues were homogenized (Polytron PT 1200 E, Kinematica, Luzern, Switzerland) and then centrifuged at 4°C and 3000 rpm during 5 min. Total protein content was determined in the supernatant using a commercial kit (DC Protein Assay, cat. 500-0116; Bio-Rad). Forty micrograms of this supernatant were loaded into different lanes of a 10% SDS-polyacrylamide gel and subjected to electrophoresis under reducing conditions. Afterward, proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane and blocked with 5% nonfat dry milk in TBS-Tween (Tween 20, 0.1%) during 1.5 h at room temperature. Membranes were incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal antibody raised against 5-HT_{2A} (cat. ab16028; Abcam, Cambridge, MA, USA) 1:200 v/v, 5-HT₄ (cat. ab87337; Abcam) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, or 5-HT₇ (cat. ab13898; Abcam) 1:200 v/v. Finally, membranes were incubated with a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (cat. 12-348; Millipore, CA, USA) 1:1000 v/v during 1 h, at 37°C . Immunoblots were developed employing an enhanced chemiluminescent reactant (Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, cat. 34096; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). 5-HT receptors immunoblots were analyzed by densitometry (Molecular Imaging ChemiDoc XRS; Bio-Rad). α -Actin was blotted as a control for protein load by using a mouse monoclonal antibody

Table 1
Primers sequences for 5-HT receptors used for the qPCR.

Receptor	Primer sense	Primer antisense
5-HT _{1A}	5' CACTCTGTGGGTGCCATAA 3'	5' TGACGGGGTTAGCAGAGAG 3'
5-HT _{2A}	5' CTGCAGGATGATTCCAAGGT 3'	5' AAATGCCACGAAGAACC AA 3'
5-HT ₃	5' CTACCTGGTCATCCGCCGCC 3'	5' CCGGGGGCAGGTAGAAGCCC 3'
5-HT ₄	5' AATAAGATGACCCCTCTGCCTA 3'	5' CATGGGGATAACCCAGCA 3'
5-HT _{5a}	5' CGCATCCAATGTAATGATCG 3'	5' GGGGCCAGAGAGATGACAG 3'
5-HT ₆	5' CTGCCCTTCCTCTGTG 3'	5' TCCAGTAAGTGAAGCAGATCG 3'
5-HT ₇	5' CACAGCGGGTGCCATTTAC 3'	5' GCAGCCTTGTAATCCGGTA 3'

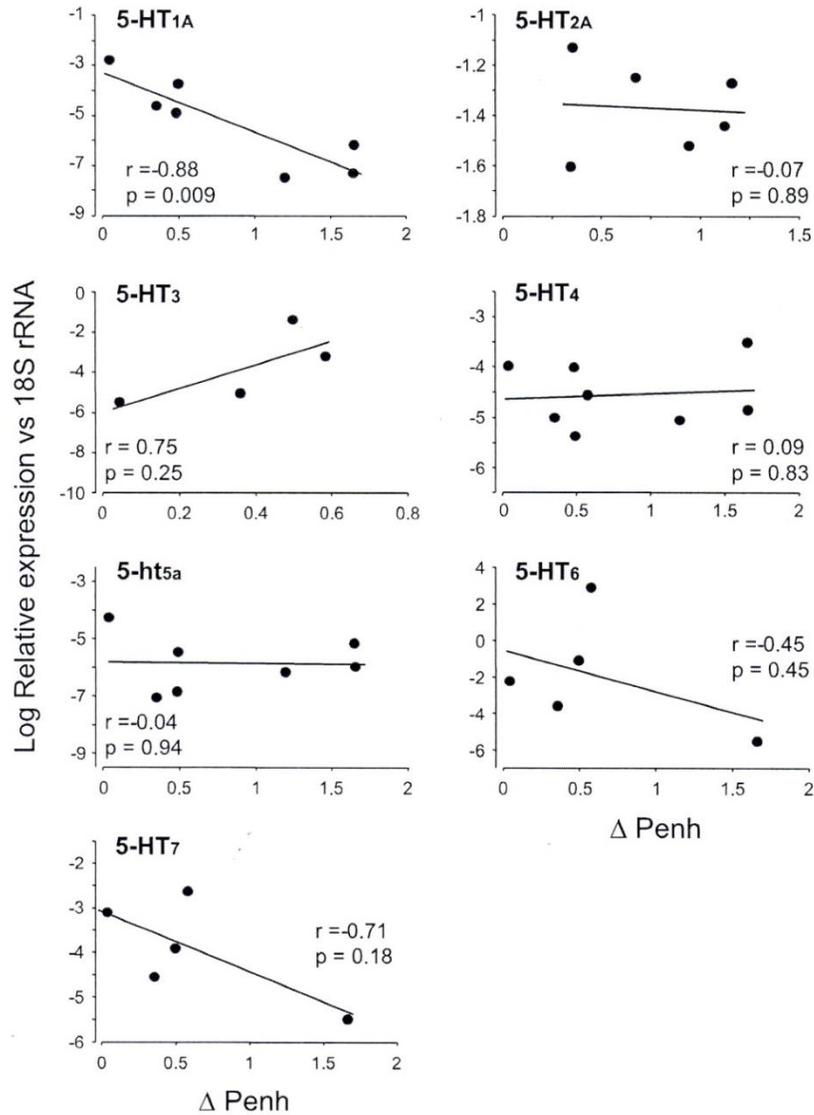


Fig. 2. Relationship between intensity of response to the antigenic challenge at day 15 of sensitization, and level of lung parenchyma expression of 5-HT receptors mRNA at day 21–24 of sensitization. The airway response developed after the inhaled antigen challenge was evaluated by the increase of the enhanced pause index (Penh) through barometric plethysmography.

(cat. A5228; Sigma–Aldrich) 1:1000 v/v. These latter membranes were incubated with a horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG secondary antibody (cat. NA9310V; Amersham, Buckinghamshire, UK) 1:2000 v/v. To determine immunolabeling specificity, negative controls were performed by utilizing the blocking peptides for 5-HT_{2A} (cat. ab161959; Abcam) and 5-HT₄ (cat. ab102731; Abcam) to saturate the primary antibody (2 μg peptide/1 μg antibody). Because blocking peptide for 5-HT₇ was not available, we used guinea pig brain as positive control.

2.5. Statistical analysis

Differences between sensitized and non-sensitized animals regarding mRNA and protein expression levels were evaluated using the unpaired Student's *t*-test. Data in the text and illustrations correspond to mean ± standard error. Statistical significance was set at two-tailed *p* < 0.05.

3. Results

We found that in the baseline state, lung parenchyma from control guinea pigs constitutively expressed mRNA for the majority of

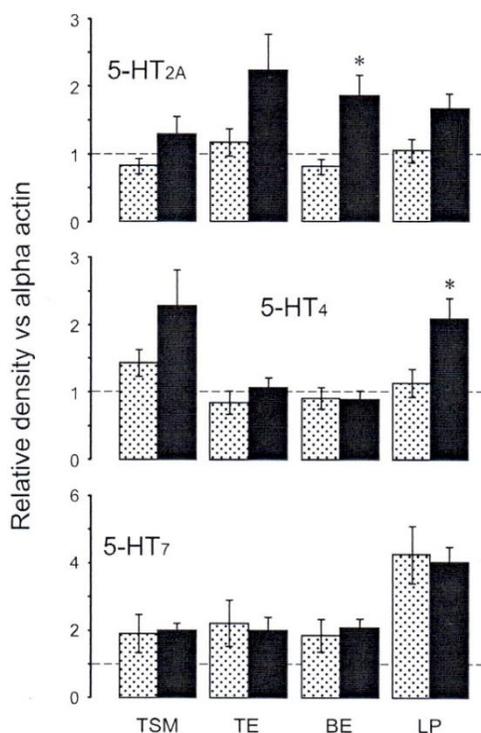


Fig. 3. Protein expression of 5-HT_{2A}, 5-HT₄ and 5-HT₇ receptors, as analyzed by Western blot in lung tissues from guinea pigs with or without sensitization to ovalbumin. All data are expressed as the relative density (5-HT receptor/ α actin densities ratio) in tracheal smooth muscle (TSM), tracheal epithelium (TE), bronchial epithelium (BE) and lung parenchyma (LP) from non-sensitized control (grey bars) or sensitized guinea pigs (closed bars). Bars represent the mean \pm standard error of $n=4-5$ Western blot determinations (each determination was performed in tissues pooled from three animals). Horizontal broken lines indicate the baseline level of expression of the constitutive protein (actin). * $p < 0.05$ vs the non-sensitized group.

5-HT receptors, especially for 5-HT_{2A} and 5-HT₄ receptors (Fig. 1). The full order of relative mRNA expression in healthy lungs was 5-HT_{2A} > 5-HT₄ > 5-HT₇ > 5-HT_{1A} = 5-HT₃ > 5-HT_{5A}. The only 5-HT receptor for which relative mRNA expression was greater in sensitized guinea pigs was 5-HT₇, with an approximately 15-fold higher expression than in non-sensitized animals ($p=0.03$). In contrast, 5-HT_{2A} and 5-HT₄ receptors exhibited lower mRNA expression in sensitized guinea pigs (~14.5% and ~0.3% of the respective mRNA expression in non-sensitized animals; $p=0.04$ and $p < 0.001$, respectively). Finally, 5-HT_{1A}, 5-HT₃, 5-HT_{5A}, and 5-HT₆ mRNA levels in sensitized animals were not statistically different from mRNA levels in control animals.

When the degree of airway response (i.e., Δ Penh) developed after OA inhalation at day 15 of sensitization was plotted against the level of 5-HT receptors mRNA expressed at day 21–24 of sensitization, a statistically significant inverse correlation was observed for the 5-HT_{1A} receptor ($r = -0.88$, $p = 0.009$), i.e., guinea pigs with the greatest response to OA had the lowest mRNA expression of 5-HT_{1A} receptor (Fig. 2).

For those 5-HT receptors that reached statistically significant changes in their lung mRNA levels after sensitization, protein expression was explored by Western blot in different locations, namely tracheal smooth muscle, tracheal and bronchial epithelia, and lung parenchyma homogenate (Fig. 3). We found that pro-

teins of 5-HT_{2A}, 5-HT₄, and 5-HT₇ receptors were constitutively expressed in all of the lung tissues studied, especially 5-HT₇ in lung parenchyma. In general terms, the expression of 5-HT_{2A} receptor protein tended to be greater in sensitized guinea pigs, as compared with non-sensitized animals, although a statistical significant difference was only evident in the bronchial epithelium ($p=0.02$). Expression of 5-HT₄ receptor was higher in tracheal smooth muscle and lung parenchyma homogenates from sensitized guinea pigs, but a statistical significance was only observed in the latter tissue ($p=0.048$). Finally, expression of the 5-HT₇ receptor protein did not change with sensitization in any tissue.

4. Discussion

Asthma remains a rather complex disease in which a large number of mediators appear to be involved in its pathophysiology (Holgate, 2011). Although earlier studies exploring a possible role of 5-HT in asthma were disappointing (So et al., 1985; Tonnesen, 1985), there is now mounting evidence from clinical studies and animal models that this mediator may play a role in some aspects of the disease (Arreola-Ramírez et al., 2013; Durk et al., 2013; Lechin et al., 2004, 1998, 1996; Segura et al., 2010).

In the present study, we found evidence that all major subtypes of 5-HT receptors are expressed in lungs from healthy guinea pigs. To our knowledge, detection of 5-HT receptors in pulmonary tissue from animal species has been poorly described, and this is especially true for the guinea pig. Among these studies, Baez et al. (1994) described that guinea pig and rat tracheas expressed 5-HT_{2A} receptor mRNA, and these authors demonstrated that receptor density coincided with increased contractile responses to 5-HT. Ullmer et al. (1995) explored the expression of 5-HT receptors in several types of blood vessels; with respect to the lung, these authors detected 5-HT_{2A} > 5-HT_{2B} = 5-HT₇ > 5-HT₄ = 5-HT_{1B/D β} mRNA in pig pulmonary artery, 5-HT_{2B} = 5-HT_{1B/D β} = 5-HT₄ mRNA in endothelial cells from human pulmonary artery, and 5-HT_{2A} > 5-HT_{1B/D β} = 5-HT₇ > 5-HT_{2B} mRNA in smooth muscle from human pulmonary artery. Wang et al. (1999) described the expression of the 5-HT_{2C} receptor in type II pneumocytes from rats. More recently, Hofmann et al. (2014) found that both mRNA and protein expression of 5-HT_{2A} receptor increased in lung tissue from a rat model of congenital diaphragmatic hernia, with pulmonary arteries the main site of expression.

In addition to the localization of pulmonary 5-HT receptors, some authors have also analyzed their modification after exposure to a noxious stimulus. In this respect, after describing the baseline expression of 5-HT_{2A} receptor in rat bronchial segments, Cao et al. (2012) found that mRNA and protein expression of this receptor significantly increased after exposure of animals to secondhand cigarette smoke. Likewise, Dupont et al. (2014) described the presence of 5-HT₄ receptor mRNA in mouse lung, and these authors found that such expression notably increased after exposure to tobacco smoke. Murphy et al. (2013) found that mRNA and protein expression of 5-HT_{2A} and 5-HT₄ receptors in the airway epithelium of central and peripheral airways in Rhesus monkeys tended to increase after acute or intermittent exposure to ozone. Finally, Cadirci et al. (2013) detected by immunohistochemistry a low level of expression of 5-HT₇ receptor in the lung interstitium of rats, but such expression was more widely distributed and at a greater level in a rat model of septic shock.

Human studies have found that, compared with healthy control subjects, patients with asthma had increased mRNA expression of 5-HT_{2A} receptor (Ahangari et al., 2015; Sheikhha et al., 2014), as well as of 5-HT_{3A} receptor (Ahangari et al., 2013; Mohammadi Amirabad et al., 2014) in their peripheral blood mononuclear cells.

In agreement with these studies, in the present work we found that the development of pulmonary allergic inflammation was accompanied by changes in relative mRNA expression of pulmonary 5-HT receptors. Thus, the sensitization process significantly decreased 5-HT_{2A} and 5-HT₄ receptors mRNA, while 5-HT₇ receptor mRNA notably increased. In order to better localize the specific tissue where possible changes occurred, we also analyzed the protein expression of these latter receptors by Western blot in airway epithelium, airway smooth muscle and lung parenchyma. To our surprise, although we detected that sensitization modified the protein expression of these receptors, these changes were not fully concordant with changes observed in mRNA expression. Thus, while mRNA levels of 5-HT_{2A} and 5-HT₄ receptors decreased with sensitization, protein expression tended to increase in the majority of lung tissues studied. On the other hand, increased expression of the 5-HT₇ receptor mRNA was not accompanied by detectable changes in protein expression. Although at first glance it may be expected that the level of mRNA expression must correlate with the level of protein synthesis, this appears not to be the rule and studies exploring this issue have found only a minimal or modest correlation (Anderson and Seilhamer, 1997; Greenbaum et al., 2003; Ideker et al., 2001; Nie et al., 2006). Potential explanations for the disagreement between mRNA and protein expression include the existence of complex transcriptional regulatory mechanisms, differences in protein half-lives, and the degree of mRNA stability (Esquerré et al., 2015; Greenbaum et al., 2003; Nie et al., 2006). For example, transcriptional efficiency is enhanced by the action of YTHDF1 in the presence of N⁶-methyladenosine (Wang et al., 2015), and by tRNA regulation of ribosome flux to the mRNA (Gorgoni et al., 2014). Moreover, Esquerré et al. (2015) reviewed some mRNA half-lives datasets for *Escherichia coli*, and they found that the major factor determining mRNA half-life (which ranged from 1 to 53 min) was its own mRNA concentration; hence, the lower the mRNA concentration, the longer the mRNA half-life. In this regard, in our study the higher protein expression of 5-HT_{2A} and 5-HT₄ receptors despite a lower mRNA expression could be due, at least hypothetically, to a longer mRNA half-life and a better chance of being translated into protein. In fact, the occurrence of these types of mechanisms in 5-HT receptors has been demonstrated in some studies, where increased stability and half-life of the 5-HT_{2A} mRNA occurring after a brief stimulation with 5-HT was found in vitro (Ferry et al., 1994; Wohlpert and Molinoff, 1998).

In a previous study, we found that administration of selective antagonists of 5-HT_{2A}, 5-HT₄, and 5-HT₇ receptors to sensitized guinea pigs fully abolished the hyperresponsiveness to acetylcholine usually observed after an antigenic challenge (Segura et al., 2010). This finding implied that these 5-HT receptors were involved in the development of the antigen-induced unspecific airway hyperresponsiveness. In this context, the greater protein expression of 5-HT_{2A} and 5-HT₄ receptors found in the present study is in full agreement with the preeminent role of these receptors in the guinea pig asthma model.

We do not have a clear explanation for the inverse correlation between the degree of sensitization (airway response to the antigen at day 15) and the expression of 5-HT_{1A} receptor mRNA. If this association is indeed a cause-effect relationship, then it may simply reflect that the sensitization process induced downregulation of the mRNA. The alternative possibility, that the 5-HT_{1A} receptor mRNA level determined the degree of sensitization, appears to be less probable. Besides its important role in the central nervous system, 5-HT_{1A} receptor is widely distributed in inflammatory cells such as monocytes/macrophages, mast cells, eosinophils, dendritic cells, and lymphocytes but, in general terms, its activation leads to proinflammatory effects (Arreola et al., 2015). Thus, it would be expected that an enhanced expression of 5-HT_{1A} receptor mRNA, if translated into a greater amount of protein, would be associ-

ated with greater sensitization, which was not the case. A potential limitation of this part of the study was the temporal dissociation between physiological response to the antigen (Δ Penh measured at day 15) and pulmonary expression of 5-HT receptors (measured at days 21–24). Because our aim was to evaluate the expression of 5-HT receptors in a stable state, the lag time with the allergen challenge was necessary to avoid any potential residual effect of this acute allergen exposure on the expression of 5-HT receptors.

Two statistical issues must be acknowledged in our study. First, it has been claimed that any study must perform *p*-value adjustments (such as the Bonferroni correction) according to the number of outcome variables tested (Bland and Altman, 1995). Although this approach is still debated (Perneger, 1998; Rothman, 2014), if it were applied to our mRNA comparisons, the only 5-HT receptor remaining statistically different between sensitized and control animals would be 5-HT₄ receptor, while 5-HT_{2A} and 5-HT₇ would be devoid of statistical significance. Second, we found that mRNA levels of 5-HT_{1A}, 5-HT₃, 5-HT_{5A}, and 5-HT₆ receptors were not different between sensitized and control animals, but the power analysis revealed that statistical tests had relatively low power values (9%, 41%, 21%, and 52%, respectively). Thus, it could not be discarded that the lack of difference for some of these receptors could be explained by a small number of experiments.

In summary, our results showed that major 5-HT receptor subtypes are constitutively expressed in the guinea pig lung, and that allergic sensitization modifies the expression of 5-HT_{2A}, 5-HT₄, and 5-HT₇ receptors.

Conflicts of interests

The authors report no conflicts of interests.

Acknowledgments

Guadalupe Córdoba-Rodríguez was recipient of a Ph.D. scholarship from CONACYT (#296076) and is a doctoral student of the Posgrado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). The authors are grateful to the Fondo de Investigación en Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social for the partial funding of the study (FIS/IMSS/G11/983).

References

- Ahangari, G., Amirabad, L.M., Mozafari, S., Majeidi, A., Deilami, G.D., 2013. Investigation of 5-HT_{3A} receptor gene expression in peripheral blood mononuclear cells of individuals who had been exposed to air pollution. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 12, 433–438.
- Ahangari, G., Koochak, S.E., Amirabad, L.M., Deilami, G.D., 2015. Investigation of 5-HT_{2A} gene expression in PBMCs of patients with allergic asthma. *Inflamm. Allergy Drug Targets*, <http://dx.doi.org/10.2174/1871528114666150803152433> (in press) (PMID 26234928).
- Anderson, L., Seilhamer, J., 1997. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* 18, 533–537.
- Arreola-Ramírez, J.L., Vargas, M.H., Manjarrez-Gutiérrez, G., Alquicira, J., Gutiérrez, J., Córdoba, G., Campos-Bedolla, P., Segura-Medina, P., 2013. Modifications of plasma 5-HT concentrations during the allergic bronchoconstriction in guinea pigs. *Exp. Lung Res.* 39, 269–274.
- Arreola, R., Becerril-Villanueva, E., Cruz-Fuentes, C., Velasco-Velázquez, M.A., Garcés-Alvarez, M.E., Hurtado-Alvarado, G., Quintero-Fabian, S., Pavón, L., 2015. Immunomodulatory effects mediated by serotonin. *J. Immunol. Res.* 2015, 354957.
- Baez, M., Mercurio, L., Schenck, K., Cohen, M.L., 1994. Relationship between 5-HT_{2A} receptor mRNA density and contractility in trachea and aorta from guinea pig and rat. *Life Sci.* 55, PL105–PL114.
- Bland, J.M., Altman, D.G., 1995. Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ* 310, 170.
- Cadirci, E., Halici, Z., Bayir, Y., Albayrak, A., Karakus, E., Polat, B., Unal, D., Atamanalp, S.S., Aksak, S., Gundogdu, C., 2013. Peripheral 5-HT₂ receptors as a new target for prevention of lung injury and mortality in septic rats. *Immunobiology* 218, 1271–1283.

- Cao, L., Zhang, Y., Cao, Y.X., Edvinsson, L., Xu, C.B., 2012. Secondhand smoke exposure causes bronchial hyperreactivity via transcriptionally upregulated endothelin and 5-hydroxytryptamine 2A receptors. *PLoS One* 7, e44170.
- Cazzola, I., Matera, M.G., 2000. 5-HT modifiers as a potential treatment of asthma. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 13–16.
- Drorbaugh, J.E., Fenn, W.O., 1955. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics* 16, 81–87.
- Duerschmied, D., Suidan, G.L., Demers, M., Herr, N., Carbo, C., Brill, A., Cifuni, S.M., Mauler, M., Cicko, S., Bader, M., Idzko, M., Bode, C., Wagner, D.D., 2013. Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood* 121, 1008–1015.
- Dupont, L.L., Bracke, K.R., De Maeyer, J.H., Compan, V., Joos, G.F., Lefebvre, R.A., Brusselle, G.G., 2014. Investigation of 5-HT₁ receptors in bronchial hyperresponsiveness in cigarette smoke-exposed mice. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 28, 60–67.
- Durk, T., Duerschmied, D., Muller, T., Grimm, M., Reuter, S., Vieira, R.P., Ayata, K., Cicko, S., Sorichter, S., Walther, D.J., Virchow, J.C., Taube, C., Idzko, M., 2013. Production of serotonin by tryptophan hydroxylase 1 and release via platelets contribute to allergic airway inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187, 476–485.
- Esquerré, T., Moisan, A., Chiappello, H., Arike, L., Vilu, R., Gaspin, C., Coccagn-Bousquet, M., Girbal, L., 2015. Genome-wide investigation of mRNA lifetime determinants in *Escherichia coli* cells cultured at different growth rates. *BMC Genomics* 16, 275.
- Ferry, R.C., Unsworth, C.D., Artyushyn, R.P., Molinoff, P.B., 1994. Regulation of mRNA encoding 5-HT_{2A} receptors in P11 cells through a post-transcriptional mechanism requiring activation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 269, 31850–31857.
- Filip, M., Bader, M., 2009. Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacol. Rep.* 61, 761–777.
- Gershon, M.D., Tack, J., 2007. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* 132, 397–414.
- Gorgoni, B., Marshall, E., McFarland, M.R., Romano, M.C., Stansfield, I., 2014. Controlling translation elongation efficiency: tRNA regulation of ribosome flux on the mRNA. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 160–165.
- Greenbaum, D., Colangelo, C., Williams, K., Gerstein, M., 2003. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol.* 4, 117.
- Hamelmann, E., Schwarze, J., Takeda, K., Oshiba, A., Larsen, G.L., Irvin, C.G., Gelfand, E.W., 1997. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156, 766–775.
- Hofmann, A.D., Friedmacher, F., Hunziker, M., Takahashi, H., Duess, J.W., Gosemann, J.H., Puri, P., 2014. Upregulation of serotonin-receptor-2a and serotonin transporter expression in the pulmonary vasculature of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J. Pediatr. Surg.* 49, 874–875.
- Holgate, S.T., 2011. Asthma: a simple concept but in reality a complex disease. *Eur. J. Clin. Invest.* 41, 1339–1352.
- Ideker, T., Thorsson, V., Ranish, J.A., Christmas, R., Buhler, J., Eng, J.K., Bumgarner, R., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Hood, L., 2001. Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science* 292, 929–934.
- IUPHAR/BPS, 2015. 5-Hydroxytryptamine receptors. *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology*. International Union of Basic and Clinical Pharmacology/British Pharmacological Society (Accessed on 05.06.15.). <http://www.guidetopharmacology.org>.
- Lechin, F., van der Dijs, B., Lechin, A.E., 2004. Tianeptine: a new exploratory therapy for asthma. *Chest* 125, 348–349.
- Lechin, F., van der Dijs, B., Orozco, B., Jara, H., Rada, I., Lechin, M.E., Lechin, A.E., 1998. Neuropharmacologic treatment of bronchial asthma with the antidepressant tianeptine: a double-blind, crossover placebo-controlled study. *Clin. Pharmacol. Ther.* 64, 223–232.
- Lechin, F., van der Dijs, B., Orozco, B., Lechin, M., Lechin, A.E., 1996. Increased levels of free serotonin in plasma of symptomatic asthmatic patients. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 77, 245–253.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 25, 402–408.
- Livermore, S., Zhou, Y., Pan, J., Yeager, H., Nurse, C.A., Cutz, E., 2015. Pulmonary neuroepithelial bodies are polymodal airway sensors: evidence for CO₂/H⁺ sensing. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 308, L807–815.
- Mohammadi Amirabad, L., Ahangari, G., Derakhshan Deilami, G., 2014. Significant changes of 5-hydroxytryptamine 3A receptor gene expression in peripheral blood mononuclear cells of allergic asthmatic patients. *Iran. J. Allergy Asthma Immunol.* 13, 33–39.
- Murphy, S.R., Schelegle, E.S., Miller, L.A., Hyde, D.M., Van Winkle, L.S., 2013. Ozone exposure alters serotonin and serotonin receptor expression in the developing lung. *Toxicol. Sci.* 134, 168–179.
- Nichols, D.E., Nichols, C.D., 2008. Serotonin receptors. *Chem. Rev.* 108, 1614–1641.
- Nie, L., Wu, G., Zhang, W., 2006. Correlation between mRNA and protein abundance in *Desulfovibrio vulgaris*: a multiple regression to identify sources of variations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 603–610.
- Perneger, T.V., 1998. What's wrong with Bonferroni adjustments. *BMJ* 316, 1236–1238.
- Rothman, K.J., 2014. Six persistent research misconceptions. *J. Gen Intern. Med.* 29, 1060–1064.
- Segura, P., Vargas, M.H., Córdoba-Rodríguez, G., Chávez, J., Arreola, J.L., Campos-Bedolla, P., Ruiz, V., García-Hernández, L.M., Méndez, C., Montaña, L.M., 2010. Role of 5-HT_{2A}, 5-HT₄ and 5-HT₇ receptors in the antigen-induced airway hyperresponsiveness in guinea-pigs. *Clin. Exp. Allergy* 40, 327–338.
- Sheikhha, H., Emadi, S., Jorbozedar, S., Deilami, G.D., Ahangari, G., 2014. Investigation of gene expression pattern of 5HT_{2A} and MAO-A in PBMCs of individuals who had been exposed to air pollution in highly polluted area. *Recent Patents Inflamm. Allergy Drug Discov.* 8, 203–210.
- So, S.Y., Lam, W.K., Kwan, S., 1985. Selective 5-HT₂ receptor blockade in exercise-induced asthma. *Clin. Allergy* 15, 371–376.
- Tonnesen, P., 1985. Bronchial challenge with serotonin in asthmatics. *Allergy* 40, 136–140.
- Ullmer, C., Schmuck, K., Kalkman, H.O., Lubbert, H., 1995. Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Lett.* 370, 215–221.
- Vargas, M.H., Sommer, B., Bazán-Perkins, B., Montaña, L.M., 2010. Airway responsiveness measured by barometric plethysmography in guinea pigs. *Vet. Res. Commun.* 34, 589–596.
- Wang, D., Post, M., Cutz, E., 1999. Expression of serotonin receptor 2c in rat type II pneumocytes. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20, 1175–1180.
- Wang, X., Zhao, B.S., Roundtree, I.A., Lu, Z., Han, D., Ma, H., Weng, X., Chen, K., Shi, H., He, C., 2015. N⁶-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell* 161, 1388–1399.
- Wohlfart, K.L., Molinoff, P.B., 1998. Regulation of levels of 5-HT_{2A} receptor mRNA. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 861, 128–135.