



ESTUDIO DE LA CONTRACTILIDAD DIAFRAGMÁTICA EN UN MODELO DE ASMA EXPERIMENTAL. EFECTOS DE LAS METILXANTINAS

A. de Diego*, J. Orón, M. Perpiñà*, J.L. Ortiz, J. Cortijo y E. Morcillo

Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina y * Servicio de Neumología. Hospital La Fe. Valencia.

El objetivo del presente trabajo ha sido investigar las alteraciones producidas en la contractilidad muscular de tiras de diafragma procedentes de cobayos sensibilizados (CS) activamente con albúmina sérica bovina y su modificación tras el tratamiento con teofilina (TE) y cafeína (CA).

La respuesta contráctil obtenida fue significativamente mayor en las tiras procedentes de CS (122 ± 13 mg F) que en las de cobayos normales (CN) (84 ± 7 mg F). Esta respuesta no se vio modificada en ninguno de los dos preparados por la presencia de verapamil y se redujo de forma similar en ambos (72 % y 73 %) cuando utilizamos dantroleno sódico. En ausencia de Ca^{2+} libre extracelular, la contractilidad diafragmática disminuyó un 44 % en los CS frente a un 19 % en los CN.

El tratamiento con TE produjo aumentos similares de la fuerza contráctil en CN (65 ± 10 %) y CS (71 ± 13 %) mientras que fue significativamente mayor en las tiras de CS (145 ± 22 vs 105 ± 13) tratadas con CA. Estas respuestas únicamente disminuyeron en los CS en ausencia de Ca^{2+} extracelular.

Concluimos: 1) el modelo de sensibilización utilizado produce una hiperreactividad del diafragma, dependiente en parte del Ca^{2+} extracelular; 2) la sensibilización aumenta el efecto de CA pero no de TE sobre la contractilidad diafragmática; y 3) el aumento de contractilidad inducido por TE y CA, presenta una mayor dependencia del Ca^{2+} extracelular en los preparados sensibilizados.

Arch Bronconeumol 1991; 27:249-253

Introducción

La hiperreactividad bronquial inespecífica es uno de los hechos más característicos de los pacientes con asma¹, y el estudio de su patogenia constituye hoy uno de los apartados que mayor atención despierta entre los investigadores interesados en esta enfermedad. El análisis de la morfología de las curvas dosis-respuesta que se obtienen tanto *in vitro*, en los preparados de

El presente trabajo de investigación ha sido financiado con fondos procedentes de la beca de ayuda a la investigación SEPAR-Abelló convocatoria del año 1987 y el proyecto 88/1950 del FIS/SS

Recibido el 27-8-1990 y aceptado el 13-11-90.

Study of diaphragmatic contractility in a model of experimental asthma. Effects of methylxanthines

The aim of this study was to investigate contractile alterations in diaphragmatic muscular strips of guinea pigs actively sensitized with bovine serum albumin and the response of such preparations to treatment with theophylline and caffeine. Contractile response was significantly greater in strips from sensitized guinea pigs (122 ± 13 mg F) than in those from normal animals (84 ± 7 mg F). Contractile response was not modified by verapamil in either of the two groups of guinea pigs but it decreased in a comparable degree in both groups of preparations when exposed to sodium dantrolene. In absence of extracellular free Ca^{++} , diaphragmatic contractility decreased by 44 % in sensitized animal and by 19 % in controls. Treatment with theophylline induced similar contractile increases in controls (65 ± 10 %) and sensitized animal (71 ± 13 %), whereas treatment with caffeine evoked greater contractile response in sensitized guinea pigs than in controls (145 ± 22 vs 105 ± 13). These responses decreased only in sensitized animal in absence of extracellular Ca^{++} .

We conclude: 1) the present model of sensitization produces a diaphragmatic hyperreactivity which depends in part on extracellular Ca^{++} ; 2) sensitization enhances the effect of caffeine but not theophylline on diaphragmatic contractility; and 3) the increase in contractility induced by theophylline and caffeine has a greater dependence on extracellular Ca^{++} in sensitized preparations.

músculo liso de animales sometidos a diversos modelos de asma experimental, como *in vivo*, en el individuo asmático tras la exposición a metacolina o histamina, ha puesto de manifiesto que existe, al menos en parte, un fenómeno de hipersensibilidad postjuncional². Este tipo de hipersensibilidad sugiere la existencia de alteraciones celulares producidas en un nivel posterior a la interacción del fármaco agonista con su receptor³.

Uno de los supuestos más atrayentes para explicar este mecanismo productor de hiperreactividad, lo constituye la *hipótesis del calcio*, descrita inicialmente por Middleton⁴ y desarrollada posteriormente por diversos grupos de trabajo en modelos animales de



asma alérgico⁵⁻⁷. Según esta hipótesis, la sensibilización condiciona una mayor biodisponibilidad del calcio (Ca^{2+}) libre intracelular, que en definitiva sería el responsable último del aumento de la contractilidad⁸.

Sin embargo, la existencia de una hiperreactividad inespecífica en el árbol bronquial no implica que las modificaciones inducidas por la sensibilización queden limitadas únicamente al músculo liso de la vía aérea, de ahí que su estudio en otros sistemas también involucrados en las enfermedades pulmonares, como son los músculos respiratorios y especialmente el diafragma, constituya un objetivo de indudable interés.

Por otro lado, al estudiar los efectos de las metilxantinas en la mecánica pulmonar, algunos autores⁹ sugieren que el efecto broncodilatador puede no estar relacionado con la acción directa del fármaco en el músculo liso de la vía aérea mientras que otros¹⁰ establecen que su efecto clínico beneficioso se debe a su acción inotrópica positiva sobre los músculos respiratorios. En este sentido, en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio¹¹ hemos visto que estas sustancias potencian la contractilidad diafragmática al aumentar la biodisponibilidad del Ca^{2+} intracelular. Sin embargo, es un hecho aún desconocido la forma en que la sensibilización pueda también afectar la respuesta obtenida con las metilxantinas.

Así pues, el objetivo del presente trabajo ha sido estudiar las alteraciones producidas por la sensibilización en la contractilidad del músculo diafragmático de cobayo y en el caso de que éstas existieran, analizar si se modifican tras el tratamiento con las metilxantinas.

Material y métodos

Se utilizaron 48 cobayos adultos de ambos sexos, con un peso medio de 350-400 g, distribuidos aleatoriamente en dos grupos: control (24) y sensibilizado (24). El proceso de sensibilización se realizó de la siguiente forma: el primer día se inyectaron por vía subcutánea coadyuvante completo de Freund (0,25 ml) y albúmina sérica bovina (ASB) (1,25 µg/g de peso, disuelta en 0,25 ml de suero fisiológico); los días tercero y quinto se administraron, vía intramuscular, las mismas cantidades de coadyuvante completo y ASB. El grupo control se sometió al mismo protocolo pero únicamente se empleó en el pretratamiento suero fisiológico.

Transcurridos de 21 a 25 días, los animales fueron sacrificados mediante un golpe en la región retrocervical y desangramiento rápido posterior y el diafragma, cuidadosamente disecado a partir de sus inserciones costales, lumbares y xifoideas, se depositó en una placa de Petri con solución nutritiva de Krebs-Henseleit (CINa: 137 mM, ClK: 4 mM, ClMg: 1 mM, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$: 1 mM, CO_3HNa : 12 mM, Cl_2Ca : 2 mM, glucosa: 6.5 mM), burbujeada con carbógeno (95 % O_2 y 5 % CO_2) y mantenida a temperatura ambiente (20°-21° C) y pH de 7,4-7,6.

Inmediatamente después, y mediante el empleo de una lupa binocular, se obtuvieron tiras de diafragma costal de aproximadamente 0,5 mm de grosor y 1,5 cm de longitud. Estas tiras se colocaron en el interior de una copa de baño de órganos, aforada en 10 ml de solución nutritiva, mantenida a 37° C y burbujeada continuamente con carbógeno, donde quedaron sujetas por un extremo distal a un punto fijo (gancho terminal del electrodo) y por otro, a un transductor isométrico tipo Hewlett-Packard FTA 100-1, provisto de un tornillo micrométrico de precisión FTA 1011. El transductor se conectó a un registrador modular bicanal Phillips PM-8222, a través de un amplificador Hewlett-Packard 8805B.

La tensión óptima inicial, calculada previamente, fue de 500 mgr. Tras un período de estabilización de 30-60 min, la longitud del

preparado fue ajustada nuevamente a la longitud a la cual la respuesta contráctil fue máxima.

Para la producción del estímulo contráctil, se utilizó la estimulación eléctrica de campo empleando dos electrodos de acero inoxidable en forma de anillo, montados sobre una superficie aislante de la varilla metálica y dirigidos perpendicularmente a los dos extremos de la tira de diafragma; en todo momento se procuró que no existiera contacto alguno entre el reactivo biológico y los electrodos. Mediante un estimulador Grass S-88, se aplicaron estímulos simples rectangulares, tres por minuto, de 0,2 ms de duración y frecuencia de 1 Hz, siguiendo el modelo descrito por Viires et al¹². La preparación se sometió a incrementos sucesivos de intensidad de corriente hasta alcanzar el adecuado valor supramaximal en la correlación intensidad-fuerza.

Aproximadamente 30 min después de conseguir un registro basal estable, se procedió a la realización de los siguientes protocolos experimentales, tanto en los reactivos procedentes de cobayos normales como sensibilizados:

A. Estudio de la respuesta contráctil en ausencia y presencia de: 1) fármacos que actúan bloqueando la transmisión neuromuscular como son: neostigmina (10^{-5} M), pancuronio (10^{-4} M) y tetrodotoxina (TTX) (10^{-6} gr/ml); 2) antagonistas del Ca^{2+} extracelular como verapamil (VP) (10^{-5} M); y 3) dantroleno sódico (DS) (5×10^{-6} M), fármaco inhibidor de la liberación del Ca^{2+} intracelular unido a la membrana del túbulo T.

B. Curvas dosis-respuesta acumulativas a teofilina y cafeína (5×10^{-5} a 5×10^{-4} M) en ausencia y presencia de VP (10^{-5} M) (tiempo medio de incubación: 20 min)

C. Curvas dosis-respuesta acumulativas a teofilina y cafeína tras un período de 15 min en solución libre de Ca^{2+} .

En las experiencias exentas de Ca^{2+} , se eliminó del líquido nutricio el Cl_2Ca , siendo sustituido de forma equimolar con ClK 55 mM y agregándose además como quelante ácido tetraetilenglicol (EGTA) en una concentración 0,1 mM.

Con el fin de comprobar el proceso de sensibilización se realizaron una serie de experimentos adicionales utilizando, en este caso, como reactivos farmacológicos, anillos traqueales procedentes de los mismos cobayos, tanto normales como sensibilizados, que fueron preparados siguiendo la técnica descrita previamente por Foster et al.¹³ La adición al baño de una solución de ASB (1 mg/ml), produjo unas contracciones directas de 164 ± 44 mgF/mg peso de los preparados procedentes de cobayos sensibilizados mientras que no se obtuvieron respuestas tras el estímulo antigénico en los anillos traqueales obtenidos de cobayos normales.

Las curvas dosis-respuesta obtenidas, se cuantificaron expresando la fuerza de contracción (*twitch tension*) en mg de fuerza (mg F) o en porcentajes sobre la contracción basal; y la dosis, como logaritmo de la unidad molar. Asimismo, se determinaron los efectos máximos alcanzados (E_{max}) y las correspondientes concentraciones del agonista que produjeron un 50 % del efecto máximo y que se expresaron como el logaritmo negativo de la concentración eficaz 50 % (pD_2).

El tratamiento estadístico de los resultados se realizó aplicando la prueba χ^2 para comparación de proporciones en muestras independientes y la t de Student para muestras apareadas o no apareadas según los casos. El nivel de significación fue establecido en 0,05. Todos los resultados se expresan como $X \pm \text{EEM}$.

Los productos utilizados fueron: cafeína y teofilina, bases anhidridas (Sigma Chemical Company); clorhidrato de verapamil (Knoll Industria); dantroleno sódico (Alonga Lab. Lafarquin S.A.); bromuro de pancuronio (Organon Española SA); sulfato de neostigmina (Roche SA); albúmina sérica bovina (Sigma Chemical Company) y coadyuvante completo de Freund (Difco).

Resultados

1) Efectos producidos por el proceso de sensibilización en la contractilidad diafragmática.

La respuesta contráctil inducida por la estimulación eléctrica fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en las tiras de diafragma procedentes de cobayos sensibilizados que en las obtenidas de cobayos control (122 ± 13 mg F y 84 ± 7 mg F, respectivamente); en ningún caso, estos valores se vieron modificados por la presencia de neostigmina, pancuronio o TTX.

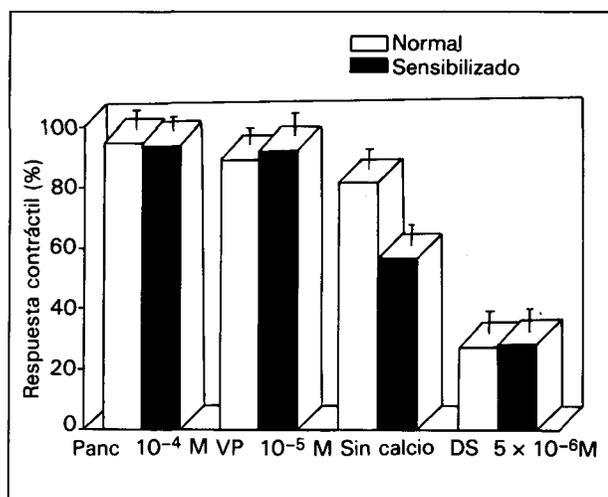


Fig. 1. Efectos de pancuronio (Panc 10^{-5} M), verapamil (VP 10^{-5} M), solución libre de Ca^{2+} (sin calcio) o dantroleno sódico (DS 5×10^{-6} M) sobre la contractilidad diafragmática de cobayos normales y sensibilizados (* $p < 0,05$).

La adición al baño de órganos de VP (10^{-5} M) no ocasionó modificaciones en ninguno de los dos tipos de preparados (control y sensibilizado) mientras que la incubación con dantroleno sódico (5×10^{-6} M) produjo inhibiciones significativas tanto en los reactivos de cobayos control ($73 \pm 3\%$) como en los sensibilizados ($72 \pm 6\%$). Sin embargo, en ausencia de Ca^{2+} extracelular la contractilidad diafragmática disminuyó de forma más significativa en las tiras de cobayos sensibilizados ($44 \pm 4\%$) que en las de controles ($19 \pm 3\%$) ($p < 0,05$) (fig. 1).

2) Estudio del efecto contráctil de las metilxantinas en los modelos sensibilizados.

La adición al baño de dosis crecientes de teofilina, aumentó de forma similar las respuestas contráctiles evocadas por la estimulación eléctrica en las tiras de diafragma de cobayos control ($65 \pm 10\%$) y sensibilizados ($71 \pm 13\%$). Por el contrario, los incrementos producidos por cafeína fueron mayores en las tiras de cobayos sensibilizados ($145 \pm 22\%$) que en las obte-

nidas de cobayos control ($105 \pm 13\%$) ($p < 0,05$) (fig. 2). Estos resultados no se vieron modificados por la presencia de VP (10^{-5} M) mientras que sí que disminuyeron de manera significativa en los cobayos sensibilizados, tanto para cafeína como para teofilina, cuando éstos se obtuvieron en ausencia de Ca^{2+} extracelular (tabla I).

Discusión

Los resultados obtenidos en la primera parte del presente trabajo, muestran la existencia de una hiperreactividad del músculo diafragma en cobayos activamente sensibilizados con ASB. Este hecho confirma nuestro supuesto inicial según el cual la sensibilización podría ocasionar una mayor capacidad de respuesta a estímulos contracturantes, no sólo en el músculo liso traqueal¹⁴ o en tiras de parénquima pulmonar¹⁵ sino también en otros sistemas, *vgr* los músculos estriados respiratorios.

Ciertamente, la aparición en el asma de hiperrespuestas más allá del territorio pulmonar ya había sido recogido con anterioridad por otros investigadores que observaron, en pacientes con asma atópico, un aumento de la respuesta pupilar y vascular cutánea frente a estímulos α -adrenérgicos¹⁶. Para estos autores, estas alteraciones indicarían la existencia de un desequilibrio en el sistema nervioso autónomo con una mayor expresión de los sistemas estimuladores (constrictores) en detrimento de los inhibidores (dilataadores). Más recientemente, Palewsky et al¹⁷ han demostrado un aumento en la actividad del nervio frénico tras la broncoprovocación, en perros sensibilizados con antígeno de *Ascaris suum*. Sin embargo, que nosotros sepamos, no existen hasta la fecha estudios referenciados en la literatura sobre modificaciones en el propio músculo estriado de animales sensibilizados.

En nuestra opinión, los hallazgos aquí obtenidos no pueden ser atribuidos a un desequilibrio en el sistema nervioso autónomo, ya que las fibras musculares estriadas carecen de este tipo de inervación. Tampoco creemos que estén ocasionadas por aumentos en la

TABLA I
Incrementos de la fuerza contráctil diafragmática en cobayos normales y sensibilizados tras el tratamiento con teofilina y cafeína. Modificación por verapamil o solución sin Ca^{2+}

	N	Normal		Sensibilizado	
		E max (%)	pD ₂	E max (%)	pD ₂
Cafeína					
Control	12	106 ± 14	3,73 ± 0,05	145 ± 22*	3,63 ± 0,02*
VP 10 ⁻⁵	6	106 ± 20	3,74 ± 0,06	144 ± 14	3,69 ± 0,07
Sin calcio	6	134 ± 9	3,73 ± 0,05	117 ± 22*	3,51 ± 0,02*
Teofilina					
Control	12	65 ± 10	3,65 ± 0,02	71 ± 13	3,70 ± 0,03
VP 10 ⁻⁵ M	6	78 ± 4	3,64 ± 0,03	79 ± 6	3,61 ± 0,04
Sin calcio	6	54 ± 16	3,67 ± 0,11	40 ± 8*	3,50 ± 0,01*

E. max: efecto máximo, expresado en porcentaje de incremento sobre su valor basal; pD₂: logaritmo negativo de la concentración eficaz 50% del agonista en mol/L; N: número de experiencias; VP: verapamil.
* $p < 0,05$ entre normal y sensibilizado.

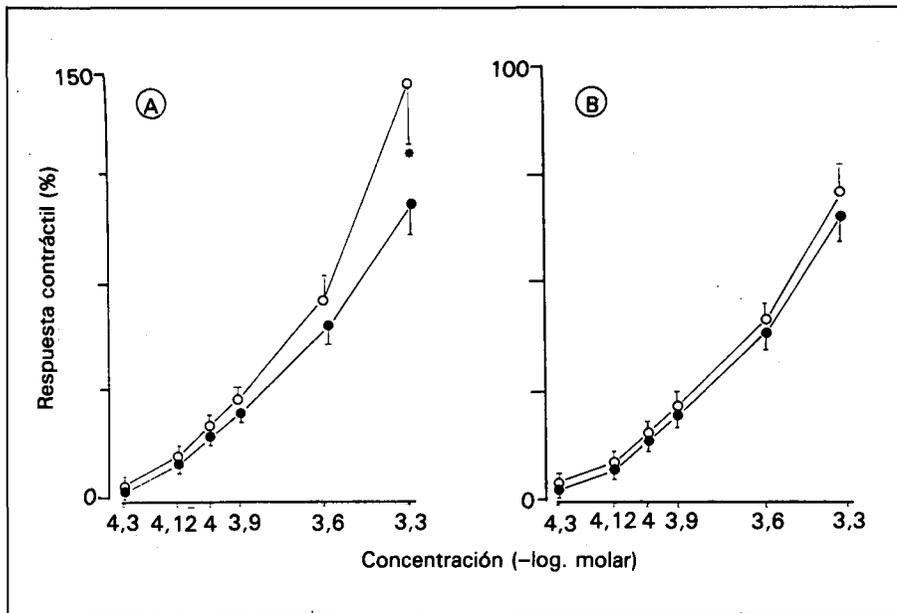
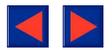


Fig. 2. Curvas dosis-respuesta acumulativas de cafeína (A) y teofilina (B) obtenidas en diafragmas de cobayos normales (●) y sensibilizados (○) (* p < 0,05).

transmisión nerviosa, puesto que estas hiperrespuestas no se modificaron por la presencia de neostigmina, pancuronio o TTX, fármacos que como ya se indicó bloquean la conducción neuromuscular. Todo ello, nos hace pensar que el aumento de contractilidad observada sea debido a alteraciones producidas en las propias fibras del músculo diafragma. La cuestión a resolver sería entonces ¿a qué nivel, dentro de las fibras, se localizan estas alteraciones?

En trabajos previos¹¹, hemos podido comprobar como, la contracción producida por estimulación eléctrica sobre el diafragma de cobayos no sensibilizados no se ve modificada por la ausencia de Ca^{2+} extracelular ni por verapamil, mientras que sí que disminuye en presencia de dantroleno sódico; esto nos sugiere que, en el diafragma y en condiciones normales, el estímulo eléctrico actúa sobre el Ca^{2+} unido a la membrana interna del túbulo T, el cual, a su vez, ejerce de elemento liberador del Ca^{2+} unido al retículo sarcoplásmico. El hecho de que, al menos en nuestras condiciones experimentales, los incrementos de la contractilidad obtenidos en los preparados procedentes de cobayos sensibilizados no se modifiquen por verapamil y sí por la ausencia de Ca^{2+} extracelular, hace pensar que la sensibilización produce un aumento en la permeabilidad del sarcolema para los iones de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} no voltaje-operados.

Para nosotros, esta mayor permeabilidad del Ca^{2+} , originaría un incremento en la cantidad de ión almacenado en el retículo sarcoplásmico a expensas de una disminución del Ca^{2+} unido a la superficie interna del túbulo T. Ello justificaría, por un lado, el aumento de contractilidad observado en los cobayos sensibilizados, y por otro, la mayor disminución en ausencia de Ca^{2+} libre en el medio así como la similar efectividad del dantroleno en ambos preparados.

En la segunda parte del estudio, correspondiente al efecto de las metilxantinas sobre los preparados sensibilizados, pudimos observar que el tratamiento con teofilina produjo un aumento de la contractilidad similar al obtenido en cobayos normales, mientras que la cafeína se mostró más efectiva en los animales sensibilizados.

La mayor potencia y eficacia observada para la cafeína, no guarda relación con un aumento en la afinidad por unos posibles receptores, sino más bien es la consecuencia biológica de una mayor capacidad de penetración celular de esta sustancia y, por tanto, de actuación sobre los mecanismos celulares Ca^{2+} dependientes¹⁷.

Aunque el mecanismo exacto por el que las metilxantinas incrementan la contractilidad diafragmática sigue siendo aún tema de controversia, la mayoría de los estudios parecen indicar que su efecto ionotrópico positivo se produce al favorecer la liberación del Ca^{2+} unido al retículo sarcoplásmico¹⁹, a través de un mecanismo no dependiente del Ca^{2+} extracelular²⁰. La disminución de efectividad observada para teofilina y cafeína en presencia de una solución libre de Ca^{2+} y la falta de acción del verapamil refuerzan la idea antes comentada sobre una posible disminución del contenido de Ca^{2+} liberador en la superficie interna de la membrana de los túbulos T de animales sometidos al proceso de sensibilización.

Una vez llegados a este punto, y aún sabiendo que es difícil trasladar al hombre las respuestas obtenidas en la experimentación animal, nos planteamos cuál es el significado de nuestros resultados. A priori, el hecho de que la cafeína produzca incrementos mayores de la contractilidad en las preparaciones de animales sensibilizados podría parecer anecdótico; sin embargo, si esto mismo ocurriese en el hombre, su utilidad



sería indiscutible dado que la cafeína o productos similares podrían tener un efecto terapéutico mayor en pacientes asmáticos, especialmente en aquellas situaciones clínicas que se acompañan de fatiga muscular respiratoria.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente estudio nos indican que: 1) el modelo de sensibilización utilizado produce una hiperreactividad del diafragma, dependiente en parte del Ca^{2+} extracelular; 2) la sensibilización aumenta el efecto de cafeína, pero no de teofilina sobre la contractilidad diafragmática; y 3) el aumento de la contractilidad producido por las metilxantinas presenta una mayor dependencia del Ca^{2+} extracelular en los diafragmas procedentes de animales sensibilizados.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración técnica de Pedro Santamaria y Antonio Crespo en la realización del presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Boushey HA, Holtzman MJ, Sheller JR, Nadel JA. Bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1980; 121:389-413.
2. Fleming WW, McPhillips JJ, Westfall DP. Post-junctional supersensitivity and subsensitivity of autonomic effector responses. *Ergeb Physiol* 1973; 68:55-119.
3. Kalsner S. A new approach to the measurement and classification of forms of supersensitivity of autonomic effector responses. *Br J Pharmacol* 1974; 51:427-434.
4. Middleton E. Antiasthmatic drug therapy and calcium ions: Review of pathogenesis and role of calcium. *J Pharm Sci* 1980; 69:243-251.
5. Perpiñá M, Cortijo J, Sanz C, Esplugues J, Morcillo E. Active sensitization discriminates between groups of calcium antagonists in lung parenchymal strips. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1987; 23:255-260.
6. Perpiñá M, Palau M, Cortijo J, Fornas E, Ortiz JL, Morcillo E. Sources of calcium for the contraction induced by various agonists in trachealis from normal and sensitized guinea-pigs. *Respiration* 1989; 55:105-112.
7. Tinkelman DG. Calcium transport: a plausible theory for the pathogenesis of asthma; En Morley J (ed). *Bronchial hyperreactivity*. London, Academic Press. 1982, 99-106.
8. Goodman FR, Weiss GB, Karaki H. Differential calcium movements induced by agonists in guinea-pig tracheal muscle. *Eur J Pharmacol* 1987; 133:111-117.
9. Estenne M, Yernault JC, De Troyer A. Effects of parenteral aminophylline on lung mechanism in normal human. *Am Rev Respir Dis* 1980; 121:967-971.
10. Aubier M, De Troyer A, Sampson M, Macklem P, Roussos CH. Aminophylline improves diaphragmatic contractility. *N Engl J Med* 1991; 305:249-252.
11. A de Diego, Orón J, Perpiñá M, Ortiz JL, Cortijo J, Morcillo E. Calcio y contractilidad diafragmática. Modificación por las metilxantinas. *Arch Bronconeumol* 1990; 26:341-345.
12. Viires N, Aubier M, Murciano D, Marty Ch, Pariente R. Effects of theophylline on isolated diaphragmatic fibers. A model for pharmacologic studies on diaphragmatic contractility. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:1.060-1.064.
13. Foster RW, Small RC, Weston AH. Evidence that the spasmogenic effect of tetraethylammonium in guinea-pig trachealis is both direct and dependent on the cellular influx of calcium ions. *Br J Pharmacol* 1983; 79:255-259.
14. Ortiz JL, Cortijo J, Sanz C et al. Nonspecific hyperreactivity to pharmacologic stimuli in tracheal and lung parenchymal strips of actively sensitized guinea-pigs. *J Pharm Pharmacol* 1988; 41:316-321.
15. Morcillo E, Perpiñá M, Esplugues J. Hyperresponsiveness to autacoids and autonomic drugs in lung parenchymal strip from sensitized guinea-pigs. *Am Rev Respir Dis* 1984; 129:948-951.
16. Henderson WR, Shelhamer JH, Reingold DB et al. Alpha-adrenergic hyperresponsiveness in asthma. Analysis of vascular and pupillary responses. *N Engl J Med* 1979; 300:642-647.
17. Palevsky HI, Grippi MA, Pack AI. The effect of antigen-induced bronchoconstriction on phrenic nerve activity. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:749-756.
18. Small RC, Boyle JP, Cortijo J et al. The relaxant and spasmogenic effects of some xantine derivatives acting on guinea-pig isolated trachealis muscle. *Br J Pharmacol* 1988; 94:1.091-1.100.
19. Katz AM, Rewpke DI, Dunnett J et al. Dependence of calcium permeability of sarcoplasmic reticulum vesicles on external and internal calcium ion concentrations. *J Biol Chem* 1977; 252:1.950-1.956.
20. Dimarco A, Nochomovitz M, Dimarco M, Altose M, Kelsen S. Comparative effects of aminophylline on diaphragm and cardiac contractility. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132:800-805.