

11262

29-8

---

**PAPEL QUE DESEMPEÑAN LOS LEUCOTRIENOS  
EN EL ASMA EXPERIMENTAL EN COBAYOS**

---

**MARIO HUMBERTO VARGAS BECERRA**

**MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**1989**

**FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE TABLAS.....	v
ABREVIATURAS.....	vi
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>1</b>
Introducción.....	1
Histamina.....	5
Derivados del ácido araquidónico.....	6
Prostaglandinas.....	9
Tromboxanos.....	11
Leucotrienos.....	11
Factor activador de plaquetas.....	13
Importancia de los mediadores en el asma.....	15
Objetivo del estudio.....	17
<b>MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>18</b>
Animales.....	18
Modelo de broncoconstricción.....	18
Método de inmunización.....	18
Método de registro.....	20
Evaluación de los registros.....	23
Estudio farmacológico.....	24
Cuantificación de LTC <sub>4</sub> inmunorreactivo.....	26
Muestras.....	26
Radioinmunoanálisis de iLTC <sub>4</sub> .....	27
Fármacos.....	28
Análisis estadístico.....	29
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
Modelo de broncoconstricción.....	31
Estudio farmacológico.....	36
Cuantificación de iLTC <sub>4</sub> .....	44
<b>DISCUSION.....</b>	<b>47</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>57</b>

**INDICE DE FIGURAS**

- Figura 1. Metabolismo del ácido araquidónico por la ciclooxigenasa, 7
- Figura 2. Metabolismo del ácido araquidónico por la lipooxigenasa, 8
- Figura 3. Estructura química del factor activador de plaquetas, 14
- Figura 4. Método de inmunización de los cobayos, 19
- Figura 5. Método de registro de la presión de inflación pulmonar y tensión arterial, 21
- Figura 6. Forma de obtener el 100% de obstrucción, 23
- Figura 7. Evaluación del registro de broncoconstricción, 25
- Figura 8. Respuesta broncoconstrictora al antígeno, 31
- Figura 9. Efecto del isoproterenol sobre la broncoconstricción, 33
- Figura 10. Efecto del isoproterenol sobre la broncoconstricción, 33
- Figura 11. Modificaciones de la tensión arterial durante la broncoconstricción, 35
- Figura 12. Ejemplos de los registros obtenidos, 37
- Figura 13. Efecto de la pirilamina, la dietilcarbamazina y la dexametasona sobre la broncoconstricción, 38
- Figura 14. Efecto de la indometacina sobre la broncoconstricción, 40
- Figura 15. Correlación entre contracción máxima y broncoconstricción, 42
- Figura 16. Correlación entre tiempo de latencia y broncoconstricción, 43
- Figura 17. Correlación entre tiempo de la contracción máxima y broncoconstricción, 44
- Figura 18. Concentración de iLTC<sub>4</sub> en los lavados broncoalveolares antes y durante la broncoconstricción, 45

## INDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Principales cambios patológicos en el asma bronquial, 4
- Tabla 2. Efectos de la histamina de importancia en el asma bronquial, 6
- Tabla 3. Efectos pulmonares de prostaglandinas y tromboxano A<sub>2</sub>, 10
- Tabla 4. Efectos pulmonares de los leucotrienos, 13
- Tabla 5. Principales efectos pulmonares del factor activador de plaquetas, 14
- Tabla 6. Esquema de aplicación de los fármacos, 24
- Tabla 7. Relación peso húmedo/peso seco de los parénquimas pulmonares, 34
- Tabla 8. Tiempo de latencia, tiempo de la contracción máxima y contracción máxima en los diferentes grupos estudiados, 39

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>CM</b>	Contracción máxima
<b>cpm</b>	Cuentas por minuto
<b>FAP</b>	Factor activador de plaquetas
<b>Fc</b>	Fracción cristalizabile
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>IgE</b>	Inmunoglobulina E
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>ILTC.</b>	Leucotrieno C <sub>4</sub> inmunorreactivo
<b>LBA</b>	Lavado broncoalveolar
<b>LTB<sub>4</sub></b>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
<b>LTC<sub>4</sub></b>	Leucotrieno C <sub>4</sub>
<b>LTD<sub>4</sub></b>	Leucotrieno D <sub>4</sub>
<b>LTE<sub>4</sub></b>	Leucotrieno E <sub>4</sub>
<b>OA</b>	Ovoalbúmina
<b>PGD<sub>2</sub></b>	Prostaglandina D <sub>2</sub>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PGF<sub>2α</sub></b>	Prostaglandina F <sub>2α</sub>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaglandina I <sub>2</sub> (Prostaciclina)
<b>RIA</b>	Radioinmunoanálisis
<b>SS</b>	Solución salina al 0.9%
<b>TCH</b>	Tiempo de la contracción máxima
<b>TL</b>	Tiempo de latencia
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>TXB<sub>2</sub></b>	Tromboxano B <sub>2</sub>

## ANTECEDENTES

### INTRODUCCION

El asma bronquial es una enfermedad caracterizada por una contracción muscular exagerada de la tráquea y los bronquios ante diversos estímulos, y que se manifiesta por estrechamiento generalizado de las vías aéreas que cambia de intensidad ya sea en forma espontánea o debido al tratamiento.<sup>1</sup> En el paciente asmático este estrechamiento generalizado de la luz de las vías aéreas puede desencadenarse por el estímulo inmunológico que representa la inhalación del o los antígenos a los cuales el sujeto es sensible (asma inmunológica o extrínseca), o bien por estímulos no inmunológicos como la realización de ejercicio, la inhalación de irritantes o de aire frío y seco, la presencia de infecciones respiratorias virales, etc. (asma no inmunológica o intrínseca).<sup>2</sup> Clínicamente este fenómeno se manifiesta entonces por un ataque de asma bronquial o crisis asmática, constituida por la presencia de síntomas tales como tos, expectoración adherente, sibilancias y disnea. Estas crisis pueden ser muy variables en cuanto a duración, intensidad y frecuencia de aparición. Además, en alrededor del 50% de los pacientes que son sometidos a reto antigénico esta crisis asmática inicial es seguida, 4 a 8 horas después, por una nueva fase de broncoconstricción denominada respuesta tardía, la cual suele ser más severa y prolongada que la respuesta inicial.<sup>3</sup> Por otra parte, aun en los periodos asintomáticos todos los pacientes con

asma bronquial presentan una respuesta broncoconstrictora exagerada, en comparación con sujetos no asmáticos, ante la aplicación de diversos estímulos farmacológicos (inhalación o inyección de histamina, metacolina y otros compuestos) o físicos (ejercicio, hiperventilación eucápnica, inhalación de agua destilada, etc.).<sup>4</sup> A esta respuesta exagerada se la denomina hiperreactividad de las vías aéreas o hiperreactividad bronquial.

Así, el concepto de asma abarca las dos características más sobresalientes de este padecimiento: a) la existencia de hiperreactividad bronquial y b) la presencia eventual de broncoconstricción reversible. Aunque en realidad ambos fenómenos son diferentes, en muchas ocasiones pueden estar determinados por causas similares. Así, por ejemplo, la inhalación de ozono o la presencia de una infección viral respiratoria provocan hiperreactividad transitoria en sujetos normales,<sup>3,4</sup> pero también pueden desencadenar crisis de broncoconstricción en pacientes con asma bronquial o sujetos normales.<sup>7,8</sup>

Sin lugar a dudas, la reacción inmunológica de hipersensibilidad inmediata es el factor que aisladamente reviste mayor importancia, ya que el fondo inmunológico está presente en alrededor del 45-60% de los sujetos asmáticos, en especial antes de los 30 años de edad.<sup>9,10</sup> Además, la inhalación del antígeno específico es capaz de provocar no sólo crisis asmática, sino también un mayor incremento de la reactividad bronquial a otros estímulos inespecíficos.<sup>11</sup>

En relación al asma de tipo inmunológico, se sabe que un individuo con predisposición genética desarrolla en algún momento



de su vida, generalmente la niñez, una respuesta inmunológica ante uno o varios alérgenos inhalados, circunscribiéndose esta respuesta principalmente a las vías aéreas. Los alérgenos más frecuentes son el Ácaro del polvo doméstico (Dermatophagoides pteronyssinus) y en especial sus heces fecales, y los pólenes de diversas plantas o árboles.<sup>12</sup> Sin embargo, existen múltiples alérgenos adicionales que pueden inducir inmunización específica de las vías aéreas.<sup>13</sup>

La respuesta inmunológica de estos sujetos se caracteriza porque el efector humoral suele ser la IgE en lugar de la IgA o la IgG que habitualmente ocurre en los sujetos normales.<sup>14</sup> A esta tendencia hereditaria para la producción de IgE se le denomina atopia, y los sujetos que la sufren suelen padecer, además de asma, otros trastornos alérgicos como fiebre del heno (rinitis alérgica) y eccema.<sup>9</sup> Una vez producida, la IgE se fija a las células que poseen en su superficie receptores para la fracción Fc de esta inmunoglobulina, de tal modo que cuando el alérgeno es nuevamente inhalado entra en contacto con estos anticuerpos y activa mecanismos intracelulares que suelen llevar finalmente a la liberación de mediadores químicos de diversa naturaleza.<sup>15</sup>

Parece haber consenso general de que los mediadores liberados por la célula cebada son los causantes principales de la respuesta inicial al antígeno.<sup>16-19</sup> La participación del sistema nervioso colinérgico en esta respuesta es controversial, pero por lo menos en el ser humano parece ser inconstante o escasa.<sup>20,21</sup>

Para que un mediador sea considerado de importancia en un proceso patológico, debe ser capaz de producir alguna o varias de

las alteraciones funcionales o anatómicas propias de la enfermedad. Con respecto al asma bronquial se han descrito varios cambios patológicos en las paredes de las vías aéreas, los cuales se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales cambios patológicos en el asma bronquial <sup>22, 23</sup>

- 
1. Espasmo e hipertrofia del músculo liso.
  2. Aumento del tamaño de las glándulas mucosas y del número de células caliciformes, con hipersecreción de moco.
  3. Vasodilatación de la microcirculación con extravasación proteínica y edema.
  4. Infiltración de células inflamatorias en la mucosa y submucosa, de predominio eosinofílico y en menor grado neutrofilico.
  5. Lesión epitelial con descamación de células ciliadas y engrosamiento de la membrana basal.
- 

Algunas de estas alteraciones como la hipertrofia del músculo liso, los cambios en las células secretoras de moco y el engrosamiento de la membrana basal probablemente constituyen cambios de instalación lenta y crónica.<sup>22</sup> Sin embargo, todos los restantes pueden presentarse en forma aguda durante una crisis asmática, y muchos de los mediadores involucrados con la respuesta inicial al alérgeno son capaces de reproducir experimentalmente estas alteraciones.<sup>18</sup>

Parece que en el asma bronquial la célula cebada es la principal célula involucrada en la reacción broncoconstrictora inmediata, ya que la presencia de receptores de alta afinidad para la fracción Fc de la IgE le permite interactuar rápidamente con el antígeno.<sup>19</sup> Si bien los basófilos también poseen este tipo de receptores, hay indicios de que no participan en esta reacción.<sup>24</sup> El papel de otras células que poseen receptores de baja afinidad para IgE como son macrófagos y eosinófilos todavía se desconoce, aunque pudieran participar en

cierta medida en el desarrollo de la respuesta tardía.<sup>20</sup>

Además de esto, la célula cebada posee una gran capacidad para sintetizar, almacenar y liberar diversos mediadores químicos de gran potencia proinflamatoria.

Entre los principales mediadores químicos involucrados en la respuesta asmática inmediata se encuentran los siguientes:

## HISTAMINA

Su nombre químico es 2-(4-imidazolil)etilamina, o bien  $\beta$ -aminoetilimidazol, y su nombre común deriva del griego hystos (tejido), describiendo el hecho de que es una amina que se encuentra en casi todos los tejidos animales. Se sintetiza a partir del aminoácido histidina y su degradación se lleva a cabo a través de la histamina-N-metiltransferasa y las diaminoxidasas (histaminasas). Las principales células productoras de histamina son las células cebadas y los basófilos, mismas que la almacenan en el interior de sus gránulos intracitoplásmicos.<sup>21</sup>

Sus efectos biológicos los realiza a través de la estimulación de receptores histaminérgicos  $H_1$  o  $H_2$ . Los receptores  $H_1$  son bloqueados por los "antihistamínicos" clásicos como la difenhidramina, la clorfeniramina y la pirilamina<sup>22</sup> o por los antagonistas  $H_1$  de producción más reciente como el astemizol y la terfenadina, cuya potencia es muy superior con respecto a los fármacos anteriores.<sup>23</sup> Los receptores  $H_2$  son bloqueados en forma específica por la cimetidina, la burimamida y la metiamida.

La tabla 2 muestra los principales efectos de la histamina a nivel pulmonar.

**Tabla 2. Efectos de la histamina de importancia en el asma bronquial <sup>10-20</sup>**

Mecanismo o célula blanco	Receptor	Efecto
Contracción del músculo liso traqueobronquial	H <sub>1</sub>	Broncospasmo
Dilatación de la microcirculación	H <sub>1</sub> y H <sub>2</sub>	Favorece el edema y la infiltración celular
Aumento de la permeabilidad capilar	H <sub>1</sub> y ¿H <sub>2</sub> ?	Edema
Estimulación de células secretoras de moco	H <sub>2</sub>	Hipersecreción leve
Estimulación de terminales nerviosas:		
Parasimpáticas:		
Receptores de irritación	H <sub>1</sub>	Producción de reflejo vagal
Fibras C	H <sub>1</sub>	Liberación de sustancia P
Simpáticas	H <sub>1</sub>	Inhibición de la liberación de noradrenalina
Leucocitos	H <sub>2</sub>	Disminución de la liberación de enzimas lisosomales, anticuerpos y linfocinas
Célula cebada y basófilo	H <sub>2</sub>	Inhibición de la degranulación
Epitelio traqueal	¿H <sub>1</sub> ?	Producción de PGE <sub>2</sub>

El efecto broncoconstrictor de la histamina predomina en las vías aéreas periféricas, y su duración es muy corta: en el cobayo la aplicación de una dosis única intravenosa ocasiona cambios pulmonares que duran menos de 60 segundos, mientras que en el ser humano el efecto de su inhalación persiste sólo entre 1 y 10 minutos.<sup>20</sup>

#### DERIVADOS DEL ACIDO ARAQUIDONICO

El ácido araquidónico es un ácido graso esencial de 20 carbonos con cuatro dobles ligaduras (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico) que normalmente se encuentra formando parte de los fosfolípidos que constituyen las membranas celulares. Cuando los fosfolípidos sufren hidrólisis por la acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, el ácido araquidónico es liberado hacia el

interior de la célula. Aquí puede seguir alguna de las dos vías enzimáticas que lo metabolizan: la vía de la ciclooxigenasa (fig. 1), que produce prostaglandinas y tromboxanos, y la vía de la lipooxigenasa (fig. 2), que finalmente sintetiza leucotrienos. La fosfolipasa  $A_2$  es una enzima que puede ser inhibida por la lipocortina (también llamada macrocortina o lipomodulina), proteína inducida por la acción de los corticosteroides.<sup>3,2</sup>

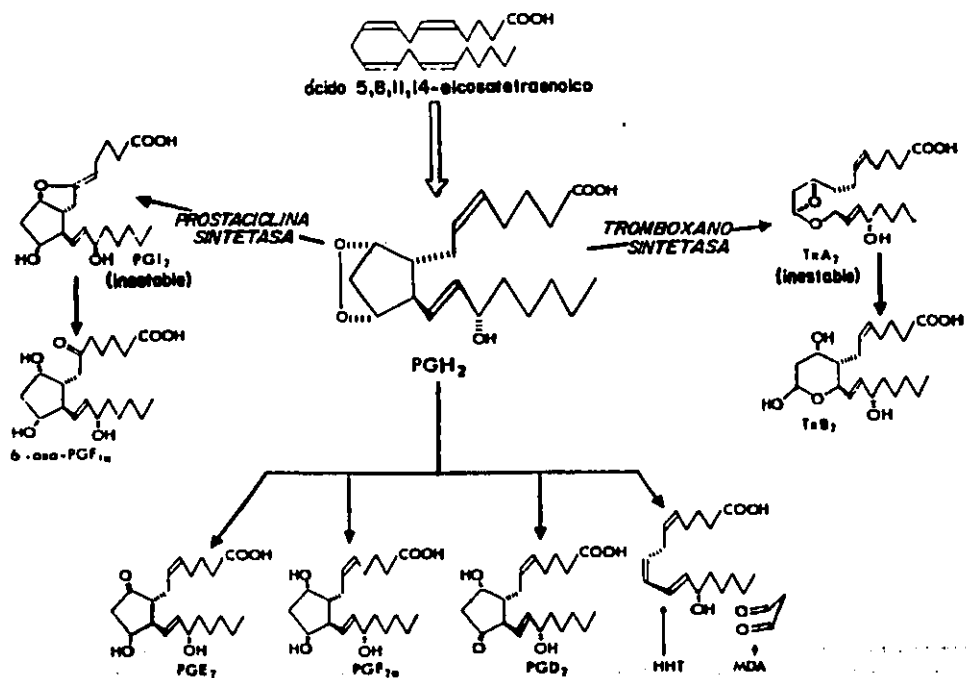


FIGURA 1. Metabolismo del ácido araquidónico por la ciclooxigenasa. Una vez liberado del fosfolípido por la fosfolipasa  $A_2$ , el ácido araquidónico (arriba) es convertido en  $PGH_2$ , a partir de la cual enzimas específicas pueden producir las demás prostaglandinas o  $TxA_2$ . (Tomado de la referencia 30.)

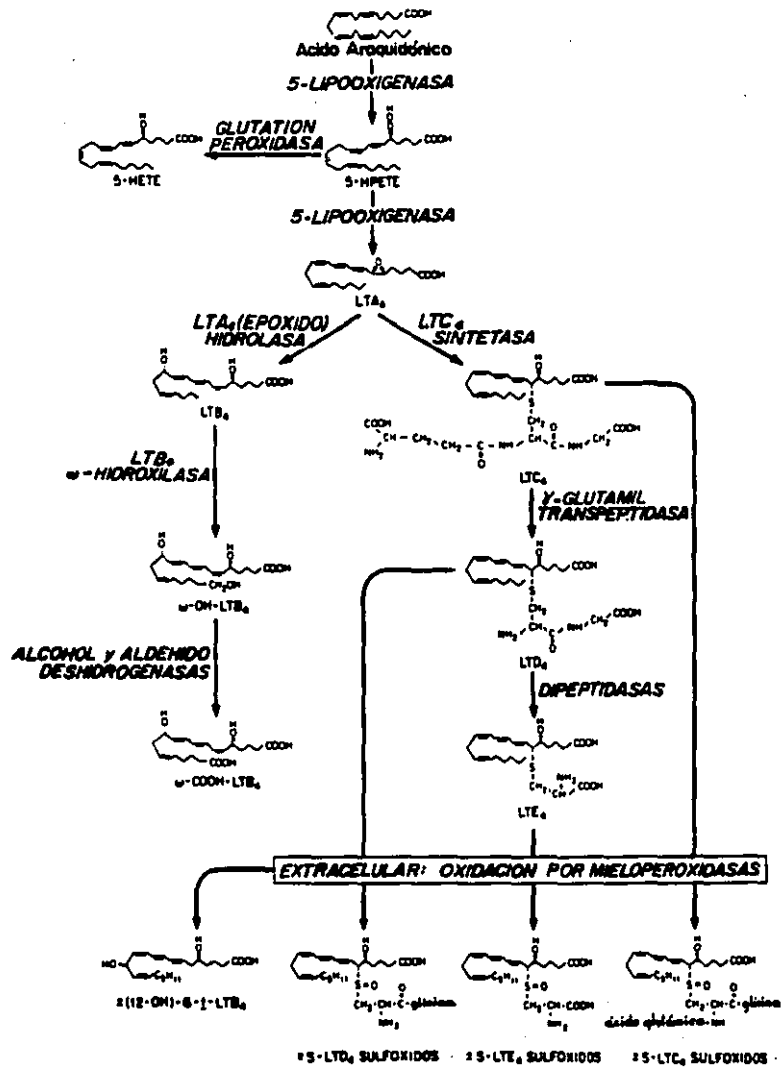


FIGURA 2. Metabolismo del ácido araquidónico por la 5-lipooxigenasa. El LTC<sub>4</sub> se forma por la adición de una molécula de glutatión al LTA<sub>4</sub>, y eliminaciones sucesivas de un residuo de aminoácido produce sus derivados, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>. Nótese la presencia de azufre en los leucotrienos C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> y E<sub>4</sub>, activo por el que también se conocen como sulfidopéptido leucotrienos. (Tomado de la referencia 31.)

**Prostaglandinas.** Su nombre deriva del hecho de haber sido descubiertas en la secreción de vesículas seminales y glándula prostática.

La ciclooxigenasa, también llamada prostaglandina sintetasa, es en realidad un complejo multienzimático de membrana que está situado en la fracción microsomal. Aunque de hecho la ciclooxigenasa es una lipooxigenasa, se le ha dado este nombre para diferenciarla de la otra vía metabólica importante del ácido araquidónico. La ciclooxigenasa es inhibida por la mayoría de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos como la indometacina, el ácido acetilsalicílico, los fenamatos y los derivados del ácido propiónico.<sup>33,34</sup> Entre ellos la indometacina es uno de los que poseen mayor actividad inhibitoria tanto in vitro como in vivo.<sup>35,36</sup>

Hasta ahora la mayoría de los sistemas celulares animales estudiados poseen la maquinaria metabólica necesaria para la producción de prostaglandinas.<sup>34</sup> Sin embargo, existe producción preferencial de alguna de las prostaglandinas según el tejido o tipo celular involucrado. Así, el endotelio vascular es el principal productor de PGI<sub>2</sub>,<sup>34</sup> la célula cebada de tipo conectivo sintetiza casi exclusivamente PGD<sub>2</sub>,<sup>37,38</sup> y las células del epitelio traqueobronquial producen PGE<sub>2</sub>.<sup>36</sup>

Los pulmones son un sitio muy importante de inactivación de las prostaglandinas que, producidas en alguna otra región del organismo o en el mismo pulmón, alcanzan la microcirculación pulmonar. El endotelio vascular pulmonar posee una capacidad muy alta para la depuración de prostaglandinas circulantes, excepto

para la  $PGI_2$ , a la cual no modifica.<sup>34</sup> La  $PGI_2$ , sin embargo, es muy inestable y rápidamente se convierte en forma espontánea a 6-ceto-PGF<sub>2α</sub>.

Los principales efectos respiratorios de las prostaglandinas se resumen en la tabla 3.

**Tabla 3. Efectos pulmonares de prostaglandinas y tromboxano A<sub>2</sub>** <sup>34,39-41</sup>

Prostanoide	Efecto	Comentario
PGD <sub>2</sub>	Broncoconstricción Vasoconstricción Hipersecreción de moco	Principal metabolito de célula cebada de tipo conectivo
PGE <sub>1</sub>	Broncodilatación	
PGE <sub>2</sub>	Broncodilatación (si hay tono basal alto) Broncoconstricción (si hay tono basal bajo) Disminución de la secreción de moco Inhibición de la degranulación de célula cebada	
PGF <sub>2α</sub>	Broncoconstricción Vasoconstricción Hipersecreción de moco	
PGG <sub>2</sub> , PGH	Broncoconstricción	Endoperóxidos cíclicos muy inestables (vida media 5 min)
PGI <sub>2</sub>	Broncodilatación Vasodilatación Antiagregación plaquetaria	Muy inestable (metabolito estable: 6-ceto-PGF <sub>2α</sub> )
TXA <sub>2</sub>	Broncoconstricción	Endoperóxido cíclico muy inestable (vida media 30 seg) (metabolito estable: TXB <sub>2</sub> )

Debe hacerse notar que, aunque PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>, in vitro producen relajación del músculo liso traqueobronquial, en ensayos terapéuticos experimentales en sujetos asmáticos los aerosoles de estas prostaglandinas provocan en ocasiones broncoconstricción,



presumiblemente debido a su efecto irritante sobre los receptores vagales, despertando una respuesta broncoconstrictora refleja.<sup>42</sup> Por su parte, el efecto broncoconstrictor de  $PGD_2$  y  $PGF_{2\alpha}$  en estudios in vivo en animales y humanos es de muy corta duración (<2 minutos y <10 minutos, respectivamente).<sup>29</sup>

**Tromboxanos.** El nombre de estos compuestos se relaciona al hecho de que fueron descubiertos en las plaquetas o trombocitos, y de que su estructura contiene un anillo de oxano. El tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ) constituye la mayor parte del factor que antiguamente se denominó Sustancia Constrictora de la Aorta de Conejo.

El  $TXA_2$  es producido principalmente por las plaquetas y una vez liberado posee una vida media muy corta (alrededor de 30 seg) siendo degradado rápidamente en forma espontánea a su metabolito estable inactivo el tromboxano  $B_2$  ( $TXB_2$ ).<sup>40</sup> Ambos compuestos son producidos por una vía colateral a la de las prostaglandinas (fig. 1), por lo que los agentes que inhiben a la ciclooxigenasa también inhiben la síntesis de tromboxanos.

El  $TXA_2$  posee un potente efecto contráctil sobre el músculo liso tanto vascular como traqueobronquial, principalmente a nivel de las vías aéreas periféricas (tabla 3).<sup>30,40</sup>

**Leucotrienos.** Los leucotrienos fueron denominados así debido a que se descubrieron por primera vez en leucocitos polimorfonucleares de conejo, y a que en su estructura poseen tres dobles ligaduras conjugadas (trienos). En la actualidad es bien conocido que en conjunto los leucotrienos  $C_4$ ,  $D_4$  y  $E_4$  ( $LTC_4$ ,  $LTD_4$  y  $LTE_4$ ) constituyen el factor denominado antiguamente Sustancia de Reacción Lenta de la Anafilaxia.<sup>43</sup>

El ácido araquidónico puede sufrir lipooxigenación en los carbonos 5, 12 ó 15 mediante las respectivas lipooxigenasas (5-lipooxigenasa, 12-lipooxigenasa o 15-lipooxigenasa) produciendo metabolitos secundarios, algunos con actividades biológicas, en cada una de ellas. Los leucotrienos derivan de la primera de estas vías mencionadas. La 5-lipooxigenasa es una enzima de aproximadamente 180 000 dáltones que se encuentra libre en el citoplasma y que requiere calcio para lograr su función enzimática.<sup>33</sup> La inhibición de esta enzima puede lograrse por diversos fármacos experimentales como el BW755c y la fenidona, así como por algunos fármacos que fueron de uso clínico como la dietilcarbamazina y el benoxaprofen.<sup>44,45</sup> Además, la mayoría de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos que inhiben a la ciclooxigenasa son capaces también de inhibir a la lipooxigenasa cuando se emplean a concentraciones mucho mayores.<sup>44</sup>

A diferencia de las prostaglandinas, la capacidad para sintetizar leucotrienos parece estar restringida a sólo algunos tipos celulares, en especial aquellos relacionados con respuestas inflamatorias e inmunológicas como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células cebadas y monocitos-macrófagos.<sup>44,47</sup>

A nivel pulmonar los leucotrienos poseen efectos muy potentes, los cuales se resumen en la tabla 4.

Cabe destacar que en relación a la contracción del músculo liso traqueobronquial el efecto de LTC<sub>4</sub> y LTD<sub>4</sub> es aproximadamente 1000 veces más potente que el de la histamina y 500 veces más po-

Tabla 4. Efectos pulmonares de los leucotrienos <sup>29,31,48,50</sup>

Leucotrieno	Efecto	Comentario
LTA <sub>4</sub>	Broncoconstricción leve	
LTB <sub>4</sub>	Broncoconstricción leve Quimiotaxis, quimioquinesis, agregación, adherencia y de- granulación de neutrófilos, eosinófilos, monocitos y ma- crófagos Aumento de permeabilidad vas- cular Disminución de la función de linfocitos T	Efecto indirecto (liberación de TXA <sub>2</sub> )  Requiere presencia de PGE <sub>2</sub>
LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub> y LTE <sub>4</sub>	Broncoconstricción Vasoconstricción Aumento de la permeabilidad vas- cular Hipersecreción de moco	Efecto directo e indirecto (liberación de TXA <sub>2</sub> y PGF <sub>2α</sub> )

tente que el de la PGF<sub>2α</sub>.<sup>50</sup> Por otra parte, el leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) es una de las sustancias con mayor potencia quimiotáctica para neutrófilos, equivalente a la fracción C5a del complemento.<sup>50</sup>

#### FACTOR ACTIVADOR DE PLAQUETAS

En los últimos años ha recibido gran atención la posibilidad de que el factor activador de plaquetas (FAP) sea el principal promotor de las alteraciones inflamatorias crónicas de las vías aéreas de los sujetos asmáticos y de la hiperreactividad bronquial.<sup>51,52</sup>

Su nombre químico completo es el de 1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfolina, o bien el de acetilgliceril éster fosforilcolina (fig. 3).

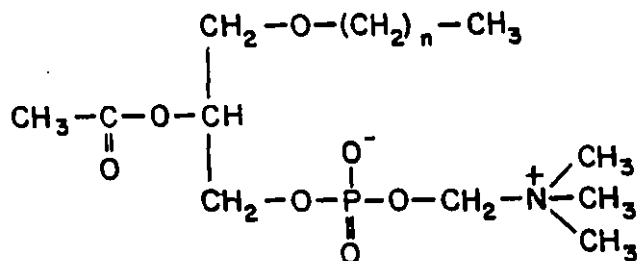


FIGURA 3. Estructura química del factor activador de plaquetas.

Este compuesto se forma a partir de los fosfolípidos de membrana y en su síntesis interviene la fosfolipasa A<sub>2</sub>, por lo que la inhibición indirecta de esta enzima por los corticosteroides bloquea su producción.<sup>23</sup> El FAP es rápidamente degradado a su metabolito inactivo, el liso-FAP, por acetilhidrolasas.<sup>24</sup> Se ha encontrado que muchas células pueden sintetizar FAP, al menos *in vitro*, entre las cuales se encuentran células cebadas, plaquetas, eosinófilos, neutrófilos y macrófagos.<sup>24</sup>

La tabla 5 muestra los principales efectos pulmonares del FAP.

Tabla 5. Principales efectos pulmonares del factor activador de plaquetas<sup>21,22</sup>

- 
1. Produce broncoconstricción indirecta (probablemente por liberación de TXA<sub>2</sub>)
  2. Es potente quimiotáctico para neutrófilos
  3. Induce hiperreactividad bronquial prolongada
  4. Aumenta la permeabilidad microvascular y produce exudación de proteínas hacia la luz de las vías aéreas
  5. Aumenta la producción de moco
  6. Disminuye la limpieza mucociliar
- 

Es de hacer notar que aunque el FAP es un potente broncoconstrictor cuando se administra por vía intravenosa o en aerosol, carece de efectos contráctiles cuando se aplica *in vitro*

a preparaciones de músculo liso traqueobronquial, lo que sugiere que este compuesto provoca broncoconstricción indirecta a través de la activación de plaquetas o neutrófilos con liberación subsecuente de tromboxanos.<sup>24</sup>

### IMPORTANCIA DE LOS MEDIADORES EN EL ASMA

Aunque cada uno de los mediadores descritos tiene la capacidad para ocasionar alguno o varios de los principales cambios patológicos o funcionales del asma bronquial, hasta el momento su participación real en esta enfermedad no se conoce con precisión. Así, anteriormente se consideraba que la histamina casi no participaba en la crisis asmática, pues los "antihistaminicos" clásicos no ejercían efectos notables sobre la misma. Sin embargo, con el advenimiento de los nuevos compuestos bloqueadores de los receptores histaminérgicos H<sub>1</sub>, cuya potencia es muy superior a la de los convencionales, se ha encontrado que estos pueden inhibir hasta en un 50% la respuesta broncoconstrictora al reto antigénico en pacientes asmáticos.<sup>27</sup> Hallazgos en este mismo sentido se han observado en modelos experimentales de asma.<sup>28,29</sup>

Por otro lado, hasta ahora los inhibidores de la producción de leucotrienos o bloqueadores de sus receptores sólo han tenido efectos inhibitorios parciales sobre la broncoconstricción alérgica.<sup>30,31</sup>

Con respecto a las prostaglandinas, se sabe que en algunos sujetos asmáticos la ingestión de agentes antiinflamatorios no esteroideos desencadena broncoconstricción por la inhibición de

alguna prostaglandina broncodilatadora o bien por la desviación del metabolismo del ácido araquidónico hacia la vía de la lipooxigenasa.<sup>41</sup> Sin embargo, este efecto adverso se presenta sólo en un cierto porcentaje de pacientes asmáticos (entre el 10 y 15%),<sup>42</sup> mientras que en algunos otros se observa, por el contrario, mejoría del fenómeno asmático.<sup>43</sup>

Aunque el FAP provoca broncoconstricción e hiperreactividad bronquial in vivo, se sabe que algunos de sus efectos los realiza a través de la producción de  $TXA_2$ ,<sup>44</sup> por lo que este último metabolito pudiera desempeñar un papel más importante del que se habla sospechado en el asma bronquial, y el desarrollo de inhibidores específicos de su producción o de bloqueadores de sus receptores pudiera constituir un enfoque terapéutico novedoso en el asma.

Además de todo lo anterior, continuamente se describen nuevas interacciones entre estos mediadores, modulando entre sí su producción y liberación o su efecto sobre las células blanco.<sup>45-46</sup> Así, por ejemplo, los leucotrienos estimulan la liberación de histamina, tromboxanos y prostaglandinas;<sup>46</sup> la histamina induce la producción de prostaglandinas;<sup>47</sup> la  $PGE_2$  inhibe la liberación de mediadores al ejercer un potente efecto inhibitorio sobre célula cebada,<sup>48</sup> y el FAP libera  $PGE_2$  del epitelio traqueal<sup>49</sup> y tromboxanos de plaquetas y neutrófilos.<sup>51</sup>

Finalmente, aunque el aspecto mejor estudiado ha sido la reacción broncoconstrictora inmediata ante un reto antigénico o no antigénico, no hay que olvidar que posiblemente gran parte de la reacción asmática que suele observarse en la práctica clínica

corresponde a respuestas tardías en las que participan en forma más relevante los fenómenos inflamatorios, con intervención de tipos celulares diferentes a las células cebadas (eosinófilos, neutrófilos, etc.) con capacidad proinflamatoria distinta.

#### **OBJETIVO DEL ESTUDIO**

Con el presente estudio se intenta conocer mejor cuál es la participación de algunos mediadores en la broncoconstricción alérgica en cobayos sensibilizados. Para ello, se diseñó un nuevo modelo de asma bronquial inmunizando a los cobayos contra ovoalbúmina por vía inhalatoria, y en él se investigó cuáles son las modificaciones que ocurren durante la broncoconstricción alérgica inmediata con la inhibición farmacológica de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa, así como el bloqueo de los receptores histaminérgicos H<sub>1</sub>. Además, se practicaron lavados broncoalveolares a grupos de cobayos antes y durante la broncoconstricción inducida por el reto antigénico para cuantificar por radioinmunoanálisis las concentraciones de LTC<sub>4</sub> inmunorreactivo.

## MATERIAL Y METODOS

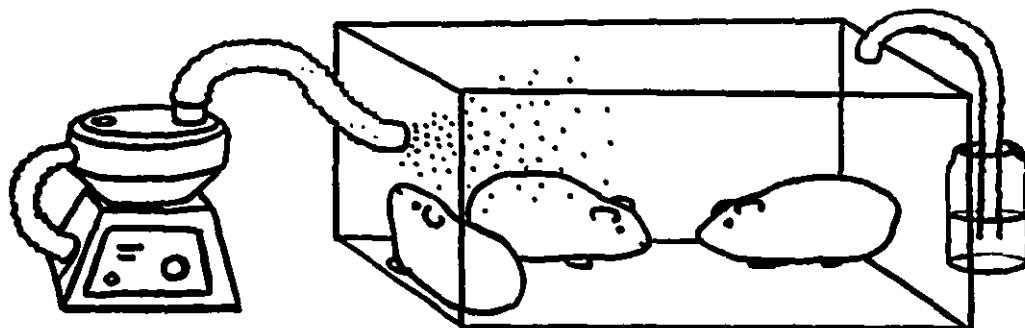
### ANIMALES

Se emplearon cobayos Hartley de uno u otro sexo cuyo peso al momento del estudio varió entre 500 y 600 g. Los cobayos fueron criados en cajas de acrílico que permitían el libre movimiento de los animales y fueron alimentados ad libitum con alimento comercial comprimido (Conejina, Purina S.A., México), alfalfa y agua con suplemento de ácido ascórbico (1 g/l).

### MODELO DE BRONCOCONSTRICION

**Método de inmunización.** El procedimiento de inmunización en este modelo tuvo una duración de 3 semanas y consistió en lo siguiente (fig. 4): Los cobayos (con peso entre 350 y 450 g) fueron colocados en una caja de acrílico (70 x 30 x 54 cm) sellada, y en ella fueron expuestos a aerosoles generados por un nebulizador Bennett US-1 (partículas con diámetro promedio entre 7 y 9  $\mu$ m; flujo de 2 ml/min). El primer día de inmunización se nebulizaron con 300 mg de ovoalbúmina (OA) como antígeno y 4 ml de vacuna de Bordetella pertussis inactivada por calor como adyuvante, ambas disueltas en 50 ml de solución salina al 0.9% (SS). Una semana después se reforzó la inmunización con nebulizaciones diarias de 75 mg de OA disuelta en 25 ml de SS durante 2 semanas más. Los animales así inmunizados fueron estudiados entre 3 y 7 días después de la última nebulización. El antígeno empleado (ovoalbúmina) es el que más se utiliza para inducir





OA 300 mg	OA 75 mg	OA 75 mg
BP 4 ml	SSF 25 ml	SSF 25 ml
SSF 50 ml		

FIGURA 4. Método de inmunización de los cobayos.

inmunización activa en el cobayo.\*\* El reto antigénico se llevó a cabo aplicando OA por vía intravenosa en dosis de 0.31 mg/Kg (n=7), 1 mg/Kg (n=9) o 3.1 mg/Kg (n=8). Para evaluar la importancia del uso de Bordetella pertussis como adyuvante se empleó como grupo control a 5 cobayos que fueron nebulizados diariamente con 75 mg de OA disuelta en 25 ml de SS durante 3 semanas y que recibieron un reto antigénico intravenoso de 3.1 mg/Kg de OA.

**Método de registro.** El grado de broncoconstricción provocado por la aplicación del reto antigénico se registró mediante el método de Kőnzett y Rőssler,<sup>7º</sup> para lo cual se realizó lo siguiente: Previo ayuno de 4 a 8 horas, y bajo anestesia con 35 mg/Kg de pentobarbital sódico aplicado por vía intraperitoneal, a los cobayos se les practicó incisión longitudinal en el cuello y disección de tráquea, una carótida y una yugular, las cuales fueron canuladas con sondas de polietileno con diámetros internos de 1.77 mm, 0.38 mm y 0.28 mm, respectivamente. Los animales fueron ventilados mecánicamente con un miniventilador (Harvard Apparatus Ltd., modelo 50-1700) con un volumen corriente de 10 ml/Kg y frecuencia respiratoria de 48 por minuto. Todos los cobayos recibieron desde el inicio del estudio 40 UI/Kg de heparina por vía intravenosa para mantener una buena permeabilidad de las cánulas arterial y venosa, así como 0.06 mg/Kg de pancuronio para suprimir los movimientos respiratorios espontáneos de los animales.

La resistencia pulmonar a la inflación (broncoconstricción) fue registrada de la siguiente manera (fig. 5): Una rama colateral de la sonda endotraqueal se conectó a un frasco de sello de agua. Con la finalidad de detectar la respuesta broncoconstrictora justo desde su inicio, la longitud del extremo sumergido en el agua se ajustó para permitir que el volumen corriente desplazara el agua sin burbujear (aproximadamente entre 2 y 7 cm bajo el agua). Durante la broncoconstricción inducida por el reto antigénico el burbujeo del volumen corriente se capturó en el frasco de sello de agua y la presión producida por

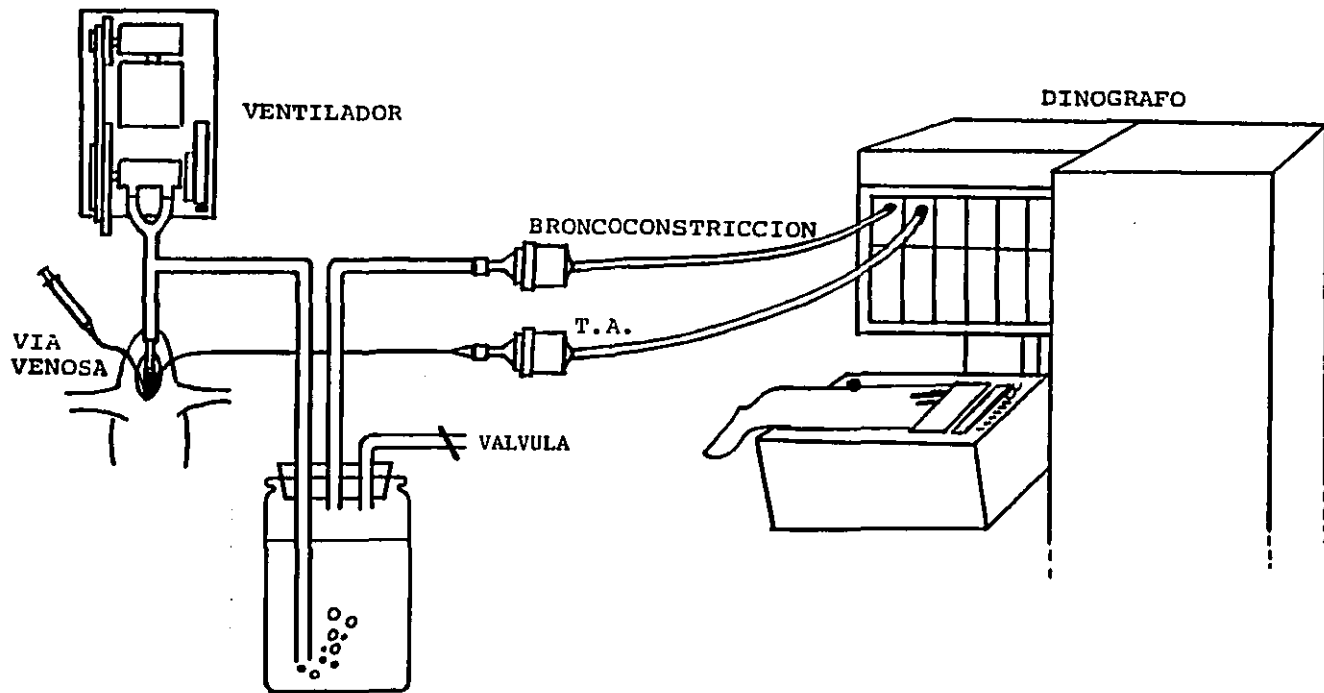


FIGURA 5. Método de registro de la presión de inflación pulmonar y tensión arterial.

éste fue captada por un transductor de presión Beckman 4-327-0129.

Puesto que esta forma de estimar la resistencia de las vías aéreas no es capaz de discriminar si el aumento de la presión de inflación pulmonar es debido a aumento de la resistencia de las vías aéreas o a disminución de la distensibilidad pulmonar por edema del parénquima, a un grupo de cobayos (n=4) se les administró un broncodilatador adrenérgico  $\beta$  (isoproterenol, 20  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  por vía intravenosa) a los 2 minutos de iniciada la broncoconstricción inducida por un reto máximo de 3.1 mg/Kg de OA, con la finalidad de evaluar la reversibilidad de la broncoconstricción. Además, para descartar la presencia de edema se midió la relación peso húmedo/peso seco de fragmentos de pulmón (2 muestras por cada animal) tomados de: a) los cobayos que recibieron reto antigénico e isoproterenol (n=8 muestras tomadas a los 30 minutos de iniciada la respuesta), b) cobayos sometidos a reto antigénico de 1 mg/Kg de OA (n=6 muestras, tomadas a los 10 minutos de la respuesta), c) cobayos normales (n=8 muestras) y d) cobayos inmunizados (n=12 muestras). Los animales de los dos primeros grupos fueron sacrificados con una sobredosis intravenosa de pentobarbital, mientras que los de los dos últimos lo fueron por desnucamiento. La deshidratación de los fragmentos pulmonares se realizó dejándolos por 3 a 5 días en una estufa a 80°C hasta la estabilización de su peso.

Durante todo el registro se tuvo una medición continua de la presión sanguínea de la carótida mediante un transductor de presión Beckman 4-327-0129.

Todos los registros se efectuaron en un dinógrafo Beckman R612 de seis canales.

**Evaluación de los registros.** El grado de broncoconstricción fue valorado comparándolo con la obstrucción máxima posible de las vías aéreas (100% de obstrucción) obtenida con la oclusión artificial momentánea de la sonda endotraqueal (fig. 6).

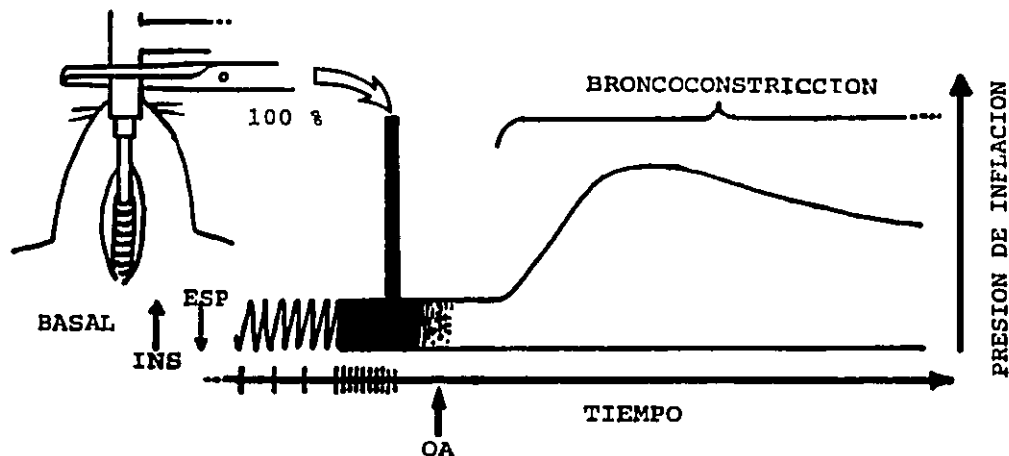


FIGURA 6. Forma de obtener el 100% de obstrucción. La oclusión transitoria de la sonda endotraqueal con una pinza provoca que el volumen corriente se desvíe hacia el transductor y se registre una elevación de la presión de inflación, contra la cual se comparará la respuesta broncoconstrictora para evaluar su intensidad.

Cada uno de los registros de broncoconstricción se dividió en cinco intervalos de tiempo (0 a 2, 2 a 5, 5 a 15 y 15 a 30 minutos), considerando como tiempo cero al inicio de la respuesta broncoconstrictora. En cada intervalo de tiempo se midió el área bajo la curva con un planimetro digital (Planix 2, Tamaya) y una vez descartada el área correspondiente a la presión de inflación basal, el resultado se comparó con el área que correspondería al

100% de obstrucción en dicho intervalo de tiempo (fig. 7a). Este valor fue expresado como porcentaje de broncoconstricción.

### ESTUDIO FARMACOLOGICO

Para investigar cuál es la participación de los leucotrienos, así como de la histamina y de algunos otros metabolitos del ácido araquidónico, en la broncoconstricción alérgica en este modelo (inmunización con OA + B. pertussis), antes de aplicar el reto antigénico con 1 mg/Kg de OA se administraron por vía intravenosa las siguientes sustancias: a) Pirilamina como antagonista de los receptores histaminérgicos  $H_1$ . b) Indometacina como inhibidor de la ciclooxigenasa. c) Dietilcarbamazina como inhibidor de la lipooxigenasa. d) Dexametasona como inhibidor de la fosfolipasa  $A_2$ . En la tabla 6 se muestra el esquema de aplicación de estos fármacos y el número de animales estudiados.

Tabla 6. Esquema de aplicación de los fármacos

Fármacos	Dosis (mg/Kg)	Tiempo de aplicación antes del reto con OA (min)	Reto con OA (mg/Kg)	n
Pirilamina	0.02	10	1	8
Indometacina	1.0	30	1	5
	3.1	30	1	7
	10.0	30	1	5
Dietilcarbamazina	10.0	5	1	5
Dexametasona	4.0	45	1	6
Grupo control			1	9

Como grupo control se empleó el grupo de animales inmunizados con OA y B. pertussis (n=9) que recibieron reto con 1 mg/Kg de OA durante el diseño del modelo de broncoconstricción alérgica.

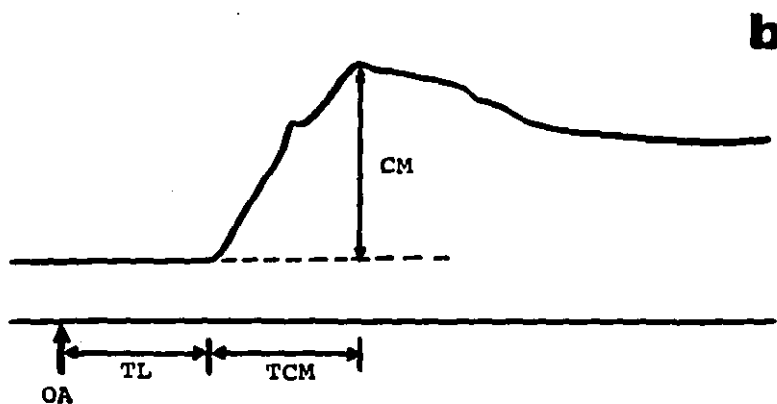
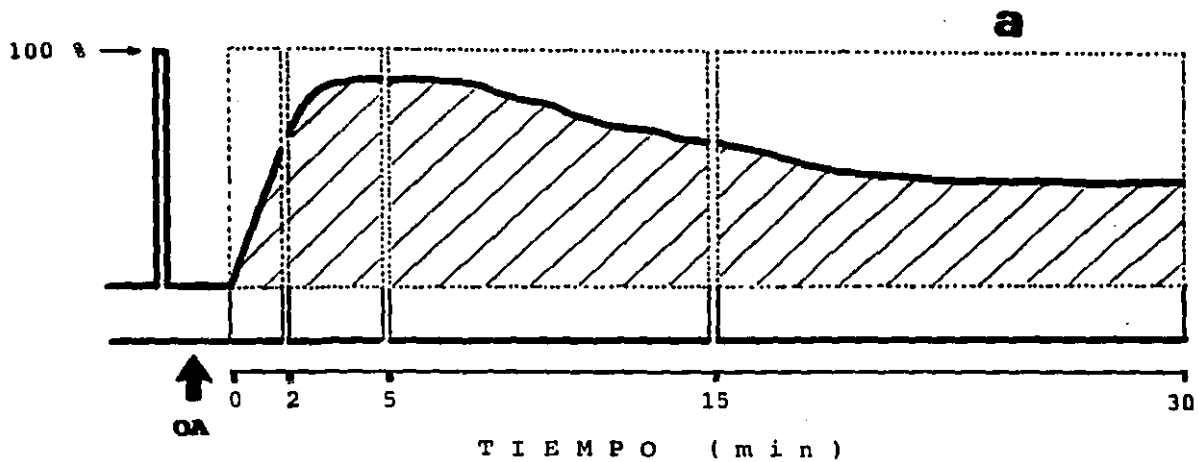


FIGURA 7. Evaluación del registro de broncoconstricción. a. El área bajo la curva (zonas con líneas diagonales) de cada intervalo de tiempo se evaluó como porcentaje del área que corresponde al 100% de obstrucción (rectángulos punteados). b. Evaluación del registro en cuanto a tiempo de latencia (TL), tiempo de la contracción máxima (TCM) y contracción máxima (CM).

Los procedimientos para registrar y valorar la broncoconstricción fueron los ya descritos en el apartado anterior.

Además, como variables adicionales para la mejor evaluación de la broncoconstricción se midieron los siguientes valores (fig. 7b): a) Tiempo de latencia (TL), es decir, el tiempo transcurrido entre la aplicación del reto antigénico y el inicio de la respuesta. b) Contracción máxima (CM), considerada como el grado máximo de obstrucción puntual alcanzado por cada animal en cualquier momento del registro. c) Tiempo de la contracción máxima (TCM), es decir, el tiempo requerido para alcanzar la contracción máxima, contando a partir del inicio de la respuesta.

#### **CUANTIFICACION DE LTC<sub>4</sub> INMUNORREACTIVO**

En este estudio bioquímico se cuantificó la concentración de LTC<sub>4</sub> inmunorreactivo (iLTC<sub>4</sub>) existente en el líquido obtenido por lavado broncoalveolar (LBA) de cobayos inmunizados pero sin reto antigénico, es decir, en estado basal (n=6) y de cobayos con broncoconstricción inducida por el reto antigénico (OA, 1 mg/Kg). Estos últimos lavados se efectuaron a los 2, 5 y 10 minutos de iniciada la broncoconstricción (n=6 por cada tiempo).

**Muestras.** Para tomar las muestras de LBA los animales fueron canulados y ventilados como ya fue descrito en "Método de registro". El LBA se realizó introduciendo lentamente con jeringa 10 ml de SS a temperatura ambiental a través de la cánula endotraqueal, con dos o tres aspiraciones suaves intermedias hasta recuperar el máximo volumen posible (aproximadamente entre



3 y 4 ml). En el caso muy ocasional de que se extrajera líquido broncoalveolar contaminado con sangre, la muestra y el cobayo se descartaron del estudio. La muestra fue centrifugada inmediatamente a 8000 x g por 2 minutos y el líquido sobrenadante almacenado a -80°C hasta su estudio. El tiempo transcurrido entre la obtención de la muestra y su refrigeración no fue mayor de 5 minutos. Puesto que este procedimiento provoca la muerte del animal, sólo se practicó un LBA a cada cobayo.

**Radioinmunoanálisis de iLTC.** El radioinmunoanálisis (RIA) para detectar iLTC. se practicó con reactivos comerciales (Leukotriene C. [<sup>3</sup>H]RIA kit, New England Nuclear, Boston, MA), el cual posee una sensibilidad de 0.25 ng/ml y, de acuerdo al instructivo del producto, tiene reactividad cruzada del 55% con LTD. Puesto que el LTD. es el principal compuesto originado por el LTC., y en vista de que ambos leucotrienos poseen una potencia biológica muy similar para muchas de sus actividades, incluyendo la broncoconstricción, la detección simultánea de LTC. y LTD. resulta ventajosa en el sentido de que se tiene mayor oportunidad de descubrir la concentración original de LTC. (LTC. más su principal metabolito, LTD.).<sup>21</sup> Por otra parte, la reactividad cruzada con compuestos no leucotrienos es insignificante, lo que reduce al mínimo la posibilidad de detección cruzada accidental de prostaglandinas, tromboxanos, ácidos grasos (incluyendo al precursor de LTC., el ácido araquidónico) y glutatión.

La realización del RIA se basó en el ensayo de competencia entre una concentración fija de un antígeno radiactivo (<sup>3</sup>HILTC.) y una concentración desconocida de antígeno no radiactivo (LTC.

presente en las muestras de LBA) por un número fijo de anticuerpos anti-LTC, obtenidos de conejo. Después de la reacción de estos tres compuestos, se eliminaron los antígenos libres (LTC, y [<sup>3</sup>H]LTC,) con carbón activado, dejando únicamente los complejos antígeno-anticuerpo. La cantidad de [<sup>3</sup>H]LTC, presente en los complejos antígeno-anticuerpo se midió con un contador de radiactividad beta (Beckman LS 100C) por 2 minutos y el resultado se expresó como cuentas por minuto (cpm). La concentración de LTC, en la muestra se determinó traspolando las cpm en una curva (cpm-[LTC,]) que se construyó utilizando concentraciones conocidas de LTC,. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado y se tomó el promedio de las cpm para la construcción de la curva y la traspolación.

## FARMACOS

La ovoalbúmina (J.T. Baker, S.A., México), el sulfato de isoproterenol, el maleato de pirilamina y el citrato de dietilcarbamazina (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) se disolvieron en SS. La indometacina (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) se disolvió en etanol (concentración final del etanol de 3.1%) adicionando 0.33 mg de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> por miligramo de indometacina. En 3 animales se comprobó que el etanol a esta concentración no tenía efecto sobre la respuesta broncoconstrictora. El fosfato sódico de dexametasona se empleó en presentación comercial (Alin<sup>®</sup> Lab. Chinoin, México). Todos los reactivos fueron preparados el mismo día de su aplicación y administrados por vía intravenosa en un volumen no mayor de 0.5 ml. La vacuna de Bordetella pertussis fue

generosamente donada por la Dirección General de Productos Biológicos y Reactivos, S.S.A., México.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el estudio farmacológico el grupo con reto antigénico simple se comparó con cada uno de los grupos que recibieron diversos fármacos. Las diferencias en el grado de broncoconstricción en cada periodo de tiempo, así como las diferencias en el TL y el TCM, se evaluaron empleando la prueba  $t$  de Student para observaciones no pareadas.

Se emplearon también el análisis de regresión de línea recta y el análisis de correlación de Pearson para investigar la posible asociación entre algunas de las variables estudiadas.<sup>72</sup> Para conocer la significancia del coeficiente de correlación ( $r$ ) se usó:

$$t = r((n-2)/(1-r^2))^{0.5} \quad \text{con } n-2 \text{ grados de libertad}$$

Los resultados se indican en el texto y las tablas como promedio y desviación estándar [ $\bar{X}(DE)$ ], y en las figuras como promedio y error estándar.

Con respecto al estudio bioquímico de las concentraciones de iLTC, en los LBA, en algunos casos el RIA no detectó iLTC, en las muestras (es decir, la concentración de iLTC, fue menor de 0.25 ng/ml), por lo cual se empleó la mediana como medida de tendencia central y se utilizaron pruebas no paramétricas (análisis de varianza por rangos de Kruskal-Wallis y prueba  $U$  de Mann-

Whitney<sup>73</sup>) para probar la significancia de las variaciones. Se compararon las muestras de cobayos inmunizados en estado basal (sin broncoconstricción) con las muestras tomadas a los 2, 5 y 10 minutos de iniciada la broncoconstricción.

El nivel de significancia se fijó en  $p < 0.05$  bimarginal.

## RESULTADOS

### MODELO DE BRONCOCONSTRICION

Durante el procedimiento de inmunización no hubo mortalidad de los cobayos nebulizados. Todos los animales que inicialmente recibieron OA y Bordetella pertussis presentaron broncoconstricción como respuesta al reto antigénico con las diferentes dosis de OA (fig. 8). La intensidad de esta respuesta fue

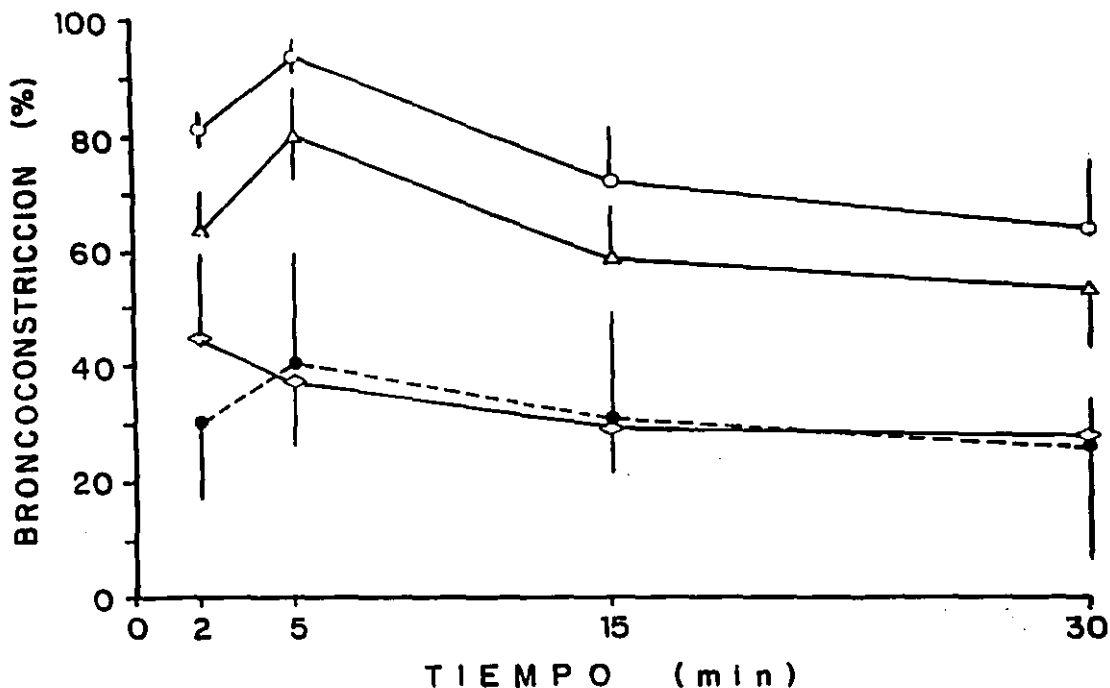


FIGURA 8. Respuesta broncoconstrictora al antígeno. La aplicación del antígeno a los animales sensibilizados con OA y Bordetella pertussis (símbolos blancos) provocó broncoconstricción dependiente de la dosis de OA (rombos, 0.31 mg/Kg; triángulos, 1 mg/Kg; círculos, 3.1 mg/Kg). Los círculos negros corresponden a las respuestas del grupo control sensibilizado con OA sin adyuvante. Cada símbolo representa el promedio de 5-9 animales y las líneas verticales el error estándar.

dependiente de la dosis, es decir, mientras mayor fue la concentración de OA aplicada mayor fue la broncoconstricción obtenida. Así, la administración de 0.31 mg/Kg de OA produjo respuestas moderadas que alcanzaron un promedio máximo y desviación estándar [ $\bar{x}(DE)$ ] de 44.3(33.1)%; el reto con 1 mg/Kg causó broncoconstricción más intensa con un valor máximo de 80.3(23.4)%, y la aplicación de 3.1 mg/Kg produjo broncoconstricción grave con promedio máximo de 93.5(7.21)%. Generalmente las respuestas aparecieron antes de un minuto después de la administración del reto antigénico y alcanzaron su máxima intensidad antes de los 10 minutos de iniciadas.

En contraste, el grupo control que sólo recibió OA durante su inmunización tuvo una respuesta broncoconstrictora leve al reto con 3.1 mg/Kg, respuesta que fue equivalente a la de una dosis 10 veces menor en el grupo experimental. Además, este grupo control tuvo una dispersión muy amplia de las respuestas.

Como se puede observar en las figuras 9 y 10, la administración de isoproterenol causó una disminución inmediata e importante de la respuesta broncoconstrictora al reto de 3.1 mg/kg de OA, inhibiendo su progresión ( $p < 0.001$  a  $p < 0.05$ ).

La Tabla 7 muestra los valores de la relación peso húmedo/peso seco de los parénquimas, y su equivalente expresado como contenido de agua. En comparación con los cobayos normales, tanto la inmunización como la aplicación del reto antigénico de 1 mg/kg no ocasionaron cambios significativos de estos parámetros. Por otra parte, el grupo que recibió reto antigénico (3.1 mg/kg) e isoproterenol (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) tuvo una disminución

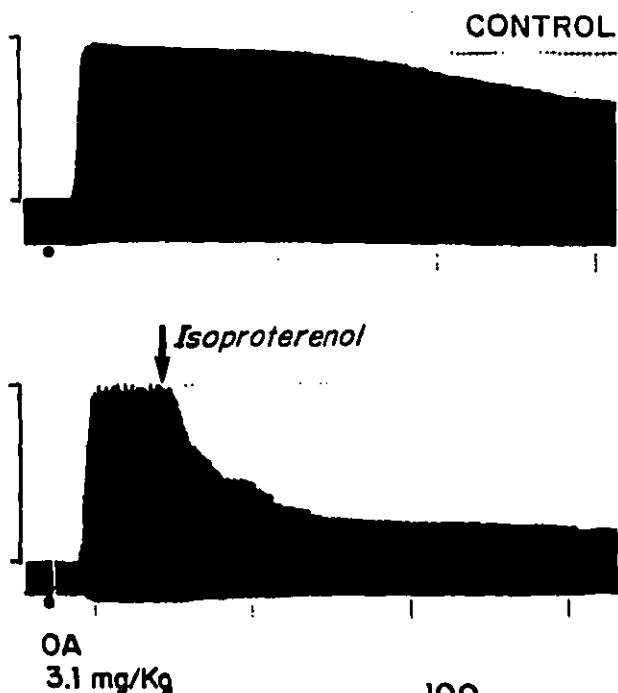


FIGURA 9. Efecto del isoproterenol sobre la broncoconstricción. Ejemplos de un registro de broncoconstricción inducida por 3.1  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de OA (arriba) y del isoproterenol (20  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) (abajo) sobre la evolución de la masa.

FIGURA 10. Efecto del isoproterenol sobre la broncoconstricción. La administración intravenosa de 20  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de isoproterenol a los 2 minutos de iniciada la broncoconstricción causó una reducción significativa de la masa. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

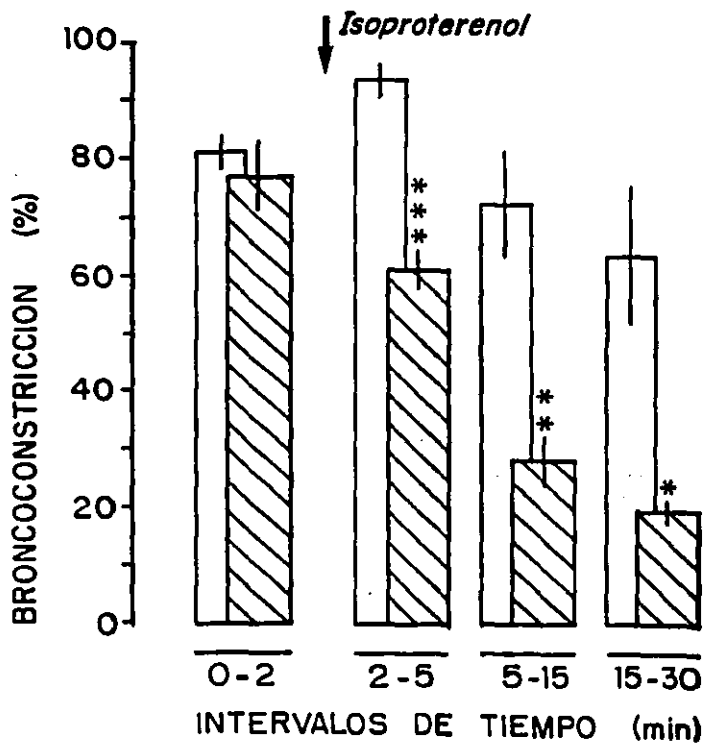


Tabla 7. Relación peso húmedo/peso seco de los parénquimas pulmonares,  $\bar{x}$ (D.E.)

Cobayos	n	Relación peso húmedo/peso seco	Porcentaje de líquido en la muestra	
Normales	8	4.84(0.12)	79.32(0.50)	] NS
Inmunizados	12	4.80(0.25)	79.10(1.06)	
Con reto antigénico*	6	4.80(0.22)	79.13(0.98)	] NS
Con reto antigénico e isoproterenol**	8	4.57(0.09)	78.13(0.43)	] p<0.05

\* Muestras obtenidas a los 10 minutos de la broncoconstricción inducida por 1  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de OA.

\*\* Muestras obtenidas a los 30 minutos de la broncoconstricción inducida por 3.1  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de OA, con administración de 20  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de isoproterenol a los 2 minutos de la respuesta.

NS Diferencia no significativa.

significativa del contenido de líquidos en el tejido pulmonar ( $p < 0.05$ ) al compararlo con los grupos de cobayos inmunizados con o sin reto antigénico.

En relación a la tensión arterial media, es importante señalar que 7 de los 24 animales estudiados fallecieron con hipotensión arterial grave; sin embargo, todos ellos presentaban invariablemente broncoconstricción prolongada y cercana al 100%, sugiriendo que la muerte fue debida a hipoventilación y no a choque anafiláctico. En apoyo a esta hipótesis, se encontró que en varios de estos animales agonizantes un pequeño aumento del volumen corriente, que permitiera algo de ventilación, evitaba su fallecimiento. Eliminando a estos animales del análisis, se observó que la tensión arterial mostró un incremento inicial acorde con el aumento en la broncoconstricción, pero rápidamente retornó a valores normales (fig. 11).



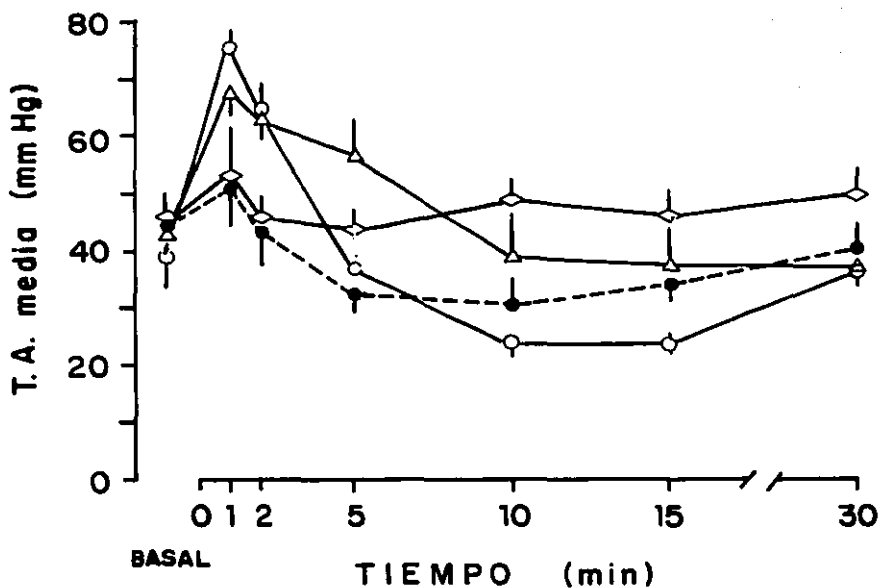


FIGURA 11. Modificaciones de la tensión arterial durante la broncoconstricción. Después de una elevación transitoria, la tensión arterial retornó a valores normales. A partir de los 15 minutos se eliminaron los animales que fallecieron con broncoconstricción cercana al 100% (4 del grupo con reto de 3.1 mg/Kg, 2 del de 1 mg/Kg y 1 del grupo control). Los símbolos corresponden a los de la figura 8.

Debido a que el reto antigénico de 1 mg/Kg de OA provocó respuestas broncoconstrictoras relativamente homogéneas y de intensidad aceptable (>50%), se decidió emplear esta dosis en todos los estudios subsiguientes.

## ESTUDIO FARMACOLOGICO

Los resultados obtenidos en los diferentes grupos estudiados se muestran en las figuras 12, 13 y 14 y en la tabla 8.

**Grupo control.** En el grupo control el reto antigénico con 1 mg/Kg de DA provocó broncoconstricción que en los primeros 2 minutos fue del 63.1(22.2)%, alcanzó su máximo de 80.3(23.4)% entre los 2 y 5 minutos y enseguida descendió para primero mantenerse en valores moderados [58.6(27.2)%] entre los 5 y 15 minutos y luego disminuir lentamente [53.1(29.1)%] entre los 15 y 30 minutos. El tiempo de latencia fue de 0.79(0.17) minutos, la contracción máxima alcanzó el 88.4(17.8)%, y el tiempo requerido para alcanzar dicha contracción fue de 1.28(1.07) minutos.

**Pirilamina.** La administración de pirilamina (20 µg/Kg) para bloquear los receptores histaminérgicos H<sub>1</sub> provocó una inhibición muy notable ( $p < 0.01$ ) de la respuesta al reto antigénico en cada uno de los intervalos de tiempo [28.7(24.1)%, 30.6(17.9)%, 27.0(6.7)% y 21.4(7.1)%, respectivamente]. Asimismo, causó una disminución de la contracción máxima [57.0(26.3)%,  $p < 0.05$ ] y un aumento del tiempo de la contracción máxima [5.09(4.88) minutos,  $p < 0.05$ ]. Sobre el tiempo de latencia también ocasionó una prolongación moderada [1.09(0.6) minutos] que, sin embargo, no fue estadísticamente significativa.

**Dietilcarbamazina.** La dietilcarbamazina (10 mg/Kg), fármaco inhibidor de la lipooxigenasa, tuvo un efecto profundo sobre todas las variables estudiadas. Así, este fármaco produjo una importante disminución del grado de broncoconstricción en cada uno de los intervalos de tiempo [14.0(12.8)%, 29.5(21.5)%,

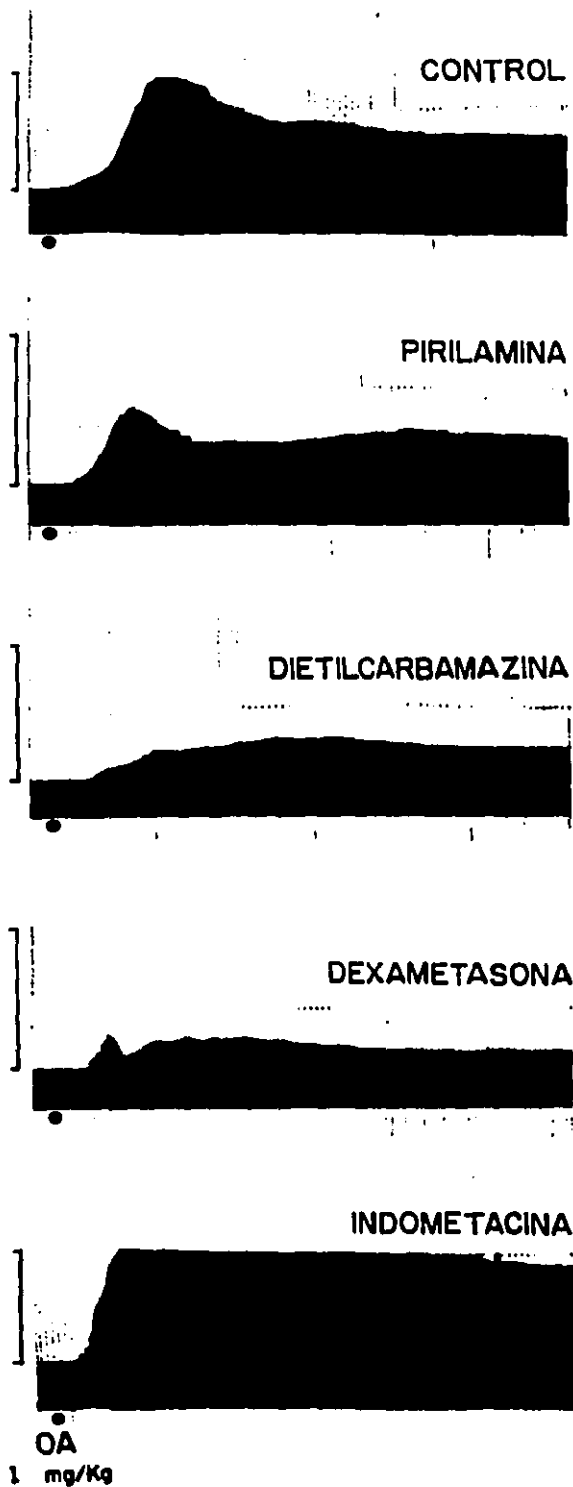


FIGURA 12. Ejemplos de los registros obtenidos. La línea antes del registro señala el 100% de obstrucción. Los círculos indican el momento de la aplicación del antígeno.

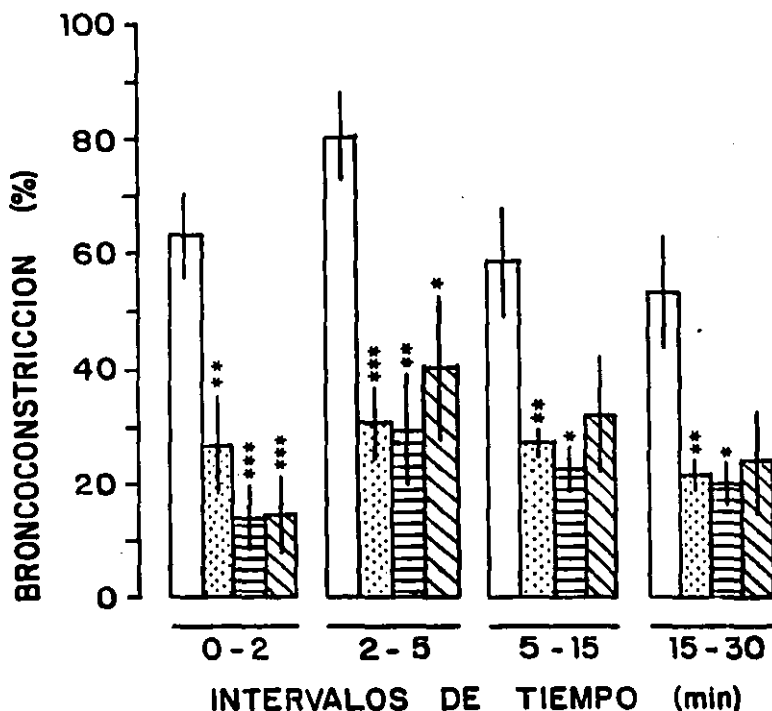


FIGURA 13. Efecto de la pirilamina, la dietilcarbazozina y la dexametasona sobre la broncoconstricción alérgica. Las barras representan el promedio y las líneas verticales el error estándar de 5-9 animales. Barras blancas = grupo control, barras punteadas = pirilamina (20 µg/Kg), barras con líneas horizontales = dietilcarbazozina (10 µg/Kg), barras con diagonales = dexametasona (4 µg/kg). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , en comparación con el grupo control.

22.4(9.2)% y 19.9(8.5)%, respectivamente]. Además, fue el único fármaco que retardó en forma significativa la aparición de la respuesta broncoconstrictora [tiempo de latencia de 1.40(0.34) minutos,  $p < 0.01$ ], y alargó a más del doble el tiempo requerido para obtener la contracción máxima [3.95(2.41) minutos,  $p < 0.01$ ]. La contracción máxima fue muy inferior a la del grupo control [35.4(33.8)% contra 88.4(17.8)%, respectivamente,  $p < 0.01$ ].

**Tabla 8. Tiempo de latencia, tiempo de la contracción máxima y contracción máxima en los diferentes grupos estudiados,  $\bar{X}$ (D.E.)**

	n	Tiempo de latencia (min)	Tiempo de la contracción máxima (min)	Contracción máxima (%)
Control	9	0.79(0.17)	1.28(1.07)	88.4(17.8)
Pirilamina	8	1.09(0.60)	5.09(4.88)*	57.0(26.3)*
Indometacina				
1 mg/Kg	5	0.78(0.19)	2.24(1.10)	95.1( 3.9)
3.1 mg/Kg	7	0.59(0.19)*	1.12(0.75)	91.3(15.1)
10 mg/Kg	5	0.78(0.23)	1.58(1.03)	94.7( 9.3)
Dietilcarbamazina	5	1.40(0.34)***	3.95(2.41)*	35.4(33.8)**
Dexametasona	6	0.94(0.19)	4.47(2.15)**	53.2(39.8)*

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, en comparación con el grupo control.

**Dexametasona.** Por su parte, la dexametasona (inhibidor de la fosfolipasa A<sub>2</sub>) también ocasionó modificaciones de las respuestas al reto antigénico. Disminuyó el grado de broncoconstricción en los primeros dos intervalos de tiempo [14.7(16.6)%, p<0.001 y 40.0(30.9)%, p<0.05, respectivamente], y aunque en los siguientes periodos la tendencia fue también a la disminución de la respuesta, ésta no fue estadísticamente significativa. La contracción máxima también se vio disminuida [53.2(39.8)%, p<0.05] así como el tiempo necesario para alcanzarla [4.47(2.15) minutos, p<0.01]. Este fármaco no tuvo efecto sobre el tiempo de latencia de la respuesta.

**Indometacina.** La aplicación de indometacina (inhibidor de la ciclooxigenasa) en tres diferentes concentraciones (1, 3.1 y 10 mg/Kg) provocó un ligero incremento en el grado de broncoconstricción en casi todos los intervalos de tiempo, el cual, sin embargo, no alcanzó significancia estadística en ninguno de ellos. Coincidiendo con lo anterior, se encontró que ninguna de las dosis estudiadas produjo modificaciones en la

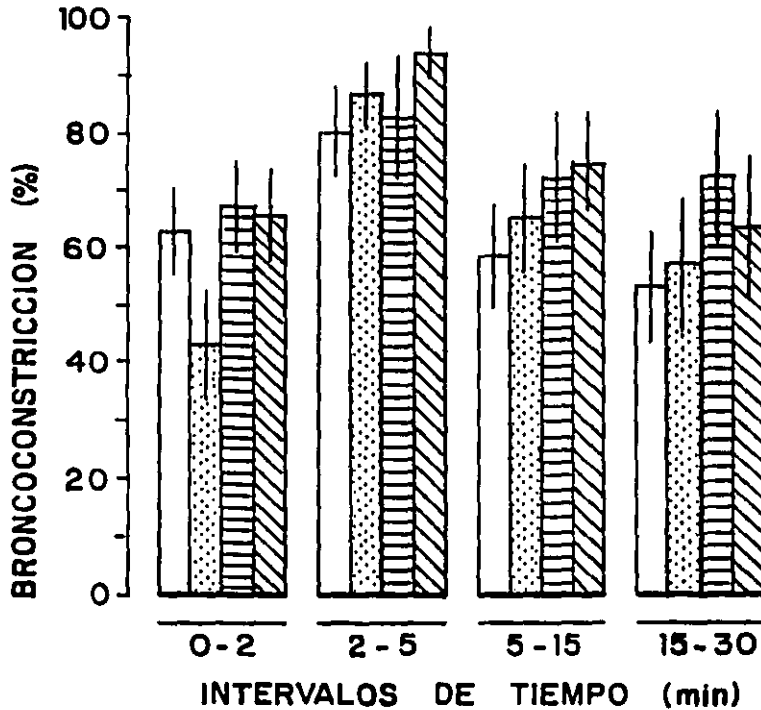


FIGURA 14. Efecto de la indometacina sobre la broncoconstricción alérgica. Las barras indican el promedio, y las líneas verticales el error estándar, de 5-9 animales. Barras blancas = grupo control. El resto de las barras corresponde a los grupos que recibieron indometacina (punteadas = 1 mg/Kg, con líneas horizontales = 3.1 mg/Kg, con diagonales = 10 mg/Kg).

contracción máxima ni en el tiempo requerido para alcanzar ésta.

No obstante, es interesante advertir que a dosis de 3.1 mg/Kg la indometacina causó un acortamiento significativo del tiempo de latencia, es decir, hizo que la respuesta broncoconstrictora tardara menos tiempo en aparecer en comparación con el grupo control [0.59(0.19) minutos contra 0.79(0.17) minutos, respectivamente,  $p < 0.05$ ].

Comparación entre contracción máxima y área bajo la curva. La forma más usual para evaluar la intensidad de la respuesta broncoconstrictora es midiendo la contracción máxima alcanzada. Sin embargo, consideramos probable que la medición del área bajo la curva del registro de broncoconstricción pudiera dar una representación más exacta de la evolución de la respuesta en el tiempo, por lo que se realizó un análisis de correlación comparando ambas variables en el cual se incluyeron los registros de todos los grupos (fig. 15a). Para este análisis se empleó el área total bajo la curva (0 a 30 minutos). Se encontró que existe una correlación muy estrecha entre ambas formas de medición, con  $r = 0.77$ ,  $p < 0.001$ , la cual se incrementa aún más si se emplea escala semilogarítmica ( $r = 0.85$ ) (fig. 15b). Sin embargo, es prudente hacer notar que con la evaluación como contracción máxima se obtienen regularmente porcentajes de obstrucción mucho más altos que con la evaluación como área bajo la curva.

Correlación entre las variables del registro. Al analizar la forma en que están interrelacionadas las variables que se emplearon para evaluar los registros, se encontró que la intensidad de la broncoconstricción (que sin duda es la variable de mayor relevancia en el asma) estaba en relación inversa tanto con el tiempo de latencia ( $r = -0.43$ ,  $p < 0.005$ ) como con el tiempo para la contracción máxima ( $r = -0.49$ ,  $p < 0.001$ ) (fig. 16 y 17). Dicho de otra manera, mientras más prolongado es el tiempo de latencia o mientras más tarda en alcanzarse la respuesta máxima,

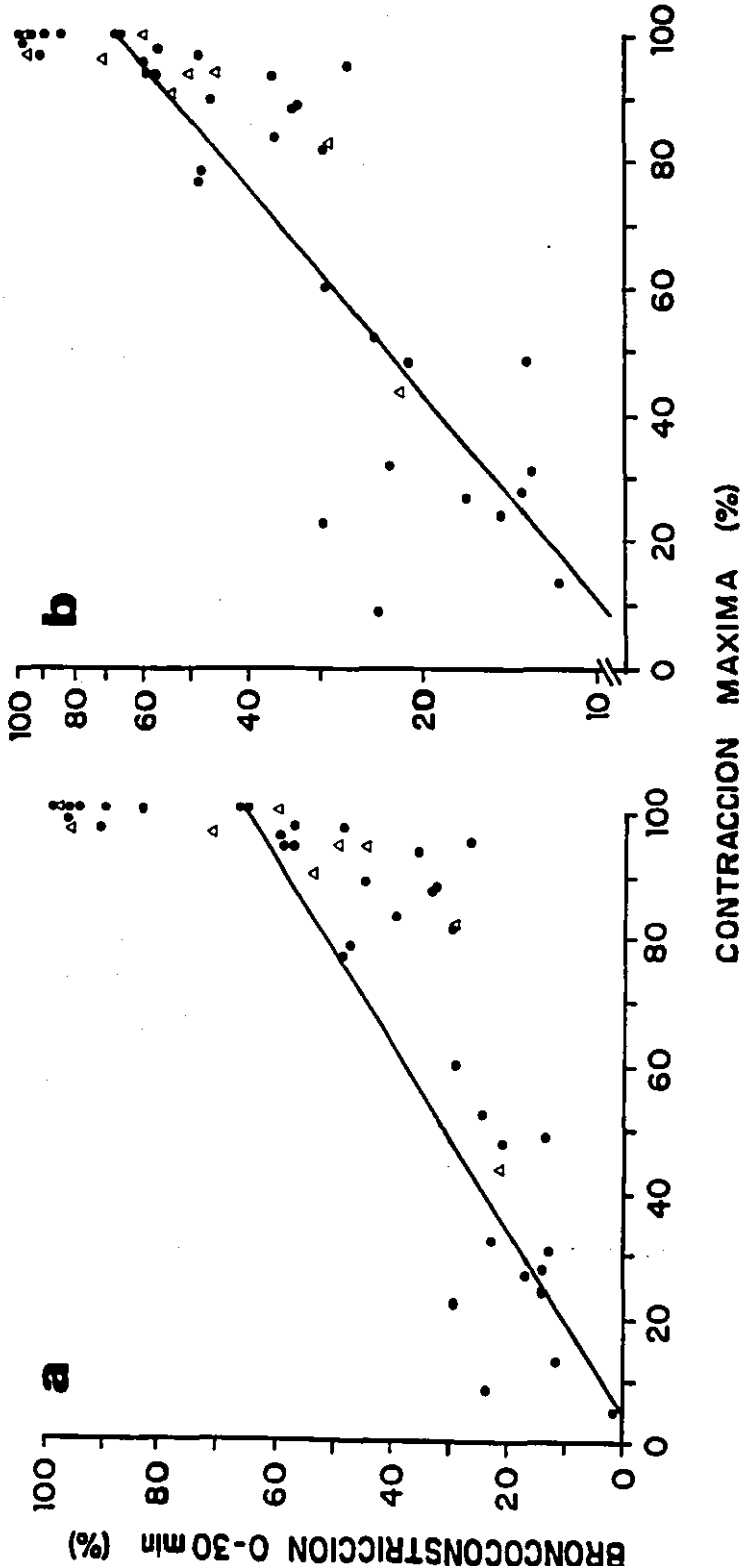


FIGURA 15. Correlación entre contracción máxima y broncoconstricción. En **a** la recta es  $y = 0.70971x - 4.5008$  con  $r = 0.77$  ( $p < 0.001$ ). En **b** el uso de eje 'y' logarítmico mejora la correlación, con recta  $\log y = 0.00921x + 0.9981$  y  $r = 0.95$  ( $p < 0.001$ ). Los triángulos representan los valores del grupo control.



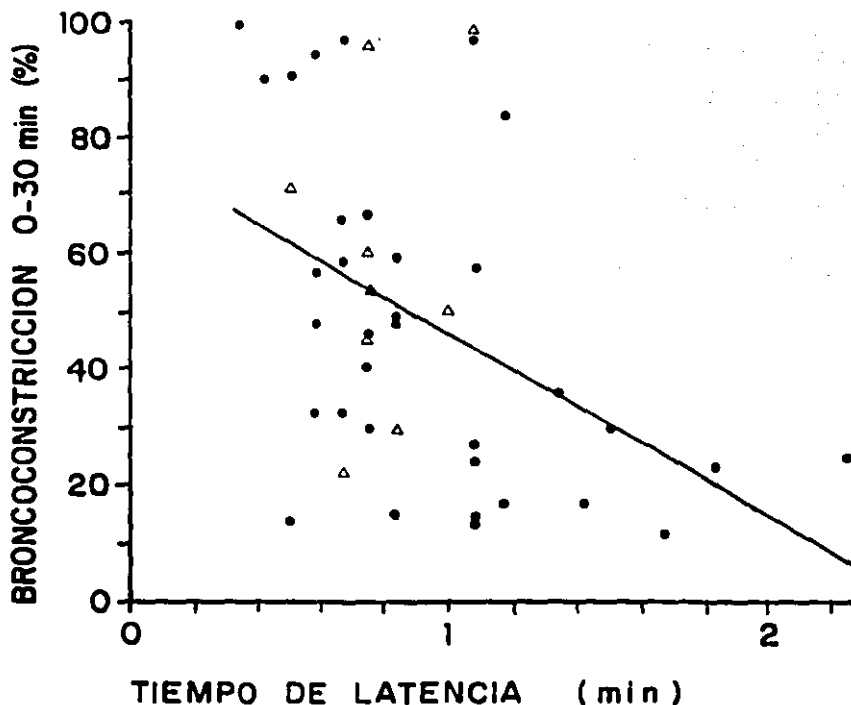


FIGURA 16. Correlación entre tiempo de latencia y broncoconstricción. La recta es  $y = -31.3788(x) + 77.5541$  con  $r = 0.43$  ( $p < 0.005$ ). Los triángulos representan los valores del grupo control.

de menor intensidad resulta la contracción total. Estas correlaciones se realizaron considerando el área total del registro e incluyendo los valores de todos los grupos estudiados. Al realizarlas en cada grupo por separado no alcanzaron significancia estadística.

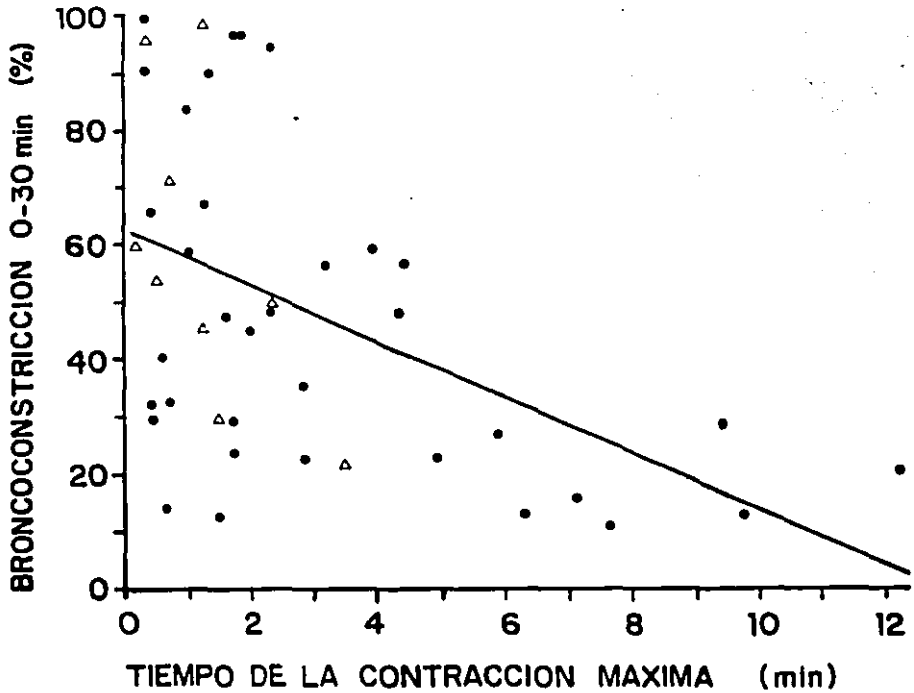


FIGURA 17. Correlación entre tiempo de la contracción máxima y broncoconstricción. La recta es  $y = -4.6385(x) + 62.5156$  con  $r = 0.49$  ( $p < 0.001$ ). Los triángulos representan los valores del grupo control.

#### CUANTIFICACION DE ILTC.

Las concentraciones de ILTC, en los LBA efectuados durante la broncoconstricción alérgica fueron muy variables en cada grupo estudiado (fig. 18). Así, el grupo de cobayos inmunizados que no recibieron reto antigénico tuvo concentraciones de ILTC, entre no

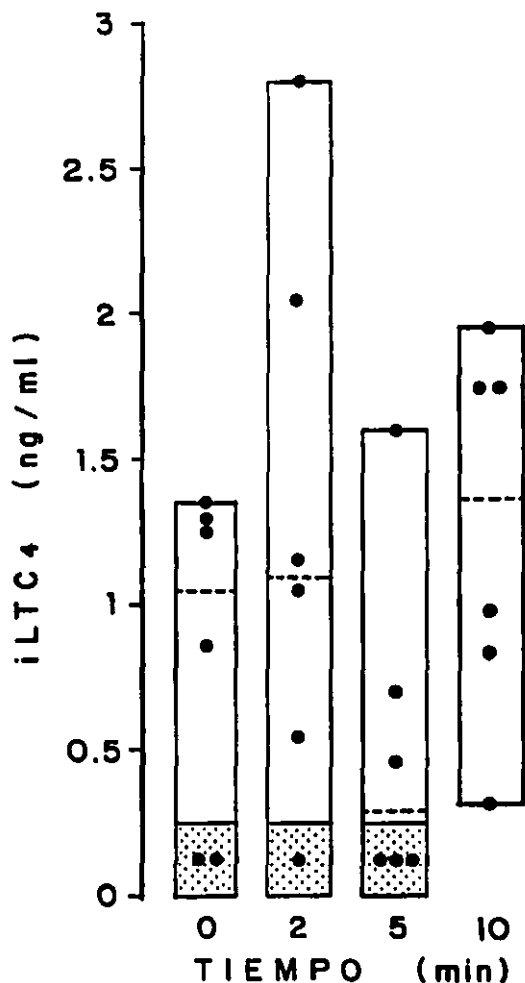


FIGURA 18. Concentración de iLTC<sub>4</sub> en los lavados broncoalveolares antes y durante la broncoconstricción. Las zonas sombreadas indican los valores de iLTC<sub>4</sub> no detectables por el radioinmunoanálisis.

detectables ( $< 0.25 \text{ ng/ml}$ ) y  $1.35 \text{ ng/ml}$ , con mediana de  $1.06 \text{ ng/ml}$ . A los 2 minutos de iniciada la respuesta las concentraciones variaron desde no detectables hasta  $2.80 \text{ ng/ml}$ , con una mediana de  $1.10 \text{ ng/ml}$ ; a los 5 minutos éstas fueron de no detectables a  $1.60 \text{ ng/ml}$ , con mediana de  $0.29 \text{ ng/ml}$  y,

finalmente, a los 10 minutos variaron de 0.32 a 1.95 ng/ml, con mediana de 1.37 ng/ml. No se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar a estos cuatro grupos entre sí, ni tampoco al comparar al grupo de cobayos en estado basal con cada uno de los grupos durante la broncoconstricción.

## DISCUSION

Es indudable que los modelos animales constituyen una herramienta poderosa para el estudio de las diversas enfermedades humanas, y que un buen modelo debe reproducir lo más fielmente posible las características propias de la enfermedad que se desea investigar. Con excepción de algunas pocas especies animales como el perro y el caballo, en las cuales puede existir hiperreactividad bronquial estacional,<sup>74,75</sup> en el resto de los animales no existe una enfermedad espontánea similar al asma humana.<sup>76</sup> Por lo anterior, para obtener un modelo animal de asma se requiere inducir de alguna manera la aparición de los fenómenos asmáticos deseados. La especie animal más empleada para este propósito ha sido el cobayo debido, entre otras cosas, a que el comportamiento de sus vías aéreas ante diversos estímulos físicos y químicos es similar al de las vías aéreas del ser humano.<sup>74</sup> Sin embargo, la gran mayoría de los modelos de asma en cobayos emplean inmunización activa inyectando al antígeno por vía intraperitoneal, subcutánea o ambas, y la respuesta broncoconstrictora que produce el reto antigénico solamente es parte de una reacción anafiláctica generalizada que suele llevar al animal a la muerte por hipotensión arterial severa e irreversible (choque anafiláctico).<sup>77</sup> Es evidente que estos aspectos difieren de la enfermedad humana, ya que en el paciente asmático la inmunización ocurre por vía inhalatoria, y la crisis asmática es una reacción predominantemente del aparato

respiratorio, con poca o ninguna alteración sistémica. El modelo de asma bronquial diseñado en este estudio satisface estos dos aspectos, ya que la inmunización se realiza por vía inhalatoria y el reto antigénico no produce choque anafiláctico. Este nuevo modelo de asma bronquial fue publicado recientemente.<sup>7\*</sup>

En cuanto a la respuesta broncoconstrictora en este modelo, encontramos que la OA a las dosis empleadas (0.31, 1 y 3.1 mg/Kg) provoca obstrucción de las vías aéreas cuya intensidad guarda relación directa con la dosis. Esta característica es importante puesto que permite realizar estudios relacionados a potenciación o inhibición de la broncoconstricción alérgica. Por otra parte, la relevancia del uso de Bordetella pertussis como adyuvante se demuestra porque en el grupo control (OA sin Bordetella) las respuestas al reto antigénico fueron en promedio de mucho menor intensidad y tuvieron una dispersión muy amplia. Al respecto, se sabe que la inoculación de Bordetella pertussis en ratones o niños sanos provoca hiperreactividad bronquial y cutánea, respectivamente, a diferentes agonistas,<sup>7\*</sup> y lo que es más importante, incrementa la producción de IgE,<sup>8\*</sup> lo cual favorece la aparición de reacciones de hipersensibilidad de tipo inmediata.

La medición de la presión de inflación pulmonar es un método simple para estimar la resistencia de las vías aéreas. Este método ha sido empleado por diversos grupos de investigadores,<sup>9,10\*</sup> y se ha encontrado que, aunque menos sensible, es comparable a mediciones más sofisticadas de la resistencia pulmonar.<sup>11\*</sup> Sin embargo, con este método no es

posible discernir si el aumento de la presión de inflación pulmonar es debido a un incremento real de la resistencia de las vías aéreas (broncoconstricción) o a disminución de la distensibilidad pulmonar por edema pulmonar. En el presente estudio encontramos que el isoproterenol logró revertir gran parte del aumento de la presión de inflación inducido por el reto antigénico, lo cual sugiere que este aumento de la presión es debido predominantemente a espasmo del músculo liso de las vías aéreas. Aunque esta reversión de la respuesta no fue completa al final de los 30 minutos del registro, se descartó que la respuesta remanente fuera debida a edema pulmonar, pues no hubo aumento de la relación peso húmedo/peso seco en comparación con los cobayos inmunizados sin reto antigénico. Por otra parte, comparando esta relación peso húmedo/peso seco en cobayos inmunizados y cobayos con reto antigénico, también se encontró que la respuesta al antígeno no se acompaña de edema pulmonar, por lo menos a los 15 minutos de la respuesta. Esto último concuerda con un estudio previo hecho en cobayos inmunizados, en el cual se encontró que la relación peso húmedo/peso seco no se modifica a las 1, 3, 6 y 24 horas de la aplicación del reto antigénico.\*

En relación a la tensión arterial media, no se encontró una disminución importante de ésta durante la broncoconstricción, lo cual sugiere que la respuesta al antígeno es principalmente pulmonar y no sistémica. Este último planteamiento es apoyado por un estudio previo realizado en nuestro laboratorio en un modelo de inmunización por vía intratraqueal en el cual se encontró que

el músculo liso uterino de estos animales era 1000 veces menos sensible al enfrentamiento antigénico comparado con el músculo liso uterino de animales inmunizados por vía intraperitoneal.<sup>10</sup>

Desde hace tiempo se acepta que la broncoconstricción inducida por el reto antigénico está causada básicamente por los diferentes mediadores químicos preformados o de nueva formación liberados por las células cebadas.<sup>11,12</sup>

En sujetos asmáticos se encontró que existe una elevación importante de histamina en sangre periférica entre 2 y 5 minutos después de aplicar un reto antigénico.<sup>13</sup> Asimismo, se ha encontrado que la liberación máxima de histamina por parte de células cebadas de pulmón humano y de tráquea de cobayo ocurre a los 2 minutos de aplicado el antígeno.<sup>14</sup> Estos y otros estudios de tipo farmacológico<sup>15-17</sup> sugieren que la parte inicial de la contracción inucida por el reto antigénico es producida por la histamina, mientras que en etapas subsecuentes de la contracción toman mucho mayor relevancia las acciones de otros mediadores químicos de nueva formación como  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , leucotrienos, FAP y tromboxanos. El alargamiento no significativo del TL y el importante retardo para alcanzar la contracción máxima que produjo la pirilamina concuerda con la consideración anterior sobre la gran participación de la histamina durante el principio de la respuesta. Sin embargo, con respecto a la intensidad de la broncoconstricción encontramos que la pirilamina disminuyó notablemente no sólo el inicio de la respuesta, sino que también la inhibió en todos los demás intervalos de tiempo estudiados. Este resultado sugiere que, al contrario de lo que se suponía



anteriormente, la histamina no sólo interviene en el inicio de la respuesta, sino que lo hace durante todo su desarrollo (por lo menos durante los 30 minutos estudiados). Este hallazgo es apoyado por el estudio de Rafferty y colaboradores,<sup>57</sup> en el cual la administración de terfenadina (antagonista H<sub>1</sub>) fue capaz de disminuir alrededor de un 50% el espasmo inducido por reto antigénico en sujetos asmáticos durante los 45 minutos del seguimiento. De igual forma, Daffonchio y colaboradores<sup>58</sup> encontraron que en cobayos sensibilizados la mepiramina inhibía alrededor de un 65% de la broncoconstricción inducida por el antígeno durante los 10 minutos del registro.

Por otro lado, es interesante la observación de que tanto la dietilcarbamazina como la dexametasona tuvieron un efecto inhibitorio similar al de la pirilamina sobre la evolución de la respuesta broncoconstrictora durante todos los intervalos de tiempo. El hecho de que ambos compuestos afecten incluso el primer intervalo de tiempo (0-2 minutos), en el cual la histamina es el principal autacoide involucrado, pudiera explicarse porque la inhibición de la 5-lipooxigenación del ácido araquidónico por estos fármacos impide la biosíntesis de 5-HPETE y 5-HETE, los cuales son necesarios para favorecer la liberación de histamina, al menos en experimentos in vitro en basófilos y células cebadas.<sup>53</sup>

En el presente estudio encontramos que en los LBA de cobayos sensibilizados, sin reto antigénico, existía una concentración basal de leucotrienos; estudios in vitro e in vivo también han encontrado la presencia de leucotrienos u otros mediadores en

condiciones basales, lo cual sugiere que normalmente hay liberación espontánea constante de estos autacoides.<sup>74-77</sup> Por otra parte, es probable que los leucotrienos, al movilizar calcio intracelular en el músculo liso de las vías aéreas, favorezcan la mayor reactividad a otros agonistas como histamina y acetilcolina.<sup>83</sup> De acuerdo a estas consideraciones, otra posible explicación de por qué la dietilcarbamazina y la dexametasona inhiben la fase inicial de la respuesta al antígeno es que la presencia de estos fármacos disminuye las concentraciones basales de los leucotrienos, y con ello evita su interacción con la histamina liberada. Una explicación similar puede darse para el alargamiento del TL y del TCM por la dietilcarbamazina.

Cabe destacar que la dexametasona, a diferencia de la dietilcarbamazina, no modifica el TL, a pesar de que también inhibe la producción de leucotrienos. Este efecto diferente puede explicarse por el hecho de que la inhibición de la fosfolipasa A<sub>2</sub> por la dexametasona también bloquea la biosíntesis de productos derivados de la ciclooxigenasa, entre ellos la PGE<sub>2</sub>, la cual es un potente inhibidor de la liberación de histamina por la célula cebada in vitro.<sup>84</sup> Si bien la inhibición de los leucotrienos conduciría a un alargamiento del TL, como ocurrió con la dietilcarbamazina, la inhibición de la PGE<sub>2</sub> provocaría un acortamiento del mismo al suprimir su inhibición sobre célula cebada. Tal acortamiento del TL se pudo corroborar cuando se inhibió la síntesis de prostaglandinas mediante la administración de indometacina. Se podría especular entonces que el bloqueo simultáneo de la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa por la

dexametasona anula ambos efectos, lo cual explica la falta de modificación del TL por este último fármaco.

En relación al broncospasmo en el resto de los intervalos de tiempo (2-30 minutos), tanto la dietilcarbamazina como la dexametasona disminuyeron la intensidad de la broncoconstricción, si bien este efecto fue más constante para la dietilcarbamazina y alcanzó significancia estadística. Puesto que la dexametasona posee mayor potencial teórico que la dietilcarbamazina para la inhibición de mediadores de broncoconstricción como leucotrienos, FAP o prostaglandinas constrictoras,<sup>33</sup> es probable que su irregularidad para producir inhibición en estos intervalos de tiempo se deba a que requiere de mayor tiempo de incubación para lograr sus efectos. De cualquier forma, es evidente que los leucotrienos desempeñan un papel importante no sólo en la fase inicial, como ya se comentó, sino también durante toda la broncoconstricción, como se pudo observar con el uso de dietilcarbamazina y dexametasona.

La administración de indometacina hizo que en general las respuestas al reto antigénico fueran de mayor intensidad en todos los intervalos de tiempo, no obstante, no se encontró significancia estadística en ninguno de ellos, probablemente porque la dosis empleada de OA (1 mg/Kg) produjo por sí misma respuestas de gran magnitud que dejaron escaso margen para que este efecto potenciador de la indometacina alcanzara significancia estadística. Esta tendencia al incremento de las respuestas concuerda con estudios tanto in vitro como in vivo en los que se demuestra potenciación del reto antigénico con el uso de

indometacina u otros agentes antiinflamatorios no esteroideos.<sup>33,34,35</sup> El mecanismo que se ha sugerido para explicar este efecto es que al estar inhibida la vía de la ciclooxigenasa hay mayor cantidad de Acido araquidónico que sufre 5-lipooxigenación con producción de leucotrienos.<sup>36</sup> Una explicación alternativa es que ocurre inhibición de alguna prostaglandina broncodilatadora (PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub> o PGI<sub>2</sub>) cuya presencia puede ser importante para contrarrestar la respuesta constrictora. En este último aspecto, podemos añadir que, puesto que la PGE<sub>2</sub> inhibe la degranulación de la célula cebada,<sup>37</sup> la falta de producción de esta prostaglandina permitiría que la célula cebada produzca mayor cantidad de mediadores ante el estímulo antigénico. Esta mayor liberación de mediadores con el uso de inhibidores de la ciclooxigenasa se ha demostrado en otros estudios.<sup>38,39</sup> Además, este incremento de mediadores podría explicar el acortamiento del TL que ocurrió en uno de los grupos con indometacina. Finalmente, en fecha reciente se ha sugerido que mecanismos vagales también están involucrados en esta potenciación inducida por indometacina.<sup>40</sup>

A través de RIA encontramos que en los LBA de cobayos inmunizados y sin espasmo existe una concentración basal de leucotrienos, lo cual concuerda con otros estudios.<sup>41,42</sup> Durante la respuesta broncoconstrictora no se produjeron modificaciones de importancia en esta concentración basal, lo cual sugiere que, por lo menos hasta los 10 minutos del reto antigénico, no se requiere de aumentos considerables de leucotrienos para que se presente la broncoconstricción, es decir, parece que no es el

efecto constrictor directo de los leucotrienos el responsable de la respuesta broncoconstrictora al antígeno. Sin embargo, el estudio farmacológico demostró claramente que los leucotrienos desempeñan un papel importante durante toda la respuesta, por lo que es probable que estas concentraciones basales de leucotrienos sean indispensables para que se manifieste plenamente la broncoconstricción.

En este sentido, Murray y colaboradores<sup>10</sup> no detectaron presencia de leucotrienos en los LBA de sujetos asmáticos con reto antigénico local in situ por broncoscopia, por lo menos durante los primeros 9 minutos del reto.

Algunos otros estudios han cuantificado iLTC<sub>4</sub> en sangre arterial de pacientes durante una crisis asmática, y han encontrado que su concentración es mayor comparada con la de sujetos normales.<sup>10,11</sup> Sin embargo, estos estudios no cuantificaron iLTC<sub>4</sub> antes de la crisis o en un periodo asintomático de estos mismos pacientes, por lo que no es posible determinar si en realidad existió un aumento de leucotrienos durante la crisis en comparación con su nivel basal.

De acuerdo a nuestros resultados, parecen existir múltiples interacciones entre los diversos mediadores químicos involucrados en la respuesta al antígeno, y no es posible responsabilizar a un sólo mediador en la fase inicial o subsecuentes de esta respuesta, puesto que la inhibición de histamina o leucotrienos afecta toda la respuesta, desde su inicio hasta el final del tiempo estudiado.

## CONCLUSIONES

1. La exposición a aerosoles de ovoalbúmina (antígeno) y Bordetella pertussis (adyuvante), seguida una semana después de exposición diaria a aerosoles de ovoalbúmina por 2 semanas más, provoca inmunización de las vías aéreas del cobayo contra la ovoalbúmina.
2. La aplicación intravenosa de ovoalbúmina a estos cobayos desencadena broncoconstricción, cuya intensidad depende de la dosis empleada, sin provocar choque anafiláctico.
3. La histamina participa importantemente durante toda la broncoconstricción alérgica.
4. Los leucotrienos influyen durante toda la broncoconstricción alérgica, pero aparentemente sin un aumento de su concentración local, lo cual sugiere que además de su efecto broncoconstrictor directo son muy importantes para facilitar la respuesta a otros mediadores constrictores liberados simultáneamente.
5. La inhibición farmacológica de la ciclooxigenasa tiende a producir una potenciación de la broncoconstricción alérgica.

## REFERENCIAS

1. American Thoracic Society Committee on Diagnostic Standards. Definition and classification of chronic bronchitis, asthma, and pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis* 85:762, 1962
2. Daniele RP. Pathophysiology of asthma, en Fishman AP (editor) "Pulmonary Diseases and Disorders", vol. 1, pág 567-576, McGraw Hill, Nueva York, 1980
3. Larsen GL. The late asthmatic response. *Chest* 93:1287-1289, 1968
4. Hargreave FE, Dolovich J, O'Byrne PM, Ramsdale EH y Daniel EE. The origin of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 78:825-832, 1986
5. Golden JA, Nadel JA y Boushey HA. Bronchial hyperirritability in healthy subjects after exposure to ozone. *Am Rev Respir Dis* 118:287-294, 1978
6. Empey DW, Laitinen L, Jacobs L, Gold WM y Nadel JA. Mechanisms of bronchial hyperreactivity in normal subjects after upper respiratory tract infections. *Am Rev Respir Dis* 113:131-139, 1976
7. Hall WJ y Hall CB. Infecciones bacterianas y virales en la etiología y el tratamiento, en Weiss EB, Segal MS y Stein M (editores) "Asma bronquial, mecanismos y terapéutica", 2da. ed., pág. 433-441, Intermédica España, Madrid, 1986
8. Hackney JD y Linn WS. Factores ambientales y asma: polución del aire y clima, en Weiss EB, Segal MS y Stein M (editores) "Asma bronquial, mecanismos y terapéutica", 2da. ed., pág. 443-449, Intermédica España, Madrid, 1986
9. Bonner JR. The epidemiology and natural history of asthma. *Clin Chest Med* 5:557-565, 1984
10. Ford RM. Etiology of asthma: A continuing review (8071 cases seen from 1970-1980). *Ann Allergy* 50:47-50, 1983
11. Cartier A, Thomson NC, Frith PA, Roberts R y Hargreave FE. Allergen-induced increase in bronchial responsiveness to histamine: relationship to the late asthmatic response and change in airway caliber. *J Allergy Clin Immunol* 70:170-177, 1982
12. Van Arsdale PP. Causas clínicas del asma, en Weiss EB, Segal MS y Stein M (editores) "Asma bronquial, mecanismos y terapéutica", 2da. ed., pág. 301-307, Intermédica España, Madrid, 1986

13. Ausdenmoore RW y Fisher TJ. Aerobiología y antígenos inhalantes, en Weiss EB, Segal MS y Stein M (editores) "Asma bronquial, mecanismos y terapéutica", 2da. ed., pág. 408-427, Intermédica España, Madrid, 1986
14. Turner-Warwick M. Inmunología del pulmón. Pág. 88. Editorial El Manual Moderno, México, 1980
15. Ishizaka T e Ishizaka K. Activation of mast cells for mediator release through IgE receptors. Prog Allergy 34:188-235, 1984
16. Kaliner M. Mast cell mediators and asthma. Chest 87(1 Supl.):2-5, 1985
17. Wasserman SI. The regulation of inflammatory mediator production by mast cell products. Am Rev Respir Dis 135:S46-S48, 1987
18. Friedman MM y Kaliner MA. Human mast cells and asthma. Am Rev Respir Dis 135:1157-1164, 1987
19. Barnes NC y Costello JF. Airway hyperresponsiveness and inflammation. Br Med Bull 43:445-459, 1987
20. Rosenthal RR, Norman PS, Summer WR y Permutt S. Role of the parasympathetic system in antigen-induced bronchospasm. J Appl Physiol 42:600-606, 1977
21. Gross NJ y Skorodin MS. Anticholinergic, antimuscarinic bronchodilators. Am Rev Respir Dis 129:856-870, 1984
22. Hogg JC. The pathology of asthma. Clin Chest Med 5:567-571, 1984
23. Hogg JC. Patología del asma, en Weiss EB, Segal MS y Stein M (editores) "Asma bronquial, mecanismos y terapéutica", 2da. ed., pág. 210-218, Intermédica España, Madrid, 1986
24. Holgate ST. Contribution of inflammatory mediators to the immediate asthmatic reaction. Am Rev Respir Dis 135:S57-S62, 1987
25. Holgate ST, Beasley R y Twentyman OP. The pathogenesis and significance of bronchial hyperresponsiveness in airways disease. Clin Sci 73:561-572, 1987
26. Douglas WW. Histamine and 5-hydroxytryptamine (serotonin) and their antagonists, en Goodman A, Goodman LS y Gilman A (editores) "The pharmacological basis of therapeutics", 6a. ed., pág. 609-646, Macmillan, Nueva York, 1980
27. White MV, Slater JE y Kaliner MA. Histamine and asthma. Am Rev Respir Dis 135:1165-1176, 1987



28. Brunelleschi S, Haye-Legrand I, Labat C, Norel X, Benveniste J y Brink C. Platelet-activating factor-acether-induced relaxation of guinea pig airway muscle: role of prostaglandin E<sub>2</sub> and the epithelium. *J Pharmacol Exp Ther* 243:356-363, 1987
29. Drazen JM. Chemical mediators of immediate hypersensitivity reactions, en Fishman AP (editor de sección) "Handbook of Physiology", sección 3, vol. III, parte 2. American Physiological Society, Baltimore, 1986
30. Johnson M, Carey F y McMillan RM. Alternative pathways of arachidonic metabolism: prostaglandins, tromboxane and leukotrienes. *Essays Biochem* 19:40-131, 1983
31. Drazen JM y Austen KF. Leukotrienes and airway responses. *Am Rev Respir Dis* 136:985-998, 1987
32. Russo-Marie F. Intracellular actions of steroids, en "Steroids in Asthma: Theory and Practice", pág. 11. Medical Education Services, Oxford, 1986
33. Levine L. Inhibition of the A-23187 stimulated leukotriene and prostaglandin biosynthesis of rat basophil leukemia (RBL-1) cells by non-steroidal anti-inflammatory drugs, antioxidants, and calcium channel blockers. *Biochem Pharmacol* 32:3023-3026, 1983
34. Flower RJ. Prostaglandin metabolism in the lung, en Bakhle YS y Vane JR (editores) "Metabolic Function of the Lung", pág. 85-119, Marcel Dekker, Nueva York, 1977
35. Fish JE, Ankin MG, Adkinson NF y Peterman VI. Indomethacin modification of immediate-type immunologic airway responses in allergic asthmatic and non-asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 123:609-614, 1981
36. Humes JL, Sadowski S, Galavage M, Goldenberg M, Subers E, Kuehl FA y Bonney RK. Pharmacological effects of non-steroidal antiinflammatory agents on prostaglandin and leukotriene synthesis in mouse peritoneal macrophages. *Biochem Pharmacol* 32:2319-2322, 1983
37. Peters SP, MacGlashan DW, Schulman ES, Schleimer RP, Hayes S, Rokach J, Adkinson NF y Lichtenstein LM. Arachidonic acid metabolism in purified human lung mast cells. *J Immunol* 132:1972-1979, 1984
38. Spannhake EW, Hyman AL y Kadowitz PJ. Bronchoactive metabolites of arachidonic acid and their role in airway function. *Prostaglandins* 22:1013-1025, 1981
39. Henderson WR. Eicosanoids and lung inflammation. *Am Rev Respir Dis* 135:1176-1185, 1987

40. Moncada S, Flower RJ y Vane JR. Prostaglandins, prostacyclin and thromboxane A<sub>2</sub>, en Goodman A, Goodman LS y Gilman A (editores) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", 6a. ed., pág. 668-681, Macmillan, Nueva York, 1980
41. Nowak J. Eicosanoids and the lung. *Ann Clin Res* 16:269-286, 1984
42. Coleridge HM, Coleridge JCG, Ginzel KH, Baker DG, Banzett RB y Morrison MA. Stimulation of 'irritant' receptors and C-fibers in the lung by prostaglandins. *Nature* 264:451, 1976
43. Lewis RA, Austen KF, Drazen JM, Clark DA, Marfat A y Corey EJ. Slow reacting substances of anaphylaxis: identification of leukotrienes C-1 and D from human and rat sources. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:3710-3714, 1980
44. Lewis RA y Austen KF. The biologically active leukotrienes. Biosynthesis, metabolism, receptors, functions and pharmacology. *J Clin Invest* 73:889-897, 1984
45. O'Driscoll BRC y Kay AB. Leukotrienes and lung disease. *Thorax* 37:241-245, 1982
46. Stjernschantz J. The leukotrienes. *Med Biol* 62:215-230, 1984
47. Goldyne ME. Leukotrienes: clinical significance. *J Am Acad Dermatol* 10:659-668, 1984
48. Goetzl EJ, Wong MYS y Matthey MA. Leukotrienes in human hypersensitivity and inflammatory diseases, en Otterness I (editor) "Advances in Inflammation Research", vol. 11, pág. 47-55, Raven Press, Nueva York, 1986
49. Dahlén SE, Hedqvist P, Hammarström S y Samuelsson B. Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. *Nature* 288:484, 1980
50. Goetzl EJ y Pickett WC. Novel structural determinants of the human neutrophil chemotactic activity of leukotriene B. *J Exp Med* 153:482, 1981
51. Chung KF, Aizawa H, Leikauf GD, Ueki IF, Evans TW y Nadel JA. Airway hyperresponsiveness induced by platelet-activating factor: role of thromboxane generation. *J Pharmacol Exp Ther* 238:580-584, 1986
52. Chung KF y Barnes PJ. PAF antagonists. Their potential therapeutic role in asthma. *Drugs* 35:93-103, 1988
53. Burka JF. The interaction of histamine with other bronchoconstrictor mediators. *Can J Physiol Pharmacol* 65:442-447, 1987

54. Braquet P, Mencia-Huerta JM, Chabrier PE, Touqui L y Vargaffig BB. The promise of platelet-activating factor. *ISI Atlas of Science: Pharmacology*, pAg. 187-198, 1987
55. Benveniste J. A role for Paf-acether (platelet-activating factor) in bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 135:S2-S4, 1987
56. Jancar S, Theriault P, Braquet P y Sirois P. Comparative effects of platelet activating factor, leukotriene D<sub>4</sub> and histamine on guinea pig trachea, bronchus and lung parenchyma. *Prostaglandins* 33:199-208, 1987
57. Rafferty P, Beasley R y Holgate S. The contribution of histamine to immediate bronchoconstriction provoked by inhaled allergen and adenosine 5' monophosphate in atopic asthma. *Am Rev Respir Dis* 136:369-373, 1987
58. Daffonchio L, Lees IW, Payne AN y Whittle BJR. Pharmacological modulation of bronchial anaphylaxis induced by aerosol challenge in anaesthetized guinea-pigs. *Br J Pharmacol* 91:701-708, 1987
59. Malo PE, Muccitelli R, Tucker SS y Wasserman MA. Effects of SK&F 93944 (temelastine), a potent histamine H<sub>1</sub>-receptor antagonist in pharmacologic and antigen-induced bronchoconstriction. *Meth Find Exptl Clin Pharmacol* 8:461-468, 1986
60. Dahlen SE, Kumlin M, Bjorck T, Raud J y Hedqvist P. Leukotrienes and related eicosanoids. *Am Rev Respir Dis* 136:S24-S28, 1987
61. Bisgaard H. Leukotrienes and prostaglandins in asthma. *Allergy* 39:413-420, 1984
62. Samter M y Beers RF. Intolerance to aspirin. Clinical studies and consideration of its pathogenesis. *Ann Intern Med* 68:975-983, 1968
63. Szczeklik A. Anti-cyclo-oxygenase agents and asthma. *J Asthma* 20(S1):23-29, 1983
64. Lee TH. Interactions between alveolar macrophages, monocytes, and granulocytes. Implications for airway inflammation. *Am Rev Respir Dis* 135:S14-S17, 1987
65. Barnes PJ. Inflammatory mediator receptors and asthma. *Am Rev Respir Dis* 135:S26-S31, 1987
66. Bienenstock J, Tomioka M, Stead R, Ernst P, Jordana M, Gauldie J, Dolovich J y Denburg J. Mast cell involvement in various inflammatory processes. *Am Rev Respir Dis* 135:S5-S8, 1987

67. Douglas JS y Brink C. Histamine and prostanoids. Am Rev Respir Dis 136:521-524, 1987
68. Schulman ES. The role of mast cell derived mediators in airway hyperresponsiveness. Chest 90:578-583, 1986
69. Hirshman CA y Downes H. Asma experimental en animales, en Weiss EB, Segal MS y Stein M (editores) "Asma bronquial, mecanismos y terapéutica", 2da. ed., pag. 278-297, Intermédica España, Madrid, 1986
70. Kőnzett H y Rőssler R. Versuchsanordnung zu Untersuchungen an der Bronchialmuskulatur. Arch Exp Path Pharmac 195:71-74, 1940
71. Smith JB y Aharony D. Measurement of leukotrienes, en "Leukotrienes in Cardiovascular and Pulmonary Function", pag. 29-33, Alan R. Liss Inc., 1985
72. Daniel WW. "Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud", Editorial Limusa, México, 1984
73. Siegel S. "Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta", Editorial Trillas, México, 1985
74. Patterson R y Kelly JF. Animal models of the asthmatic state. Ann Rev Med 25:53-68, 1974
75. Derksen FJ, Scott D, Robinson NE, Slocombe RF y Armstrong PJ. Intravenous histamine administration in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). Am J Vet Res 46:774-777, 1985
76. Muccitelli RM, Tucker SS, Hay DWP, Torphy TJ y Wasserman MA. Is the guinea pig trachea a good in vitro model of human large and central airways? Comparison on leukotriene-, methacholine-, histamine- and antigen-induced contractions. J Pharmacol Exp Ther 243:467-473, 1987
77. Kallős P y Kallős L. Experimental asthma in guinea pigs revisited. Int Arch Allergy appl Immunol 73:77-85, 1984
78. Vargas MH, Montaña LM, Páramo I y Selman ME. An inhalatory method using ovalbumin and Bordetella pertussis for inducing allergic bronchoconstriction in guinea pigs. Med Sci Res 15:179-180, 1987
79. Frick OL. Immediate hypersensitivity, en Stites DP, Stobo JD, Fudenberg HH y Wells JV (editores) "Basic & Clinical Immunology", 4a. ed., pag. 250-276, Lange Medical Publications, Los Altos CA, 1982

80. Kirkpatrick CH. Asthma and atopic hypersensitivity, en Kirkpatrick CH y Reynolds HY (editores) "Immunologic and Infectious Reactions in the Lung", Marcel Dekker Inc., Nueva York, 1976
81. Bonnet J. The roles of the lipoxygenase and cyclooxygenase pathways in PAF-acether induced bronchospasm in the guinea-pig, en Benveniste J y Arnoux B (editores) "INSER Symposium No.23 (Abstracts). Elsevier Science Publishers, 1983
82. Lundberg JM y Saria A. Bronchial smooth muscle contraction induced by stimulation of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Acta Physiol Scand* 116:473-476, 1982
83. Grundström N y Andersson RGG. In vivo demonstration of alpha-2-adrenoceptor-mediated inhibition of the excitatory non-cholinergic neurotransmission in guinea pig airways. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 328:236-240, 1985
84. Jeffries E, Paré PD y Hogg JC. Measurements of airway edema in allergic bronchoconstriction in the guinea pig. *Am Rev Respir Dis* 123:687-688, 1981
85. Montaño LM, Selman M, Páramo I, Vargas MH. Broncoconstricción alérgica aguda en el cobayo: ventajas de la inmunización intratraqueal. *Arch Invest Med (Méx)* 18:37-50, 1987
86. Howarth PH y Holgate ST. Comparative trial of two non-sedative H<sub>1</sub>-antihistamines, terfenadine and astemizole, for hay fever. *Thorax* 39:668-672, 1984
87. Allen DH, Mathison DA, Wagner PD, Arroyave CM y Tan EM. Mediator release during allergen-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects. *Chest* 75:235-238, 1979
88. Schleimer RP, Macglashan DW, Peters SP, Pinckard RN, Adkinson NF y Lichtenstein LM. Characterization of inflammatory mediator release from purified human lung mast cells. *Am Rev Respir Dis* 133:614-617, 1986
89. Udem BJ, Pickett WC y Adams GK. Antigen-induced sulfidopeptide leukotriene release from the guinea pig superfused trachea. *Eur J Pharmacol* 142:31-37, 1987
90. Darius H, Lefer DJ, Smith JB y Lefer AM. Role of platelet-activating factor-acether in mediating guinea pig anaphylaxis. *Science* 232:58-60, 1986
91. Mansour S y Daniel EE. Mechanisms of response to antigen in isolated guinea pig trachea after active sensitization. *Can J Physiol Pharmacol* 64:1566-1571, 1986
92. Lamm WJE, Lai Y-L y Hildebrandt J. Histamine and leukotrienes mediate pulmonary hypersensitivity to antigen in guinea pigs.

J Appl Physiol 56:1032-1038, 1984

93. Richards IM, Griffin RL, Oostveen JA, Elfring G y Conder GA. Role of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism in Ascaris antigen-induced broncho-constriction in sensitized dogs. J Pharmacol Exp Ther 245:735-741, 1988
94. Gravelyn TR, Pan PM y Eschenbacher WL. Mediator release in an isolated airway segment in subjects with asthma. Am Rev Respir Dis 137:641-646, 1987
95. Peters SP, Lichtenstein LM y Adkinson NF. Mediator release from human lung under conditions of reduced oxygen tension. J Pharmacol Exp Ther 238:8-13, 1986
96. Marone G, Kagey-Sobotka A y Lichtenstein LM. Effects of arachidonic acid and its metabolites on antigen-induced histamine release from human basophils in vitro. J Immunol 123:1669-1677, 1979
97. Tung R, Kagey-Sobotka A, Plaut M y Lichtenstein LM. H<sub>2</sub> antihistamines augment antigen-induced histamine release from human basophils in vitro. J Immunol 129:2113-2115, 1982
98. Kikuchi Y, Okayama H, Okayama M, Sasaki H y Takishima T. Interaction between histamine and vagal stimulation on tracheal smooth muscle in dogs. J Appl Physiol 56:590-595, 1984
99. Murray JJ, Tonnel AB, Brash AR. Release of prostaglandin D<sub>2</sub> into human airways during acute antigen challenge. N Engl J Med 315:800-804, 1986
100. Okubo T, Takahashi H, Sumitomo M, Shindoh K y Suzuki S. Plasma levels of leukotriene C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub> during wheezing attack in asthmatic patients. Int Arch Allergy Appl Immunol 84:149-155, 1987
101. Schonfeld W, Koller M, Knoller J, Koning W, Muller W y Hardt Hvd. Leukotrienes and their metabolism in plasma and bronchial fluids. J Allergy Clin Immunol 75:126, 1985