

# Importancia del intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> en la regulación del Ca<sup>2+</sup> intracelular en el músculo liso de las vías aéreas

*Luis Cobar Benard,\* Luis Manuel Montaño Ramírez,‡  
José Erik Cruz Valderrama,‡ Edgar Flores Soto,‡* 

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas;\* Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM‡

Trabajo recibido: 03-III-2010; aceptado: 11-III-2010

**RESUMEN.** El ion Ca<sup>2+</sup> cumple múltiples funciones celulares. En el músculo liso de las vías aéreas participa de forma importante en la contracción. Los estímulos hormonales y neurogénicos generan incrementos en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]i); la fuente para el incremento de Ca<sup>2+</sup> es intracitoplasmática y extracitoplasmática. Para lograr este aumento de la [Ca<sup>2+</sup>]i es necesaria la participación de proteínas membranales y del retículo sarcoplásmico. Dentro de estas proteínas se encuentra el intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX) que se localiza en la membrana plasmática y actúa como un cotransportador de intercambio iónico. Su función principal es sacar un Ca<sup>2+</sup> del citoplasma al espacio extracelular e introducir tres Na<sup>+</sup> del espacio extracelular al citoplasma, sin gasto de ATP, y contribuir así a mantener los niveles basales de [Ca<sup>2+</sup>]i. Sin embargo, cuando diferentes agonistas broncoconstrictores activan canales catiónicos inespecíficos y éstos incrementan las concentraciones intracelulares de Ca<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup>, este último ion activa la llamada fase reversa del NCX (NCX<sub>REV</sub>), invirtiéndose entonces su función, es decir, ahora introduce Ca<sup>2+</sup> y saca Na<sup>+</sup> al espacio extracelular. Este artículo refiere algunos indicios que apuntan a que la inhibición del NCX<sub>REV</sub> tendría relevancia como terapia adyuvante en pacientes asmáticos y muestra, por primera vez, evidencias experimentales de la funcionalidad del NCX<sub>REV</sub> en el músculo liso de las vías aéreas del humano.

**Palabras clave:** Músculo liso de la vía aérea, intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>, KB-R7943, SEA 0400, SN-6.

**ABSTRACT.** Ca<sup>2+</sup> is involved in multiple cellular functions. In airway smooth muscle this ion participates importantly in contraction. Hormonal and neurogenic stimuli generate increment of the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration [Ca<sup>2+</sup>]i; the source of this Ca<sup>2+</sup> increase is both intra- and extra-cytoplasmatic. To achieve this increase of [Ca<sup>2+</sup>]i the participation of multiple membrane and sarcoplasmic proteins is necessary. Among these proteins, Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX) is located at the plasma membrane and acts as a cotransporter of ionic exchange. Its main function is to expulse 1 Ca<sup>2+</sup> from the cytosol to the extracellular space and to introduce 3 Na<sup>+</sup> from extracellular space to cytosol, without spending ATP, thus contributing to the maintenance of the intracellular basal Ca<sup>2+</sup> levels. However, when diverse bronchoconstricting agonists activate membrane unspecific cation channels, and these augment intracellular concentrations of both Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> the latter ion activates the NCX reverse phase (NCX<sub>REV</sub>), i.e., Ca<sup>2+</sup> is now introduced to cytosol and Na<sup>+</sup> is expelled to extracellular space. This article reviews some hints pointing out that inhibition of NCX<sub>REV</sub> might have relevance as adjuvant therapy in asthmatic patients and reports for the first time experimental evidences of the function of the NCX<sub>REV</sub> in the human airway smooth muscle.

**Key words:** Airway smooth muscle, Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger, KB-R7943, SEA 0400, SN-6.

## INTRODUCCIÓN

El calcio (Ca<sup>2+</sup>), es el mensajero intracelular más importante y el catión más prevalente del organismo, es altamente versátil y puede regular diferentes funciones celulares. Los incrementos de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]i) regulan múltiples procesos celulares en un amplio rango de tiempo. Por ejemplo, el aumento de Ca<sup>2+</sup> en microsegundos produce exocitosis en las uniones sinápticas, los incrementos de [Ca<sup>2+</sup>]i por milisegundos originan contracción; y por otro lado, el incremento de calcio por minutos u horas origina eventos

tales como la transcripción, fertilización, proliferación celular y apoptosis.<sup>1</sup>

La actividad contráctil del músculo liso está bajo control neurogénico y hormonal. Sin embargo, el control de la actividad contráctil varía considerablemente en los diferentes tipos de músculos, dependiendo de su función y localización. A pesar de la diversidad en el control de la actividad contráctil, el efecto final es la regulación de [Ca<sup>2+</sup>]i, la cual determina la tensión desarrollada en todos los tipos de músculo liso.<sup>2</sup> En el músculo liso de las vías aéreas (MLVA) los miocitos tienen una [Ca<sup>2+</sup>]i de ~128 nM en estado de reposo;<sup>3,4</sup> aunque, cuando las células son estimuladas por agonistas bronco-

constrictores como la acetilcolina, la serotonina, la histamina, etc., las  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se incrementan ~500-700 nM.<sup>5,6</sup> El incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  genera la formación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, el cual activa a la cinasa de la cadena ligera de la miosina para que fosfore a la serina 19 de la cadena ligera de la miosina de 20 kDa. Esta fosforilación permite que la ATPasa de la miosina sea activada por la actina para llevar a cabo la contracción en el MLVA.<sup>7</sup> Al mismo tiempo, se activa otra vía de señalización, la Rho-Cinasa (ROCK), cuya función es inactivar a la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP). Una disminución  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a niveles basales inactiva ROCK, permitiendo que la MLCP desfosfore a la cadena ligera de la miosina de 20 Kda y el músculo se relaje.<sup>8</sup> Por lo tanto, los mecanismos responsables de mantener las  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en niveles basales juegan un papel primordial en la homeostasis del MLVA.

### MECANISMOS QUE MANTIENEN EL $\text{Ca}^{2+}$ INTRACELULAR EN NIVELES BASALES

Existen al menos tres transportadores responsables de mantener las  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en alrededor de 100 nM: 1) la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de membrana plasmática (PMCA) que funciona transportando  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma hacia el medio extracelular; 2) la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de retículo sarcoplásmico (SERCA) que transporta  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma al interior del retículo sarcoplásmico. Ambas proteínas utilizan ATP como fuente de energía para transportar  $\text{Ca}^{2+}$  en contra del gradiente electroquímico;<sup>9</sup> y 3) el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  en su fase normal (NCX), cuya función principal es sacar  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma al espacio extracelular e introducir  $\text{Na}^+$  del espacio extracelular al citoplasma.<sup>9</sup> Existen también, dentro del citoplasma celular, varias proteínas que son consideradas amortiguadores de  $\text{Ca}^{2+}$  y, a su vez, reservorios del mismo que ayudan a mantener las concentraciones basales de este ion. Dentro de éstas se encuentra la familia de las calmodulinas, anexinas y la calpaína.<sup>10</sup>

Actualmente se considera al NCX como uno de los mecanismos más importantes para la regulación del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en el MLVA, por lo que en esta revisión nos enfocaremos en él.

### MECANISMOS QUE AUMENTAN LA $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Existen dos fuentes de  $\text{Ca}^{2+}$  para aumentar las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y son las siguientes:

1) El retículo sarcoplásmico (RS), es el reservorio más importante de  $\text{Ca}^{2+}$  en el MLVA. En su interior, el  $\text{Ca}^{2+}$  alcanza concentraciones de 5-10 mM,<sup>11</sup> contrastando con los 128 nM del medio citoplasmático. La liberación de este ion se inicia por la activación del receptor de  $\text{IP}_3$  y del receptor de rianodina. El  $\text{IP}_3$  actúa como un segundo

mensajero mediante la unión a su receptor tetramérico situado en la membrana del retículo sarcoplásmico y produce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en este organelo, generando contracción muscular.<sup>12-15</sup> El incremento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  activa al receptor de rianodina para facilitar la apertura de canales iónicos membranales. 2) La otra fuente es el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ) que ingresa al interior de la célula a través de diferentes canales membranales tales como: los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (VDC), los canales regulados por el receptor o canales catiónicos inespecíficos (ROC),<sup>16</sup> y los canales de entrada capacitativa u operados por el retículo sarcoplásmico (SOC).<sup>17,18</sup> Además de estos mecanismos también se encuentra el intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  en su fase reversa ( $\text{NCX}_{\text{REV}}$ ), cuya función es sacar  $\text{Na}^+$  de la célula e introducir  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>18-20</sup>

### INTERCAMBIADOR $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

El NCX es una proteína que se localiza en la membrana plasmática de la mayoría de células del organismo. Su función principal es sacar un  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma al espacio extracelular e introducir tres  $\text{Na}^+$  del espacio extracelular al citoplasma, sin gasto de ATP, utilizando la carga neta positiva del  $\text{Na}^+$ .

Desde los trabajos de Ringer en 1883 y Daly et ál en 1921 es bien conocido que la contracción del músculo cardiaco está directamente relacionada a la concentración de  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  e inversamente asociado con la concentración de  $\text{Na}^+$  extracelular ( $[\text{Na}^+]_e$ ).<sup>21,22</sup> Wilbrandt et ál en 1948 observaron que la contracción del músculo cardiaco estaba asociada a un cociente entre el  $[\text{Ca}^{2+}]_e/[\text{Na}^+]_e$  y propusieron un transportador, donde la disminución del  $\text{Na}^+$  permite la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma en células cardíacas.<sup>23</sup> Las primeras evidencias acerca de la existencia del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  se obtuvieron en la década de los 60 en miocitos cardíacos de cobayos por Reuter et ál.<sup>24</sup> En este contexto, otros investigadores dirigidos por Baker, trabajando en axones de calamares, publicaron el hallazgo sobre el sistema cotransportador o intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ .<sup>25</sup> Posteriormente, Glitsch et ál encontraron en el músculo cardíaco de cobayos que el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de la célula era proporcional a la  $\text{Na}^+$  intracelular ( $[\text{Na}^+]_i$ ), es decir, encontraron una respuesta inotrópica positiva en la aurícula con un incremento intracelular de este ion.<sup>26,27</sup> Desde entonces, este intercambiador ha sido detectado prácticamente en todos los tejidos.<sup>27</sup>

### CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DEL NCX

Desde la década de los 90, el estudio molecular del NCX ha dejado al descubierto información abundante y crucial relacionada con su estructura y función. Hasta

el momento, se han logrado identificar tres isoformas del intercambiador: el NCX1, primera isoforma en ser purificada y clonada en el músculo cardíaco de perros, así como en otros tejidos y tipos celulares; el NCX2 se localiza en estómago; y el NCX3, el cual es producto de genes diferentes, se localiza en el cerebro, músculo esquelético y MLVA.<sup>27-29</sup>

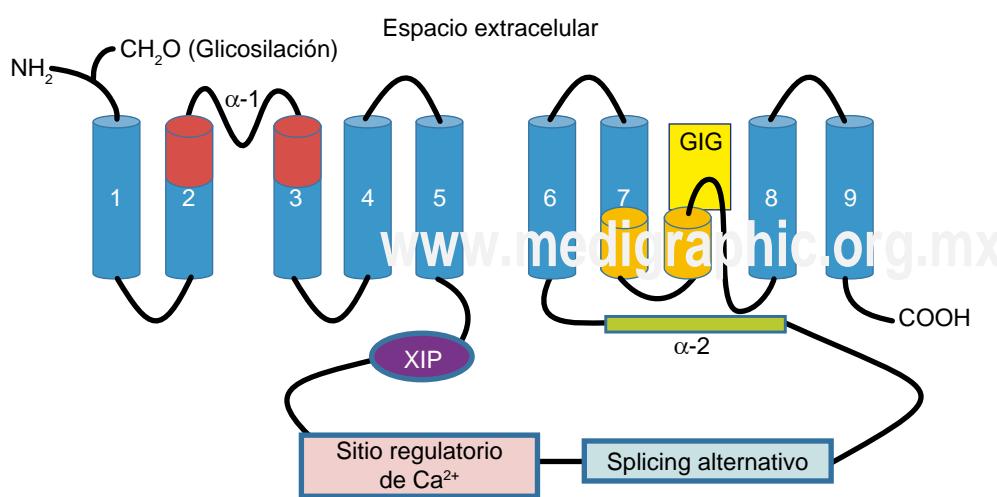
Inicialmente fue sugerido que el NCX tenía 11 segmentos transmembranales. Recién se ha descrito que el intercambiador del músculo cardíaco está formado por 938 aminoácidos constituidos en nueve segmentos transmembranales. Posee una región extracelular NH<sub>2</sub> terminal con 32 aminoácidos, la cual está glicosilada en el noveno aminoácido. El NCX posee dos dominios hidrofóbicos que contienen los fragmentos transmembranales, el dominio NH<sub>2</sub> terminal posee cinco segmentos transmembranales (1-5) y el COOH-terminal está formado por cuatro segmentos (6-9), los cuales están separados por una asa intracelular larga de ~550 aminoácidos (figura 1). Esta asa intracelular contiene importantes sitios regulatorios que no parecen ser requeridos para el transporte iónico, ya que se han realizado mutaciones a la asa intracelular manteniendo el intercambio iónico. Sin embargo, en las porciones NH<sub>2</sub> y COOH terminal del NCX existen dos secuencias repetidas de ~40 aminoácidos denominadas  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2, las cuales se encuentran conservadas en las tres isoformas de NCX, participando de forma muy importante en el transporte iónico. En el NCX la secuencia  $\alpha$ 1 contiene parte de los segmentos 2 y 3 y una asa que los une; la secuencia  $\alpha$ 2 consiste de una porción del segmento transmembranal 7 y la parte del GIG (motivo de glicina-isoleucina-glicina, localizado entre los fragmentos 7 y 8), en el dominio COOH-terminal. En la porción NH<sub>2</sub> terminal, cercano al segmento transmembranal 5 se localiza un dominio de 20 aminoácidos hidrofóbicos y básicos llamado región

XIP (inhibidor del intercambiador del péptido). También existe una zona de *splicing* alternativo (otra forma de la proteína u otra variante de aminoácido de la proteína nativa), la cual se localiza en la asa intracelular, cercano al dominio COOH-terminal.<sup>25,27,30,31</sup>

## REVERSIBILIDAD E INHIBIDORES DEL NCX

Una de las características más importantes del NCX, desde el punto de vista funcional, es su capacidad de actuar en ambas direcciones; el factor principal que determina la dirección hacia la cual actúa es el gradiente electroquímico del Na<sup>+</sup> y la despolarización de la membrana plasmática. El incremento en las concentraciones intracelulares de Na<sup>+</sup>, en la región subplasmalemal (por debajo de la membrana plasmática, cercana al intercambiador), tiene la capacidad de revertir la dirección del NCX, es decir, de hacerlo funcionar en su modo reverso (NCX<sub>REV</sub>), lo cual produciría que el flujo de Ca<sup>2+</sup> se dirija hacia el interior de la célula y el flujo de Na<sup>+</sup> hacia el exterior de la misma. Dicho de otra forma, la dirección final a la cual se moverá el Ca<sup>2+</sup> está determinada principalmente por el gradiente de Na<sup>+</sup>, aunque también depende, en menor medida, del gradiente de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> a través de la membrana plasmática (figura 2).<sup>27,32-34</sup>

En vista de la importancia de la NCX<sub>REV</sub> en la homeostasis del [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, se sintetizaron varios inhibidores de esta fase. Al principio se utilizó la amilorida, que clínicamente es usada como un fármaco antihipertensivo, aunque en México no se utiliza. Por otra parte, este compuesto inhibe varios transportadores dependientes de Na<sup>+</sup> como el NCX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y NCX Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>.<sup>35,36</sup> En los años 90 se desarrolló un inhibidor supuestamente selectivo del NCX<sub>REV</sub>, el KB-R7943 (2-[2-[-4(4-nitrobenziloxi) fenil]-ethyl] isotiurea mesilato). La molécula de KB-R7943 tiene selectividad dependiendo de la isoforma e inhibe al NCX3

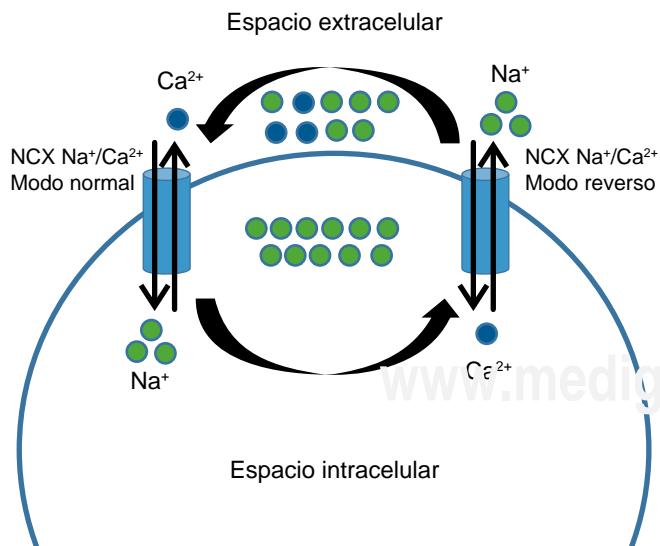


**Figura 1.** Estructura molecular del intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>.

aproximadamente tres veces más que el NCX1 o el NCX2.<sup>37-39</sup> Sin embargo, este compuesto es inespecífico, ya que además de inhibir al  $\text{NCX}_{\text{REV}}$  también se une al transportador de norepinefrina, bloquea al receptor nicotínico de acetilcolina, a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (SOC y VDC),  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ .<sup>40</sup> Recientemente se sintetizó un nuevo inhibidor del  $\text{NCX}_{\text{REV}}$  probado inicialmente en neuronas y miocitos cardiacos, llamado SEA0400 (2-‘4-‘(2,5-difluorofenil)metoxifenoxi-5-etoxianilina), el cual tiene mayor potencia que el KB-R7943, ya que su  $\text{IC}_{50}$  es de 30-40 nM y, a diferencia del KB-R7943 ( $\text{IC}_{50}$  de 5-10  $\mu\text{M}$ ), parece no tener efectos sobre canales o receptores membranales cuando se usa a concentraciones nanomolares.<sup>41,42</sup> Por último, hace cuatro años se desarrolló el SN-6, un inhibidor selectivo del NCX, cuya  $\text{IC}_{50}$  es de 2.9  $\mu\text{M}$ , el cual no es inespecífico, ya que no bloquea a otros tipos de transportadores que involucran al  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  ó  $\text{H}^+$  y en la actualidad está siendo ampliamente utilizado.<sup>43</sup>

### IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DEL NCX EN SU FORMA REVERSA

Por mucho tiempo se han generado múltiples trabajos sobre el NCX; en células excitables como las de músculo liso cardiaco se ha reportado que durante un potencial de acción se incrementan temporalmente las  $[\text{Na}^+]_{\text{i}}$ , revirtiendo la dirección operacional del intercambiador, que resulta en un ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>23</sup> Una vez que la concentración de  $\text{Na}^+$  disminuye en el interior de la célula, el intercambiador revierte su acción y el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  es dirigido hacia el exterior de la célula.<sup>44</sup> En este tejido, el



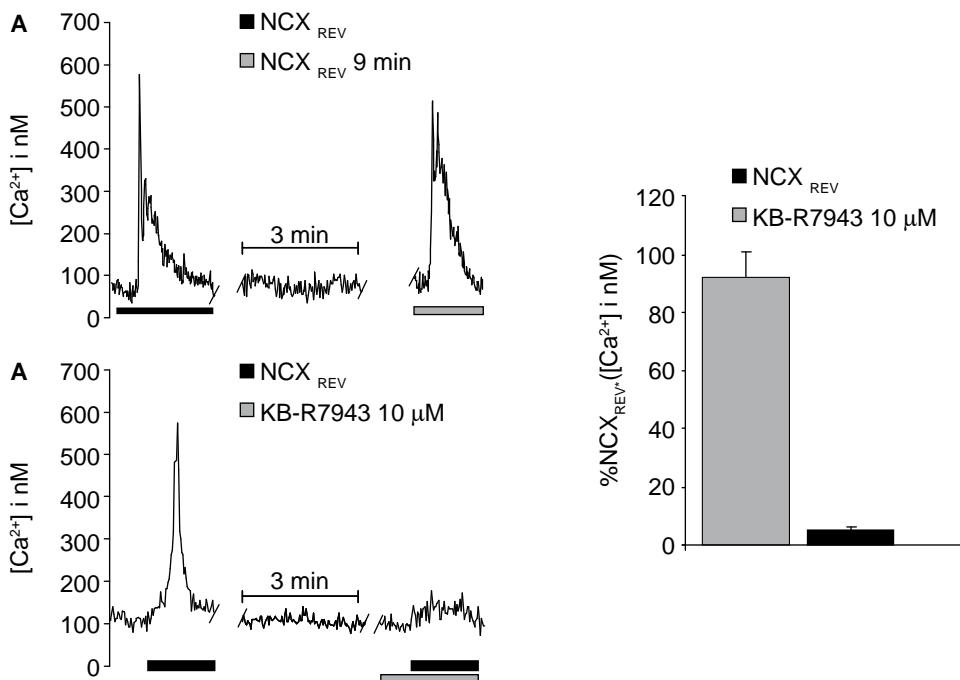
**Figura 2.** Función del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{NCX Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ) en su modo normal y reverso.

incremento de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$  ocurre por la activación de los VDC y el  $\text{NCX}_{\text{REV}}$ . Este incremento de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$  es responsable de activar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS por los canales de RYR, mediante un evento denominado “liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ ”.<sup>39,40</sup> Estos mecanismos parecen ser los responsables en gran medida del acople excitación-contracción en células cardíacas.<sup>45-47</sup>

### MÚSCULO LISO DE LA VÍA AÉREA

Las primeras evidencias experimentales del NCX en el MLVA mostraron resultados contradictorios entre las especies estudiadas. A mediados de los 90, Janssen et ál, reportaron que la participación del NCX no era importante en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en MLVA de canino;<sup>48</sup> al mismo tiempo, Hirsh et ál, obtuvieron resultados que involucraban al NCX en el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  al espacio extracelular y la subsecuente disminución de las  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ , durante la estimulación por un agonista  $\beta_2$ -adrenérgico en MLVA de bovino.<sup>49</sup> Tres años después, Mustafa et ál reportaron que las bajas temperaturas disminuían la función del NCX resultando en incrementos de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$  que originaban broncoconstricción en MLVA de ovejas.<sup>50</sup>

A partir del año 2000 varios autores han reportado directamente la participación del  $\text{NCX}_{\text{REV}}$  como uno de los principales mecanismos responsables en la regulación del  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$  y de la contracción. Hirota et ál encontraron en el MLVA de bovino que la estimulación con diferentes agonistas (acetilcolina, histamina y 5-HT) movilizaba  $\text{Ca}^{2+}$  del RS, proponiendo que el vaciamiento del RS activaba a los canales de SOC, así como a los canales ROC. Ambos mecanismos permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  al citoplasma, este último induce la fase reversa del NCX en MLVA de bovino, permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma para favorecer el llenado del RS.<sup>51,52</sup> Recién, Algara-Suárez et ál también reportaron en el músculo liso de cobayo que la histamina, vía su receptor  $\text{H}_1$ , estimula la producción de  $\text{IP}_3$ , produciendo liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS activando a SOC y ROC favoreciendo el modo reverso del NCX, incrementando los niveles de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ . Asimismo, encontraron que este incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  activaba a las corrientes de cloro dependientes de  $\text{Ca}^{2+}(I_{\text{Cl/Ca}})$  produciendo una despolarización y una apertura en los canales de calcio dependientes de voltaje, postulando que los incrementos de las  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$  a través del  $\text{NCX}_{\text{REV}}$  son importantes para sostener la contracción inducida por la histamina en este tejido.<sup>53</sup> Asimismo, en el músculo liso bronquial de humano se reportó que la acetilcolina induce ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  asincrónicas, donde el  $\text{NCX}_{\text{REV}}$ , los VDC tipo L, la SERCA, los RYR y los canales catiónicos inespecíficos (SOC, ROC), están implicados en la generación de estas ondas y de mantener la contracción tónica.<sup>54</sup>



**Figura 3.** Presencia del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  en su forma reversa ( $\text{NCX}_{\text{REV}}$ ) en el músculo liso traqueobronquial de humano. **A)** Se puede apreciar que la sustitución de  $\text{Na}^+$  por  $\text{LiCl}$  produce un incremento en las  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que corresponde a la activación del  $\text{NCX}_{\text{REV}}$  en células de músculo liso traqueal de humano. Nueve minutos después se puede observar una recuperación de alrededor del 90% de la respuesta inicial ( $\text{NCX}_{\text{REV}} 9 \text{ min}$ ). **B)** Inhibición del  $\text{NCX}_{\text{REV}}$  por KB-R7943 (10  $\mu\text{M}$ ). **C)** Análisis estadístico de la recuperación e inhibición del  $\text{NCX}_{\text{REV}}$  por el KB-R7943,  $n = 5$ .

Nosotros encontramos la presencia del NCX en su forma reversa en células de MLVA de humano. Como se puede apreciar en la figura 3, utilizando un sistema de microfluorometría para medir las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en células aisladas de músculo liso traqueal de humano, la sustitución de  $\text{Na}^+$  por cloruro de litio ( $\text{LiCl}$ ) produjo un incremento transitorio de las  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Este incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por el  $\text{LiCl}$  fue totalmente bloqueado por KB-R7943. En el trabajo previo de Dai et al.<sup>54</sup> en el músculo liso bronquial de humano, estos investigadores no demostraron la presencia de la  $\text{NCX}_{\text{REV}}$  y sólo utilizaron al KB-R7943 para postular la participación de la fase reversa del intercambiador en las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  asincrónicas inducidas por la acetilcolina. Sin embargo, como ya lo mencionamos, este compuesto es muy inespecífico y desafortunadamente no descartaron que a la concentración utilizada de KB-R7943 no tuviera efectos sobre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, los ROC o los SOC. Por lo tanto, la participación de la  $\text{NCX}_{\text{REV}}$  en este fenómeno es cuestionable.

Nuestros resultados demuestran, por primera vez en miocitos humanos la presencia funcional de la  $\text{NCX}_{\text{REV}}$ . Este hecho constituye el primer paso para continuar investigando y poder confirmar si el NCX juega un papel fisiológico importante, como el que desempeña en otros MLVA de otras especies, así como explorar la participación de este intercambiador en la fisiopatología del asma.

## TRATAMIENTO DEL ASMA CON AGONISTAS ADRENÉRGICOS

La Iniciativa Global para el Manejo y Prevención del Asma incluye a los agonistas adrenérgicos  $\beta_2$  como parte del arsenal farmacológico que pueden ser utilizados, tanto como medicamentos de alivio de los síntomas en el asma como de control de los mismos. La estimulación de los receptores adrenérgicos  $\beta_2$  por fármacos como el salbutamol o el formoterol activa la adenilciclasa e incrementa la producción de AMPc, el cual vía la cinasa de proteína A, activa a los canales de  $\text{K}^+$  hiperpolarizando a la membrana, estimula la PMCA, que a su vez disminuye las  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , inhabilita la apertura de los VDC tipo L, el NCX funciona en su forma normal, fosforila al fosfolamban permitiendo la recaptura de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior del RS. Todos estos mecanismos asociados a los agonistas adrenérgicos  $\beta_2$  nos dan como resultado la relajación del MLVA. Si tomamos en cuenta que  $\text{NCX}_{\text{REV}}$  podría estar favoreciendo el incremento en las  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y que este incremento pudiera estar asociado a las crisis de asma y a la hiperreactividad de la vía aérea, resulta importante encontrar una vía alternativa de tratamiento que sirva de complemento enfocado a disminuir la crisis o la hiperreactividad a través del bloqueo de la fase reversa del NCX.

## Agradecimientos

Este manuscrito fue presentado como tesis para obtener la especialidad de médico neumólogo, INER, por el Dr.

Luis Cobar Benard bajo la tutoría de los doctores Luis Manuel Montaño y Edgar Flores Soto. Asimismo, este trabajo fue apoyado a través de los donativos: CONACYT # 81409 y DGAPA-UNAM # IN201810-3 otorgados al Dr. Luis M. Montaño.

## REFERENCIAS

1. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:517-529.
2. Dettbarn C, Györke S, Palade P. Many agonists induce "quantal"  $\text{Ca}^{2+}$  release or adaptive behavior in muscle ryanodine receptors. *Mol Pharmacol* 1994;46: 502-507.
3. Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev* 1996;76:967-1003.
4. Marín J, Encabo A, Briones A, García-Cohen EC, Alonso MJ. Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: calcium pumps. *Life Sci* 1999;64:279-303.
5. Carbajal V, Vargas MH, Flores-Soto E, Martínez-Cordero E, Bazán-Perkins B, Montaño LM. LTD<sub>4</sub> induces hyperresponsiveness to histamine in bovine airway smooth muscle: role of SR-ATPase  $\text{Ca}^{2+}$  pump and tyrosine kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:84-92.
6. Montaño LM, Bazán-Perkins B. Resting calcium influx in airway smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 2005;83:717-723.
7. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 1994;372:231-236.
8. Somlyo AP, Somlyo AV.  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 2003;83:1325-1358.
9. Sieck GC, Kannan MS, Prakash YS. Heterogeneity in dynamic regulation of intracellular calcium in airway smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol* 1997;75:878-888.
10. Clapham DE. Calcium signalling. *Cell* 1995;80:259-268.
11. Edes I, Kranias EG.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases/pumps. In: *Cell Physiology Source Book: Section II Transport physiology, pumps and exchangers*. 2nd ed. New York: Academic press; 1998. p.225-236.
12. Berridge MJ. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993;361: 315-325.
13. Challiss RA, Adams D, Mistry R, Boyle JP. Second messenger and ionic modulation of agonist-stimulated phosphoinositide turnover in airway smooth muscle. *Biochem Soc Trans* 1993;21:1138-1145.
14. Iino M. Calcium-induced calcium release mechanism in guinea pig taenia caeci. *J Gen Physiol* 1989;94:305-321.
15. Iino M. Calcium release mechanisms in smooth muscle. *Jpn J Pharmacol* 1990;54:345-354.
16. Kotlikoff MI. Calcium currents in isolated canine airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1988;254(6 Pt 1):C793-C801.
17. Bazán-Perkins B, Flores-Soto E, Barajas-Lopez C, Montaño LM. Role of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  content in  $\text{Ca}^{2+}$  entry of bovine airway smooth muscle cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003;368:277-283.
18. Janssen LJ, Walters DK, Wattie J. Regulation of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$  in canine airway smooth muscle by  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase and  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange mechanisms. *Am J Physiol* 1997;273(2 Pt 1):L322-L330.
19. Floyd R, Wray S. Calcium transporters and signalling in smooth muscles. *Cell Calcium* 2007;42:467-476.
20. Philipson KD, Nicoll DA. Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annu Rev Physiol* 2000;62:111-133.
21. Ringer S. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the Heart. *J Physiol* 1883;4:29-42.
22. Daly Ide B, Clark AJ. The action of ions upon the frog's heart. *J Physiol* 1921; 54:367-383.
23. Wilbrandt W, Koller H. Die calcium wirkung am froscherzen als funktion des ionengleichgewichts zwischen Zelmembran und umgebung. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 1948;6:208-221.
24. Reuter H, Seitz N. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol* 1968;195:451-460.
25. Baker PF, Blaustein MP, Hodgkin AL, Steinhardt RA. The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. *J Physiol* 1969;200:431-458.
26. Glitsch HG, Reuter H, Scholz H. The effect of the internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea-pig auricles. *J Physiol* 1970; 209:25-43.
27. DiPolo R, Beaugé L. Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions. *Physiol Rev* 2006;86:155-203.
28. Pitt A, Knox AJ. Molecular characterization of the human airway smooth muscle  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15:726-730.
29. Mejía-Elizondo R, Espinosa-Tanguma R, Saavedra-Alanis VM. Molecular identification of the NCX isoform expressed in tracheal smooth muscle of guinea pig. *Ann NY Acad Sci* 2002;976:73-76.
30. Ottolia M, John S, Xie Y, Ren X, Philipson KD. Shedding light on the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger: Ann NY Acad Sci 2007;1099:78-85.
31. Díaz HO. El ion calcio: su regulación y función en la célula  $\beta$  pancreática. *Rev Cubana Endocrinol* 2003;14:1-24.
32. Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 1999;79:763-854.
33. Matsuda T, Takuma K, Baba A.  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger: physiology and pharmacology. *Jpn J Pharmacol* 1997;74:1-20.
34. Watanabe Y, Koide Y, Kimura J. Topics on the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger: pharmacological characterization of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger inhibitors. *J Pharmacol Sci* 2006;102:7-16.
35. Uetani T, Matsubara T, Nomura H, Murohara T, Nakayama S.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent modulation of intracellular  $\text{Mg}^{2+}$  concentration with amiloride and KB-R7943 in pig carotid artery. *J Biol Chem* 2003;278:47491-47497.
36. Kleyman TR, Cragoe EJ Jr. Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J Membr Biol* 1988;105:1-21.
37. Iwamoto T, Watano T, Shigekawa M. A novel isothiourea derivative selectively inhibits the reverse mode of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in cells expressing NCX1. *J Biol Chem* 1996;271:22391-22397.

38. Watano T, Kimura J, Morita T, Nakanishi H. A novel antagonist, No. 7943, of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange current in guinea-pig cardiac ventricular cells. *Br J Pharmacol* 1996;119:555-563.
39. Iwamoto T, Kita S. Development and application of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange inhibitors. *Mol Cell Biochem* 2004;259:157-161.
40. Matsuda T, Arakawa N, Takuma K, et ál. SEA0400, a novel and selective inhibitor of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger, attenuates reperfusion injury in the *in vitro* and *in vivo* cerebral ischemic models. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298:249-256.
41. Tanaka H, Nishimaru K, Aikawa T, Hirayama W, Tanaka Y, Shigenobu K. Effect of SEA0400, a novel inhibitor of sodium-calcium exchanger, on myocardial ionic currents. *Br J Pharmacol* 2002;135:1096-1100.
42. Beaugé L, DiPolo R. SEA-0400, a potent inhibitor of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger, as a tool to study exchanger ionic and metabolic regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288:C1374-C1380.
43. Kita S, Iwamoto T. Inhibitory mechanism of SN-6, a novel benzyloxyphenyl  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange inhibitor. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1099:529-533.
44. Niggli E, Lederer WJ. Molecular operations of the sodium-calcium exchanger revealed by conformation currents. *Nature* 1991;349:621-624.
45. Bers DM. Species differences and the role of sodium-calcium exchange in cardiac muscle relaxation. *Ann N Y Acad Sci* 1991;639:375-385.
46. Fabiato A. Stimulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol* 1985;85:291-320.
47. Lederer WJ, Cannell MB, Cohen NM, Berlin JR. Excitation-contraction coupling in heart muscle. *Mol Cell Biochem* 1989;89:115-119.
48. Janssen LJ, Walters DK, Wattie J. Regulation of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in canine airway smooth muscle by  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange mechanisms. *Am J Physiol* 1997;273:L322-L330.
49. Hirsh AJ, Benishin CG, Jones RL, Pang PK, Man SF. Calcium mobilization and isometric tension in bovine tracheal smooth muscle: effects of salbutamol and histamine. *Cell Calcium* 1996;19:73-81.
50. Mustafa SM, Pilcher CW, Williams KI. Cooling-induced bronchoconstriction: the role of ion-pumps and ion-carrier systems. *Pharmacol Res* 1999;39:125-36.
51. Hirota S, Pertens E, Janssen LJ. The reverse mode of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger provides a source of  $\text{Ca}^{2+}$  for store refilling following agonist-induced  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292:L438-L447.
52. Hirota S, Janssen LJ. Store-refilling involves both L-type calcium channels and reverse-mode sodium-calcium exchange in airway smooth muscle. *Eur Respir J* 2007;30:269-278.
53. Algara-Suárez P, Romero-Méndez C, Chrones T, et ál. Functional coupling between the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger and nonselective cation channels during histamine stimulation in guinea pig tracheal smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:L191-L198.
54. Dai JM, Kuo KH, Leo JM, Paré PD, van Breemen C, Lee CH. Acetylcholine-induced asynchronous calcium waves in intact human bronchial muscle bundle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;36:600-608.

**✉ Correspondencia:**

Dr. Edgar Flores Soto.  
Departamento de Farmacología,  
Facultad de Medicina. UNAM,  
Ciudad Universitaria. México, D.F., 04360  
Correo electrónico: edgar\_flores.s@hotmail.com  
*Los autores declaran no tener conflicto de intereses*