



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización de la hiperreactividad de las vías
aéreas en un modelo de ratón usando
pletismografía barométrica en animales
anestesiados y en libre movimiento**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

P R E S E N T A:

Arlette Bohórquez Hernández



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Jaime Chávez Alderete
2010**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno
Bohórquez
Hernández
Arlette
56718620
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
301628563
2. Datos del tutor
Dr.
Jaime
Chávez
Alderete
3. Datos del sinodal 1
Dr.
Luis
Montaño
Ramírez
4. Datos sinodal 2
M. en C.
María Eugenia Bettina
Sommer
Cervantes
5. Datos sinodal 3
Dr.
José Luis
Arreola
Ramírez
6. Datos sinodal 4
Méd. Cir.
Luis Alberto
Cóbar
Benard
7. Datos del trabajo escrito
Caracterización de la hiperreactividad de las vías aéreas en un modelo de ratón usando pletismografía barométrica en animales anestesiados y en libre movimiento.
46 p.
2010

Dedicatorias

A la vida por darme la oportunidad de conocer personas, lugares y experiencias maravillosas y no tan maravillosas y poder aprender de todos ellos.

A mis padres Noel y Mary por su apoyo incondicional y sin reservas, por enseñarme que puedo ser y hacer todo lo que me proponga, los amo y los llevo siempre conmigo,

A mis hermanos Noel, Ricky, Ludwin por sus consejos y apoyo, son los mejores amigos y críticos que podría imaginar, se que siempre puedo contar con ustedes.

A mi abuela Fide y Xochilita son un gran ejemplo de vida.

A toda mi familia que está siempre presente este donde este.

Al Dr. Jaime Chávez Alderete por sus consejos y guía ha sido un amigo siempre dispuesto a resolver problemas y dudas aun cuando algunas fueron puramente existenciales, gracias por la paciencia prácticamente infinita y por ayudarme a comprender que los límites existen solo donde tú decides que estén.

A la familia Santos por todo su apoyo y cariño.

A mis amigos incondicionales Héctor, Jeanin.

A mis compañeros de laboratorio.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

A todos gracias por el apoyo incondicional y la paciencia sin ustedes jamás hubiera logrado.

Por creer en mí...

¡¡¡Gracias!!!!

Índice

Introducción.....	7
<i>Asma</i>	7
<i>Hiperreactividad de vías aéreas</i>	8
<i>Evaluación de la hiperreactividad de vías aéreas</i>	9
<i>Modelo murino</i>	10
<i>Modelos de sensibilización con ovoalbúmina</i>	12
<i>Participación de leucotrienos como mediadores de la respuesta alérgica</i>	12
<i>Planteamiento del problema</i>	14
<i>Hipótesis</i>	16
<i>Objetivo general</i>	17
<i>Objetivos</i>	17
<i>Material y métodos</i>	18
<i>Animales</i>	18
<i>Protocolos de sensibilización</i>	18
<i>Evaluación de la hiperreactividad de vías aéreas a metacolina</i>	24
<i>Conteo celular diferencial</i>	25
<i>Análisis estadístico</i>	25
<i>Resultados</i>	26
Efecto de la instilación de cysLTs sobre las vías aéreas.....	26
<i>Modelos de sensibilización con ovoalbúmina</i>	30
<i>Discusión</i>	37
<i>Conclusión</i>	41
<i>Bibliografía</i>	42

Abreviaturas

DP, dosis provocativa

HRB, hiperreactividad bronquial

HVA, hiperreactividad de vías aéreas

i.n. intranasal

i.p. intraperitoneal

i.v. intravenoso

LBA, lavado bronquealveolar

LTC₄, leucotrieno C₄

LTD₄, leucotrieno D₄

MCh, metacolina

OVA, ovoalbúmina

Penh, enhanced pause

PFE, pico del flujo espiratorio

PFI, pico de flujo inspiratorio

R_L, resistencia pulmonar

rpm, revoluciones por minuto

Rt, tiempo de relajación

SSF, solución salina fisiológica

Te, tiempo espiratorio

µg, microgramos

µl, microlitros

Introducción

Asma

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica muy frecuente en los humanos y representa un grave problema de salud pública. Se estima que la prevalencia mundial de esta enfermedad es de aproximadamente 5-10% de la población (2). En nuestro país se presenta en la misma proporción y se ha reportado que aumenta considerablemente en regiones ubicadas a nivel del mar (3). Las principales características de individuos con este padecimiento son que dan positivo en pruebas cutáneas a alérgenos, sufren sibilancias intermitentes, sus valores de IgE séricos varían en la normalidad alta (100UI/ml-1000UI/ml), con respecto a los niveles normales (<1-1417UI/ml) y presentan eosinofilia moderada (200-500 eosinófilos /ml) con respecto a valores normales que oscilan de los 20-350 eosinófilos/ml, así como marcada hiperreactividad de vías aéreas (HVA) (4).

Se caracteriza por un proceso inflamatorio crónico de las vías aéreas en el que predominan diversas células como eosinófilos o linfocitos Th2 y puede haber una pequeña contribución de células T_c2 CD8⁺ (5-6), aunque la participación de otros tipos celulares que liberan mediadores que inducen contracción del músculo liso como las células cebadas, macrófagos, neutrófilos y epiteliales son también de suma importancia. Muchas citocinas Th2 (como IL-4, IL-5, IL-6, IL13) tienen el potencial de modular la inflamación, particularmente IL-13 que induce hiperreactividad de las vías aéreas (1) tanto IL-13 como IL-4 son citocinas clave en la regulación y síntesis del cambio de isotipo a IgE, mientras que IL-5 está involucrada en el proceso de inflamación por eosinófilos (7) al igual que algunos productos derivados del ácido araquidónico como los leucotrienos (8).

La inflamación también produce un incremento de la HVA asociado a una gran variedad de estímulos tanto endógenos como exógenos (9).

En muchos casos, esta inflamación es producida por una reacción alérgica desencadenada por múltiples factores como son los ácaros, pólenes, proteínas animales (10), humo del cigarro y ozono, así como infecciones de las vías

respiratorias, climas extremos, cambios bruscos de temperatura, stress, así como algunos medicamentos como la aspirina en pacientes con sensibilidad a ella (11). En individuos con este padecimiento esta inflamación causa episodios recurrentes de sibilancias y presión en el pecho, falta de aire y tos persistente, particularmente por las noches o temprano por la mañana, debido a una compleja serie de interacciones bioquímicas que incluyen una disminución del cortisol, la temperatura, la saturación de oxígeno, la epinefrina y de la función fisiológica de los receptores β_2 . Esta situación fisiopatológica se manifiesta a través de la HVA, el aumento de mediadores de inflamación y de tono vagal (12). Dichos cambios están asociados al ciclo circadiano el cual influye en los niveles de mediadores de inflamación, células inflamatorias y en los niveles hormonales (13). Estos episodios están usualmente asociados con una obstrucción del flujo de aire de las vías aéreas; esta obstrucción varía en intensidad y es reversible de manera espontánea o con el uso de fármacos broncodilatadores como el salbutamol (mientras no se haya disminuido la función fisiológica de los receptores β_2).

Hiperreactividad de vías aéreas.

La presencia de inflamación en las vías aéreas ocasiona que se vuelvan “inestables” y respondan de forma exagerada a estímulos diversos produciendo una disminución del calibre traqueo-bronquial. A esta mayor sensibilidad de las vías aéreas se le denomina hiperreactividad bronquial (HRB) (Guidelines for the diagnosis and management of asthma, 1997). Una forma de evaluar la HRB en la clínica es administrar concentraciones crecientes de metacolina y medir la función pulmonar después de cada concentración hasta que ocurre un 20% de obstrucción. Con esta curva dosis-respuesta se puede calcular la dosis necesaria para provocar un 20% de obstrucción, a lo que se denomina PD20. Por lo tanto, la PD20 es una medida de HRB en humanos, es decir, de la facilidad con que se obstruyen las vías aéreas.

Se ha observado que cuando el paciente asmático es expuesto a cualquier estímulo constrictor se puede provocar una obstrucción aguda de las vías aéreas, también llamada crisis asmática. Más aún, algunas horas después de la exposición a dicho estímulo o reto antigénico e incluso aunque ya haya desaparecido la obstrucción, el paciente desarrolla una exacerbación de la HVA.

La HVA es un componente clave del asma, aunque el mecanismo de desarrollo de la HVA aun no es completamente entendido. La importancia de la HVA en la patogénesis del asma ha sido sugerido por su correlación con la severidad de esta enfermedad y un posible mecanismo por el cual se produce es por una incrementada contractilidad del músculo liso de las vías aéreas porque con la inhalación de un agonista de los receptores β_2 el broncospasmo puede ser revertido rápidamente en la mayoría de los asmáticos (2).

Evaluación de la hiperreactividad de vías aéreas.

La pletismografía barométrica en animales mecánicamente ventilados.

El enfoque clásico para determinar la función pulmonar en modelos animales, principalmente en ratones, es la medición de la resistencia pulmonar (R_L) y la compliancia dinámica o distensibilidad pulmonar (C_{dyn}) en respuesta a agonistas broncoconstrictores no específicos. En 1988, Martin y col. demostraron la confiabilidad de la medición de estos dos parámetros en ratones anestesiados y mecánicamente ventilados (14) es el método clásico para la caracterización precisa y específica de la mecánica pulmonar. La R_L es la suma de la resistencia de la vía aérea (R_{aw}) y del tejido (R_{ti}). La determinación de dichos parámetros resulta en un mejor entendimiento de la mecánica pulmonar, además de proveer un mecanismo para la determinación de la HVA.

Para evaluar la HVA en modelos animales se mide la disminución en la DP 100, 150 o 200; el corrimiento a la izquierda de la curva de dicho parámetro también indica HVA. En modelos animales *in vivo* se administran agentes broncoconstrictores colinérgicos como la metacolina (MCh) en dosis crecientes ya sea por vía intravenosa o de forma inhalada; dichas concentraciones se traducen en un cambio en los valores de R_L comparado con la basal.

Pletismografía barométrica en animales respirando espontáneamente.

En la pletismografía barométrica de libre movimiento los ratones son colocados dentro de una cámara cerrada y se miden las fluctuaciones en la presión que ocurren durante el ciclo respiratorio (15).

Usando un transductor de presión diferencial se miden las diferencias entre la cámara principal del pletismógrafo donde el animal es colocado y la cámara de referencia con relación a la presión atmosférica del lugar. De esta curva de tiempo-presión muchos parámetros pueden ser obtenidos incluyendo frecuencia respiratoria, tiempo espiratorio e inspiratorio, así como la presión máxima durante la espiración y la inspiración. De la señal de presión durante la espiración y la inspiración y el tiempo de comparación de la espiración temprana y tardía se puede calcular un parámetro adimensional llamado "enhanced pause" (Penh) (16,17).

Para entender los mecanismos de HVA utilizando la pletismografía barométrica, diferentes modelos animales de asma alérgica han sido desarrollados incluyendo perros (18), cobayos (19), ratas (20,21) y ratones (22,23).

Modelo murino.

Uno de los modelos animales ampliamente usados para entender el comportamiento de diferentes enfermedades incluyendo las respiratorias es el murino, debido entre otras cosas, al fácil acceso a su información genética, ya que se conoce su código genético completo y es fácilmente manipulable; provee de una de las más poderosas herramientas para realizar experimentos altamente controlados en mamíferos (24). Los ratones son el modelo animal para el estudio de enfermedades alérgicas de vías aéreas preferido por diversos profesionales de la ciencia alrededor del mundo, esto debido a las ventajas sobre otros modelos experimentales las cuales incluyen su ciclo reproductivo corto y tamaños de camada grande. Por otro lado es un animal pequeño, manejable y muy usado en el laboratorio ya que es una especie que cuenta con muchas cepas consanguíneas diferentes y el conocimiento de la biología del ratón es vasta (25). Para el ratón existe un número abundante de anticuerpos y sondas de cDNA así como

bibliotecas genómicas para cada cepa, son relativamente baratos en comparación con otros animales experimentales y su mantenimiento aun en condiciones de alta seguridad es relativamente sencillo; la habilidad para criar y cruzar los animales transgénicos, la disponibilidad de marcadores genéticos confiables, la relativamente fácil inducción de modificaciones genéticas y el relativo bajo costo de mantenimiento hacen del ratón un excelente modelo de experimentación en enfermedades humanas (27, 28).

La habilidad de determinar *in vivo* la función respiratoria de un ratón en el laboratorio es de gran interés debido al importante papel que juegan estos animales en la investigación biomédica, farmacología y toxicológica (26).

Esta especie es particularmente útil para medir las respuestas inflamatorias debido a que la clase de anticuerpos homocitotrópicos en la inflamación pulmonar murina es IgE (27, 28) que es similar a la encontrada en los humanos asmáticos (29,30). La cepa BALB/c de ratón es la más utilizada en los estudios de experimentación del asma porque es la que presenta una mayor respuesta de anticuerpos IgE específicos de antígeno tras una inmunización completa. Esto se traduce en niveles hasta 20 veces superiores de IgE específica frente a las cepas tradicionalmente denominadas como poco respondedoras (C57Bl/6, C57Bl/10) (34, 35).

Los ratones que presentan inflamación de las vías aéreas inducida por un antígeno son ampliamente usados como modelos animales de asma alérgica incluyendo HVA. Kato y col (22), (31) demostraron que la inhalación repetida de ovoalbúmina (OVA) en ratones provoca un incremento en la HVA a la acetilcolina (ACh) administrada intravenosa. En otros estudios se encontró que la sensibilización con OVA induce eosinofilia e incremento de citocinas inflamatorias IL-4, IL-5, IL-6 (8) en el lavado bronqueoalveolar, así como incremento de IgE en plasma, lo que reproduce lo observado en pacientes con asma. Schramm y col. (23) también reportaron la inducción de HVA usando OVA.

Los animales usados como modelos asmáticos (cobayos o ratones) son sensibilizados al alérgeno usando diferentes vías de administración. Uno de los modelos clásicos de sensibilización y que ha sido ampliamente aplicado (20), (23),

(32-34) involucra el uso de ovoalbúmina como alérgeno, aunque actualmente existe una amplia variedad de modelos de asma que usan otros alérgenos como *Ambrosia* spp, polen de olivo, excremento de cucaracha, leucotrienos, etc. (35). También varían los tiempos de sensibilización, la vía de administración y la dosis dependiendo del autor al que uno se refiera.

Modelos de sensibilización con ovoalbúmina.

La OVA es la principal proteína de la clara del huevo y pertenece a la superfamilia proteínica de las serpinas donde su principal actividad es inhibir a las peptidasas, aunque a diferencia de la mayoría de serpinas la OVA tiene actividad limitada (36). Usando OVA y una variedad de antígenos los investigadores han sido muy exitosos desarrollando modelos de asma con inflamación alérgica aguda y HVA como sus principales características (37). El modelo de sensibilización usando OVA ha sido ampliamente utilizado debido a su relativa facilidad y a la manera en que induce las características propias de un cuadro de asma.

Experimentos con modelos animales retados con OVA han ayudado a identificar algunas citocinas que regulan el desarrollo de HVA en al asma (38).

Participación de leucotrienos como mediadores de la respuesta alérgica.

Los leucotrienos (LTs) son mediadores lipídicos generados a partir del ácido araquidónico (AA) por la acción de la 5- lipooxigenasa (LOX-5) que juegan un papel importante en la patogénesis del asma (39), (40). La liberación del AA se produce a partir de los fosfolípidos de las membranas celulares como resultado de la activación de la fosfolipasa A₂ o C_β. El AA es el sustrato de diversas enzimas, entre las cuales destacan las ciclooxigenasas (COX) y las lipooxigenasas (LOX). Los LTs se forman a partir de la acción de la LOX-5 que necesita a la *five-lipoxygenase-activating-protein* (FLAP por sus siglas en inglés). La interacción entre AA, FLAP y LOX-5 genera un compuesto altamente inestable denominado 5-HPETE (*5-hidroperoxyeicosatetraenoic acid*), el cual es transformado en 5-HETE (*5-hidroxyeicosatetraenoic acid*) o convertido en leucotrieno A₄ (LTA₄); este último puede ser convertido por medio de la LTA₄

hidrolasa en leucotrieno B₄ (LTB₄), que es un potente mediador inflamatorio (41) sintetizado por diferentes tipos celulares como monocitos, macrófagos alveolares y neutrófilos (42-43) o transformado en leucotrieno C₄ (LTC₄) a través de la LTC₄ sintasa. El LTC₄ es transformado en leucotrieno D₄ (LTD₄) por medio de una γ -glutamil leucotrienasa y a su vez metabolizado a leucotrieno E₄ (LTE₄) por una dipeptidasa. La vía metabólica de los derivados del ácido araquidónico se presenta resumida en la Fig.1.

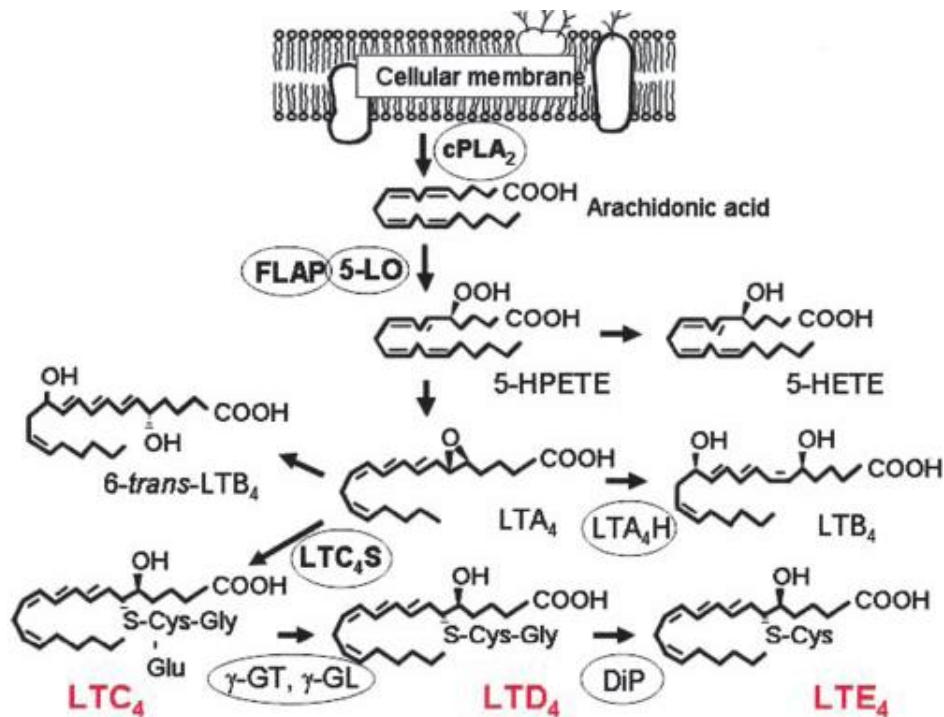


Fig. 1 Vía metabólica LTs involucrados en los procesos asmáticos. La fosfolipasa A₂ (cPLA₂) cataliza la liberación de ácido araquidónico de la membrana celular. 5-LO se transloca a la membrana nuclear y requiere de la proteína FLAP para convertir al ácido araquidónico en el precursor LTA₄. LTA₄ puede convertirse espontáneamente en el metabolito inactivo 6-trans LTB₄ y puede ser hidrolizado a LTB₄ por la LTA₄ hidrolasa (LTA₄H) o conjugado con glutatión reducido por la LTC₄ sintasa (LTC₄S) formando LTC₄, la primera molécula comprometida de los cysLTs. Después de la exportación específica por medio de proteínas de membrana (MBD1, MBD2), el LTC₄ es convertido en LTD₄ principalmente por la γ -glutamil transpeptidasa o la leucotrienasa (γ -GT, γ -GL) y a LTE₄ por una dipeptidasa (44).

Los cisteinil leucotrienos (cysLTs) como el (LT) C₄, LTD₄, y LTE₄, son conjugados lipídicos producidos por eosinófilos, basófilos, células cebadas y macrófagos alveolares (45). Originalmente identificados por su actividad constrictora en el músculo liso del intestino delgado y los bronquios, son ahora reconocidos como potentes mediadores inflamatorios que inician y propagan diversas respuestas biológicas (44). Los cysLTs causan broncoconstricción, aumento de la permeabilidad vascular e hipersecreción de moco, elevación del

calcio intracelular, hiperreactividad del músculo liso bronquial, contracción de la vena pulmonar y quimiotaxis de eosinófilos entre otros procesos. (39), (42), (46, 47). En muestras de lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes asmáticos, los niveles de cysLTs se encuentran elevados en comparación con los de sujetos sanos (48) y en diversos modelos animales de asma se ha comprobado que el reto antigénico induce la liberación a la vía aérea de cysLTs entre otros mediadores proinflamatorios (49-51).

Los cysLTs producen sus efectos mediante la interacción con sus receptores cys LT1 y cys LT2 (52, 53) que están acoplados a una proteína G heterodiméricas $\beta\gamma$ con una subunidad $G_{\alpha q}$. La activación de estas proteínas favorece el incremento de los niveles de calcio intracelular a través del trifosfato de inositol (IP_3) generado por la fosfolipasa- $C\beta$, lo que conlleva a una contracción del músculo liso. Sin embargo, se conoce muy poco la relación que pudiera existir entre la vía de señalización de los cysLTs y otras rutas metabólicas (35).

Al respecto Chávez y Col. (2006) demostraron que la administración intranasal aguda de LTC_4 o de IL-13 induce HVA e inflamación. Señalaron que en este modelo animal, la HVA se relaciona con la activación de la vía de señalización STAT6, mientras que la expresión de los receptores de LTC_4 y de IL-13 está mutuamente regulada por estos agentes inflamatorios.

Planteamiento del problema

El asma es una enfermedad que va en aumento cada año y es necesario contar con modelos experimentales que recreen las características principales del padecimiento como la hiperreactividad bronquial, inflamación y broncospasmo de las vías aéreas y que la HVA sea cuantificada usando metodologías confiables y precisas. En la actualidad existe una controversia entre la pletismografía barométrica como método de cuantificación experimental en animales mecánicamente ventilados (R_L) y en animales respirando espontáneamente (Penh). En el presente trabajo se usaron estas dos metodologías para caracterizar la hiperreactividad de vías aéreas en un modelo murino.

Hipótesis

- I. La administración intranasal de cysLTs de manera aguda, induce un incremento en la sensibilidad del músculo liso de las vías aéreas a la metacolina.
- II. La sensibilización crónica con ovoalbúmina induce un incremento significativo en la sensibilidad del músculo liso de las vías aéreas.
- III. El grado de inflamación entre ambos modelos de sensibilización será diferentes.
- IV. Los resultados tanto en animales anestesiados como en libre movimiento correlacionarán.
- V. La respuesta de las vías aéreas entre las cepas de ratones Balb/c y C57BL/6 no será diferente.

Objetivo general.

Caracterizar la hiperreactividad de vías aéreas en dos cepas de ratón (Balb/c y C57BL/6) comparando dos métodos de sensibilización usando ovoalbúmina y cysLTs, mediante el uso de la pletismografía barométrica en animales que respiran espontáneamente (Penh) y ventilados mecánicamente (R_L).

Objetivos

- Demostrar que la administración intranasal de LTC₄ o LTD₄ induce un decremento significativo en la dosis provocativa a la metacolina evaluada mediante dos técnicas de pletismografía barométrica en ratones Balb/c y C57BL/6.
- Demostrar que la sensibilización crónica con OVA correlaciona con los datos obtenidos usando la administración intranasal de cysLTs.
- Determinar el grado de inflamación en las vías aéreas inducido por ambos métodos de sensibilización.
- Determinar las diferencias de HVA y de inflamación entre cada cepa de ratón.

Material y métodos

Animales.

Para este estudio se usaron ratones Balb/c y C57BL/6 de sexo indistinto de entre 8-12 semanas de edad mantenidos en condiciones convencionales de bioterio (aire filtrado, 21 ± 1 °C, con un 50-70% de humedad, en cama estéril) con acceso a agua y alimento *ad libitum* con un ciclo de luz y oscuridad de 12-12 horas de acuerdo a las normas establecidas por el Comité Bioético del INER. Todos los animales fueron sacrificados a las 24 horas posteriores al último reto de OVA, LTC₄ o LTD₄.

Diseño experimental

Con el propósito de comprobar el desarrollo de la hiperreactividad de las vías aéreas en el modelo con OVA y cysLTs se realizaron experimentos usando la técnica de pletismografía barométrica en animales anestesiados y en libre movimiento para analizar la respuesta de la vía aérea a la metacolina (MCh) por vía intravenosa o inhalada.

Protocolos de sensibilización:

Sensibilización con cysLTs.

Cada ratón del grupo experimental fue sensibilizado mediante la instilación i.n. de LTC₄ o LTD₄. Cada animal fue sedado con éter y posteriormente instilado i.n. con una dosis de 10 µg/kg dos veces al día durante tres días consecutivos. Al grupo control se le instiló solución salina fisiológica 0.9% (SSF); este protocolo de sensibilización se resume en la tabla 1.

Experimentales	Controles
----------------	-----------

Día	Mañana	Tarde	Mañana	Tarde
	1	i.n. LTC ₄ / LTD ₄	IN LTC ₄ / LTD ₄	SSF
2	i.n. LTC ₄ / LTD ₄	IN LTC ₄ / LTD ₄	SSF	SSF
3	i.n. LTC ₄ / LTD ₄	i.n.LTC ₄ / LTD ₄	SSF	SSF
4	Curva MCh		Curva MCh	

TABLA 1. Modelo de sensibilización usando cysLTs.

Sensibilización con OVA.

Vía intranasal.

Los animales fueron sensibilizados de acuerdo a un protocolo previamente publicado por Seok y col. (54). Posteriormente, este protocolo fue modificado para adecuarlo a nuestras condiciones de laboratorio.

Los ratones fueron inyectados i.p. al inicio y 7 días después con una suspensión de 100 µg de OVA y 4 mg de hidróxido de aluminio en 0.4 ml de SSF 0.9%. Una semana después, los ratones fueron sedados e instilados i.n. con 10 µg de OVA en 50 µl de SSF durante tres días consecutivos (días 14,15 y 16); al grupo control se le administró SSF. De 18 a 20 horas posteriores a este último reto, se realizó la curva dosis respuesta a MCh. El proceso de sensibilización con OVA resumido se muestra en la tabla 2.

Día	Procedimiento
0,7	i.p.
14,15,16	i.n.

TABLA 2. Modelo de sensibilización en ratones usando OVA y Al (OH)₃ como coadyuvante.**Vía inhalada e intranasal.**

El día 0 además de la inyección i.p. con una suspensión de 100 µg de OVA y 4 mg de hidróxido de aluminio en 0.4 ml de SSF 0.9%, se administró otra inyección s.c. con la misma dosis. El día 7 a cada ratón se le administró otra inyección i.p. con la dosis ya mencionada. Una semana después de la segunda inyección, los ratones fueron sedados y se les administraron 10 µg de OVA i.n. en 50 µl de SSF durante tres días consecutivos (días 14,15 y 16). Los días 17 y 23, los ratones fueron nebulizados con una solución de 5 mg/ml de OVA durante 30 minutos, usando un nebulizador ultrasónico (Bennet, Mod.US-1, California, USA) y el día 24 se realizó la curva dosis respuesta a MCh. El proceso resumido de sensibilización con OVA se muestra en la tabla 3.

Día	Procedimiento
0	i.p./sc
7	i.p.
14,15,16	i.n.
17,23	Nebulizado 30 min 5 mg/ml
24	Curva MCh

TABLA 3. Modelo de sensibilización inhalado e intranasal.

Vía inhalada.

Los animales fueron sensibilizados de acuerdo a un protocolo previamente publicado por Kato y col. (22), posteriormente este protocolo fue modificado para adecuarlo a nuestras condiciones de laboratorio.

Los ratones fueron inyectados i.p. al inicio y cinco días después con una suspensión de 8 µg de OVA y 2 mg de hidróxido de aluminio; posteriormente en los días 12,16 y 20 fueron nebulizados con una solución de 5 mg/ml de OVA por un periodo de 30 minutos. Al día siguiente se realizó la curva dosis respuesta a MCh. El proceso resumido de sensibilización con OVA se muestra en la tabla 4.

Día	Procedimiento
0,5	i.p.
12,16,20	Nebulizado 30 min 5 mg/ml
21	Curva MCh

TABLA 4. Modelo de sensibilización inhalado.

Vía subcutánea e inhalada.

Otro grupo de ratones fue sensibilizado de la siguiente manera: el día 0, además de la inyección i.p. con una suspensión de 100 µg y 4 mg de hidróxido de aluminio en 0.4 ml de SSF 0.9%, se administró otra inyección subcutánea con la misma dosis de la anterior en el mismo volumen. El día 5 se inyectó 100 µg y 4 mg de hidróxido de aluminio en 0.4 ml de SSF 0.9% i.p, los días 12, 16, 20, 24 y 28 fueron nebulizados con una solución de 5 mg/ml de OVA por un periodo de 30 minutos. Al día siguiente se realizó la curva dosis respuesta a MCh. El proceso resumido de sensibilización con OVA se muestra en la tabla 5.

Día	Procedimiento
0	i.p./sub
5	i.p.
12,16,20,24,28	Nebulizado 30 min 5 mg/ml
29	Curva MCh

TABLA 5. Modelo de sensibilización.

Pletismografía barométrica para animales que respiran espontáneamente.

Cada uno de los ratones fue colocado dentro de un pletismógrafo barométrico para ratones en libre movimiento (Buxco Electronics Inc., Troy, NY, USA) en la cual el animal recibió un flujo continuo de aire (10 ml/seg.), mismo que no interfiere con el registro de la función pulmonar (Fig. 2).

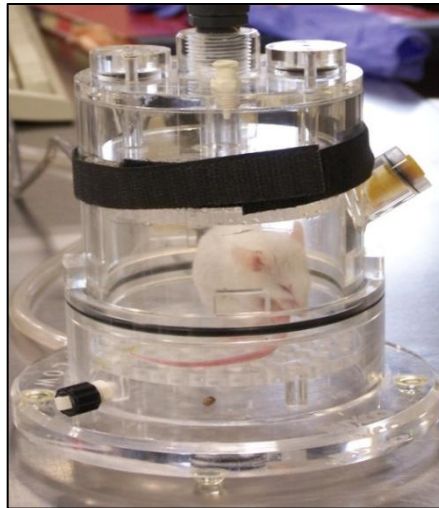


Fig. 2 Sistema de pletismografía en libre movimiento.

Este sistema de pletismografía barométrica está basado en la medición directa de las fluctuaciones de presión que se generan dentro de la cámara y ha sido previamente descrito en extenso (15), (55,56).

En resumen, la presión dentro de la cámara es medida por medio de un transductor de presión diferencial (Sensym, Mod. SX05, EUA) conectado a un preamplificador. Debido a que el aire es calentado y humidificado en los pulmones, durante la fase inspiratoria el volumen del aire dentro del tórax es mayor al mismo volumen de aire previo a la inspiración cuando el animal está dentro de la cámara. Este volumen mayor de aire dentro del tórax produce un incremento en la presión dentro de la cámara. Así, aunque el transductor no mide directamente los flujos tanto inspiratorios como espiratorios, si detecta los cambios de presión dentro de la cámara causados por el calentamiento y la humidificación del aire inhalado por el animal (16,17). Esta señal de presión fue analizada y procesada continuamente a través de un programa especial para el manejo automatizado de los datos evaluados en cada experimento (Buxco BioSystem XA, v1.1). Mediante este programa de computadora se obtienen entre otros parámetros, el índice llamado *enhanced pause* ("Penh" por sus siglas en inglés), que refleja el grado de obstrucción de las vías aéreas (Fig. 3). Este índice fue obtenido con la siguiente ecuación (Hammelman y col. 1997):

$$\text{Penh} = [(T_e - R_t) / R_t] (\text{PEP} / \text{PIP})$$

donde **Te** es el tiempo espiratorio (seg), **Rt** es el tiempo de relajación (seg), **PEP** es la presión del pico espiratorio (cmH₂O) y **PIP** es la presión del pico inspiratorio (cmH₂O).

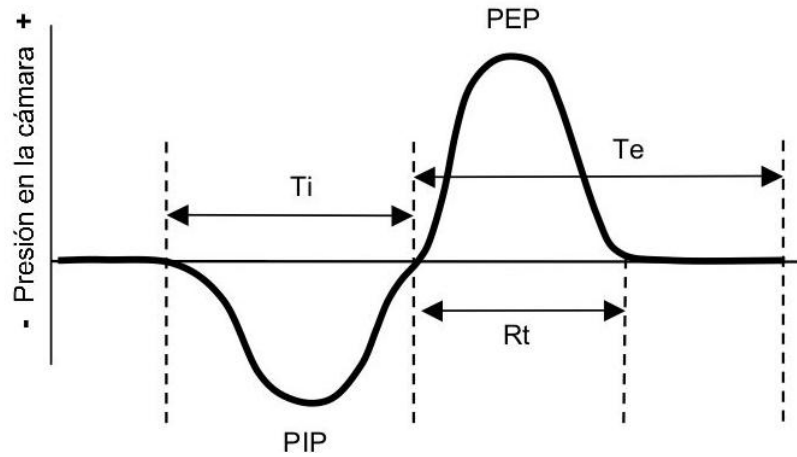


Fig. 3 Esquema de un ciclo respiratorio mostrando los parámetros relacionados en la medición del Penh, donde: Ti= tiempo inspiratorio, Te= tiempo espiratorio, PEP= presión espiratoria máxima, PIP= presión inspiratoria máxima, Rt= tiempo de relajación. El Rt es medido como el porcentaje de volumen corriente que está en constante recambio. Tomada de Chávez, 2007.

Pletismografía barométrica en animales ventilados mecánicamente.

Cada uno de los ratones fue colocado dentro de un pletismógrafo barométrico para ratones anestesiados (Buxco Electronics Inc., Troy, NY, USA). Fig.4.

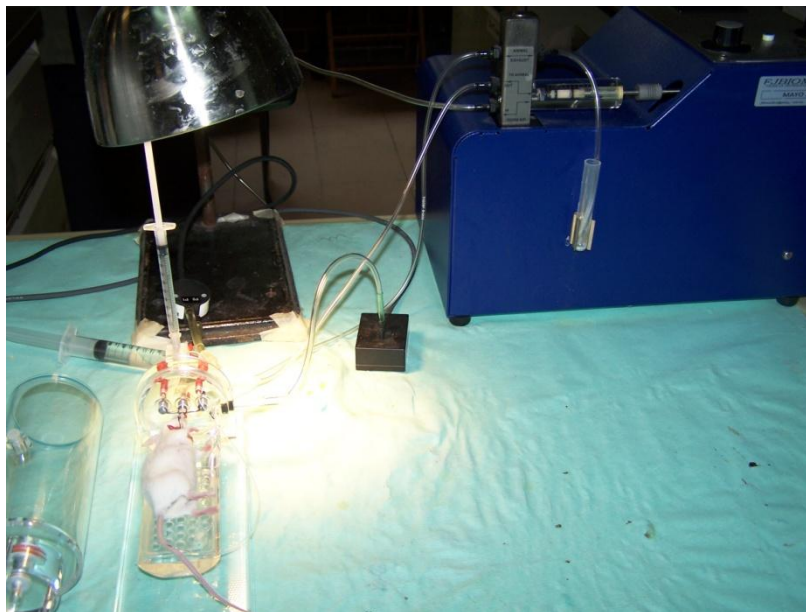


Fig. 4 Sistema de pletismografía en animales ventilados mecánicamente.

La resistencia pulmonar R_L se midió a través de un método isovolumétrico en una cámara de pletismografía (Buxco Electronics Inc.) cerrada para animales anestesiados. Los ratones fueron anestesiados con etomidato (0.74 $\mu\text{l}/\text{gr}$ i.p.). Cada animal recibió 20 μl de bromuro de pancuronio en una disolución 1:10 con SSF 0.9% para suprimir los movimientos respiratorios espontáneos después de canular la tráquea y se ventiló mecánicamente (Harvard Apparatus, Holliston Ma. USA) con un volumen corriente de 0.2 μl por cada respiración y con una frecuencia de 150 respiraciones/min.

Una cánula de plástico flexible rellena con agua se introdujo en el esófago para medir la presión intraesofágica como un sustituto de la presión intrapleurales. Las presiones obtenidas de las cánulas traqueal y esofágica se registraron por medio de un transductor de presión diferencial (SCXL004DN, Sen Sym). La presión dentro de la cámara también fue registrada por medio de un transductor de presión diferencial. Esta última señal fue convertida a una señal de pseudo-flujo por medio de un paquete computacional (Buxco Biosystem XA v1.0). También se calculó la relación entre ambos parámetros para obtener la R_L por medio de la fórmula $R_L = \Delta P / \Delta V$ donde, ΔP significa el cambio en la presión y ΔV el cambio en el volumen, mediante el software previamente mencionado (58).

Evaluación de la hiperreactividad de vías aéreas a metacolina.

La respuesta de las vías aéreas se evaluó entre las 18-20 h posteriores al último reto mediante una curva dosis-respuesta a MCh. Esta respuesta fue determinada mediante el uso de la pletismografía tanto para animales anestesiados ventilados mecánicamente como para animales en libre movimiento respirando espontáneamente. Para la pletismografía en animales anestesiados y mecánicamente ventilados se construyó una curva no acumulativa dosis respuesta de 0.8 a 37.5 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) y para la pletismografía en animales en libre movimiento respirando espontáneamente una curva de 10 a 1000 (mg/ml). En ambos casos se calculó la dosis provocativa (DP) 150 o 200 dependiendo de la respuesta por grupo.

Conteo celular diferencial.

A todos los animales se les realizó un lavado broncoalveolar (LBA) una vez terminada la curva de dosis-respuesta a MCh. En resumen, 1 ml de SSF fue instilado dentro de la tráquea y al cabo de 30 segundos se aspiró lentamente hasta recuperar el mayor volumen posible, esta maniobra se repitió una vez más. El volumen obtenido fue centrifugado inmediatamente durante 10 minutos a 450g a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado y se almacenó a -70 °C.

El botón celular de cada LBA se resuspendió en 1 ml de SSF al 0.9% y para el conteo celular total se utilizó la tinción de azul tripano en una cámara de Neubauer y se ajustó a 1×10^6 células/ml. Posteriormente se tomaron 50 μ l de la suspensión celular que fueron colocados en los pozos de una citocentrífuga (Wescor cytopspin) (1500 rpm / 5 min) para hacer los frotis correspondientes de cada muestra. Se usó la tinción de Romanowsky a 37 °C.

Análisis estadístico.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante una prueba t pareada y la significancia estadística se fijó en $p < 0.05$ bimarginal para ambos modelos, así como, una prueba de Dunnett para ambos modelos según lo requerido. Los resultados tanto en el texto como en las figuras son expresados como promedio \pm error estándar. El cálculo de las DP se hizo con una regresión lineal de los datos de R_L o $Penh$ obtenidos.

Resultados

Efecto de la instilación de cysLTs sobre las vías aéreas.

Pletismografía en animales que respiran espontáneamente.

En ratones Balb/c instilados con 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LTD_4 , no se observó diferencia entre las curvas dosis-respuesta del grupo control y del grupo experimental (Fig. 5A). La DP 150 a MCh no fue diferente entre los dos grupos (Fig.5B).

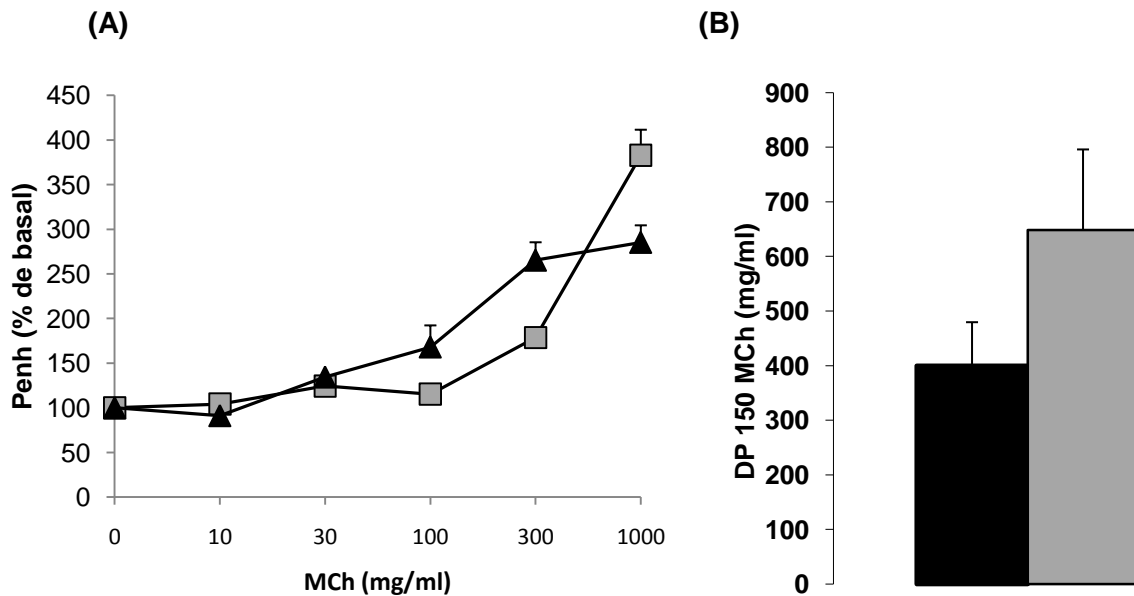


Fig. 5. Efecto de la administración intranasal de LTD_4 en ratones Balb/c. (A) Curva dosis-respuesta a la MCh inhalada en ratones Balb/c instilados con 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ LTD_4 . La MCh inhalada induce un incremento progresivo en los valores de Penh (■) $n=8$ y permanece sin cambios hasta los 30 mg/ml, con respecto al grupo control (▲) $n=5$. (B) DP 150 a MCh inhalada para Balb/c sensibilizados (■) con LTD_4 , respecto a los controles (▲). Los símbolos representan el promedio \pm error estándar. $r=0.9339$ respecto al grupo control.

En experimentos usando ratones C57BL/6 instilados con LTC_4 y LTD_4 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) se observaron diferencias en el patrón de la curva dosis-respuesta a la MCh entre el grupo control y los grupos sensibilizados (Fig. 6A) La DP 150 muestra diferencias significativas entre los ratones instilados con LTC_4 y el

grupo control. Sin embargo el grupo instilado con LTD₄ no presentó dicha diferencia significativa (Fig. 6B).

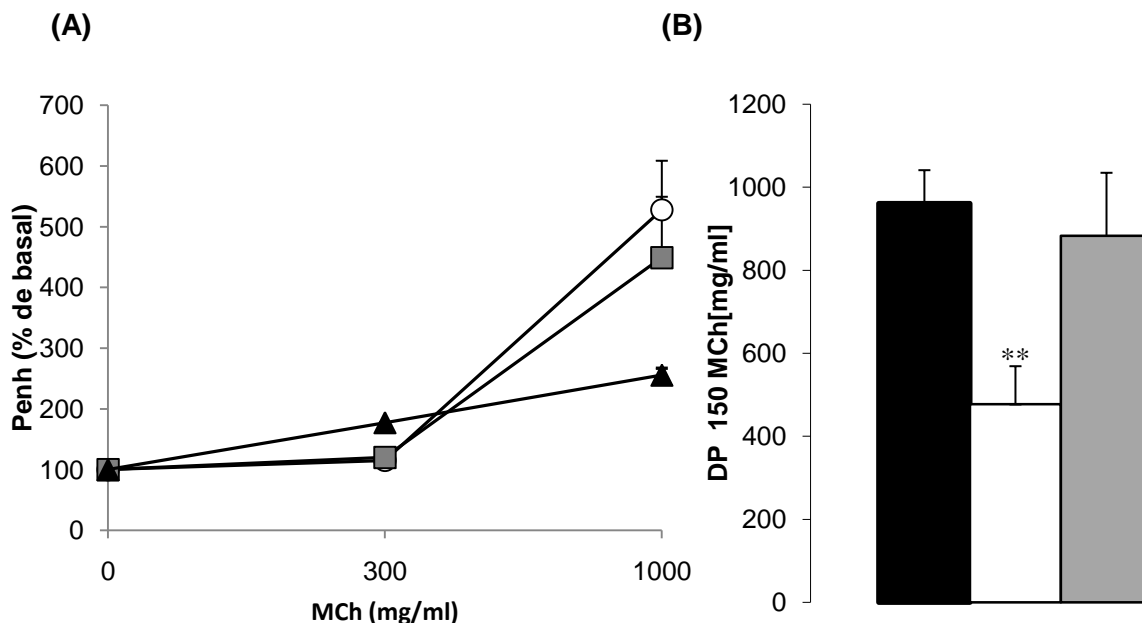


Fig. 6. Efecto de la administración de LTC₄ y LTD₄ en ratones C57BL/6.

(A) Curva dosis- respuesta a MCh inhalada en ratones C57BL/6 instilados con 10 µg/kg de LTC₄ y LTD₄. La MCh inhalada induce un incremento progresivo en el Penh en animales sensibilizados con LTC₄ (○) n=3 y con LTD₄ (■) n=9 incluyendo el grupo control (▲) n=6. (B) La DP 150 a MCh inhalada muestra hiperreactividad en animales sensibilizados con LTC₄ (□). ** p<0.05. Los símbolos representan el promedio ± error estándar. r=0.9629 LTC₄, 0.9844 LTD₄ respecto al control.

Pletismografía en animales ventilados mecánicamente.

En ratones Balb/c instilados con LTD₄ se observaron diferencias en los valores de R_L en respuesta a la administración de MCh (Fig. 7A). La DP200 presenta una diferencia estadística entre los ratones instilados y el grupo control (Fig. 7B).

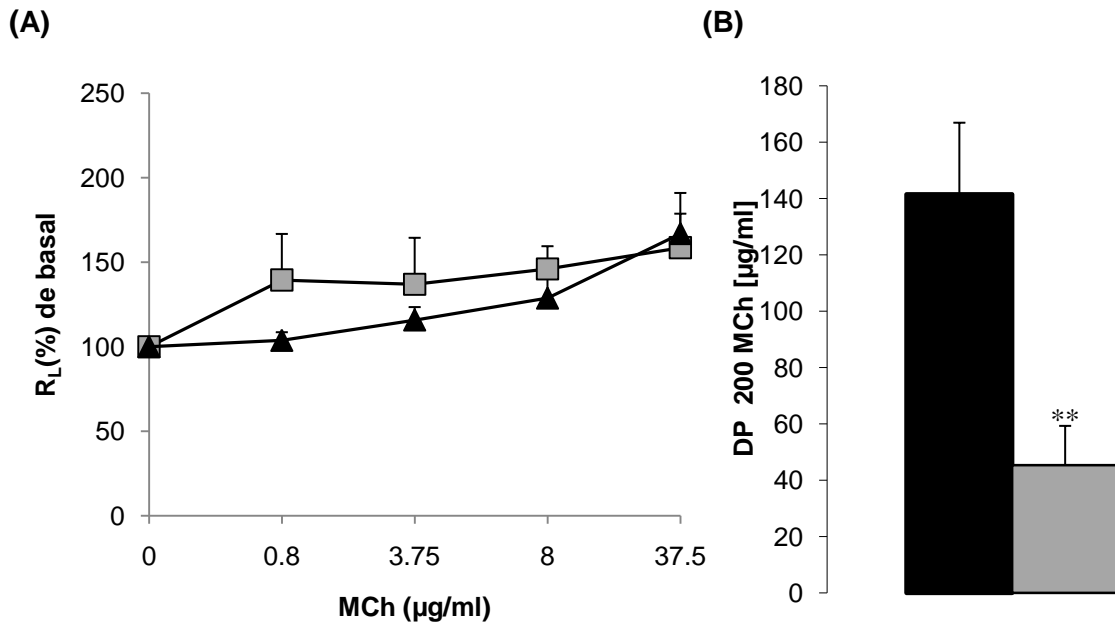


Fig. 7. Efecto de la administración de LTD_4 en ratones Balb/c.

(A) Curva dosis - respuesta a MCh i.v. en ratones Balb/c instilados con LTD_4 . La MCh i.v. induce un incremento progresivo en R_L en ratones Balb/c sensibilizados con LTD_4 (■) $n=10$ y se observan cambios en la curva, control (▲) $n=8$. **(B)** DP 200 a MCh nebulizada para Balb/c sensibilizados con LTD_4 (■), controles (■). $**p < 0.01$. Los símbolos representan el promedio \pm error estándar. $r=0.9373$ respecto al grupo control.

En ratones de la cepa C57BL/6 instilados con LTC_4 , se observaron diferencias en los valores de R_L respecto al grupo control con respecto al basal del grupo control y para el grupo instilado con LTD_4 no se observaron diferencias (Fig. 8A). La DP150 muestra sólo una marcada hiperreactividad de las vías aéreas inducida por LTC_4 a la administración de MCh i.v con respecto al grupo control (Fig. 8B).

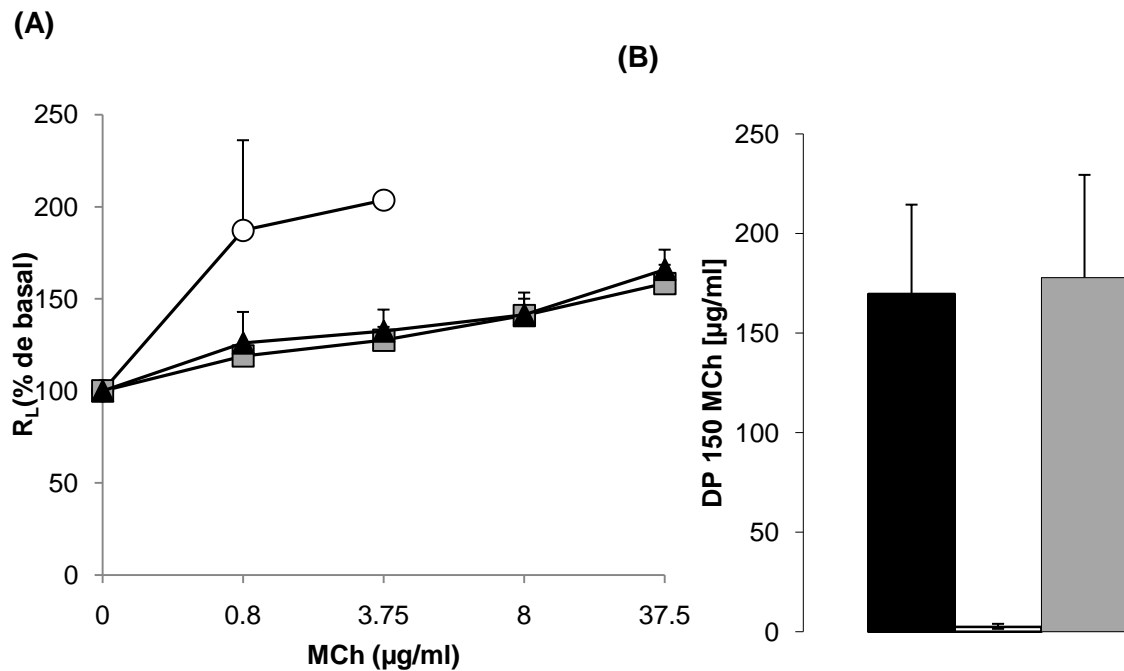
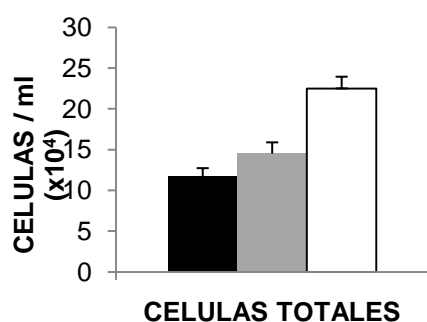


Fig. 8. Efecto de la administración de LTC₄ y LTD₄ en ratones C57BL/6. **(A)** Curva dosis - respuesta a MCh i.v. en ratones C57BL/6 sensibilizados con LTC₄ y LTD₄. La MCh i.v. induce un incremento progresivo en los valores de R_L en ratones sensibilizados con LTD₄ (■) n=10 LTC₄ (□) n=3, control (▲) n=8. **(B)** DP 150 a MCh i.v. para C57BL/6 sensibilizados con LTD₄ (■) y LTC₄ (□), controles. r = 0.9895 LTC₄, 0.7885 LTD₄ respecto al control.

Efecto LTC₄ y LTD₄ en los tipos celulares presentes en LBA.

En ratones tratados con LTC₄ y LTD₄, los tipos y porcentajes celulares presentes en LBA son diferentes a los del grupo control. Los conteos celulares diferenciales muestran diferencias entre los ratones instilados con LTD₄ y el grupo control en neutrófilos, linfocitos y eosinófilos, mientras que el número de macrófagos se mantuvo igual con respecto al control. Por otro lado, en los ratones instilados con LTC₄ se observaron diferencias significativas en el número de eosinófilos, linfocitos y neutrófilos respecto al grupo control (Fig. 9).

(a)



(b)

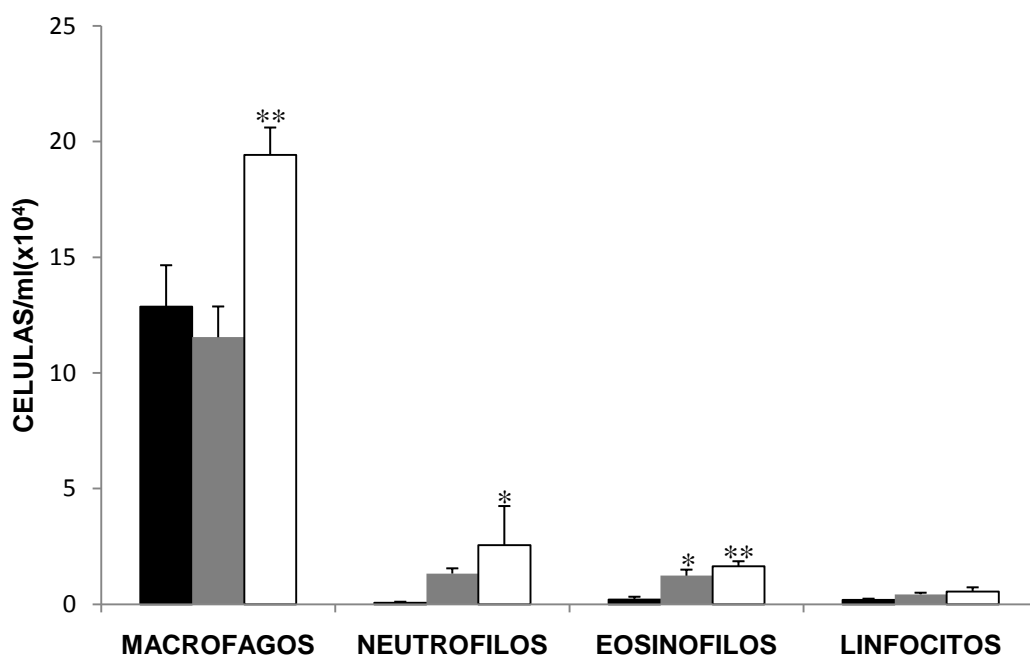


Fig. 9. Cambios en el conteo celular diferencial en los lavados broncoalveolares de ratones instilados con LTC₄ y LTD₄. (a) Cambio en el número total de células. (b) Los tipos celulares varían dependiendo del tratamiento, LTD₄ (▒), LTC₄ (□), controles (■). *p < 0.05, **p < 0.02. Las barras representan el promedio ± error estándar.

Modelos de sensibilización con ovoalbúmina.

En los ratones tratados con ovoalbúmina se observó un aumento en la hiperreactividad de vías aéreas (Fig.10 y 11), así como en el número total de células inflamatorias en LBA (Fig.12).

De acuerdo a los dos protocolos de sensibilización publicados por diferentes grupos de investigación (22), (54) no se observó ningún cambio

significativo en ninguno de los parámetros evaluados tanto para animales en libre movimiento como anestesiados (datos no mostrados).

Para inducir el fenómeno de hiperreactividad de las vías aéreas fue necesario hacer modificaciones en los protocolos de sensibilización previamente descritos para adecuarlos a nuestras condiciones experimentales.

Pletismografía barométrica en animales respirando espontáneamente.

En la curva dosis-respuesta, el efecto de la administración de metacolina inhalada en ratones Balb/c sensibilizados usando este modelo se aprecian diferencias significativas entre los modelos usados, siendo el modelo de sensibilización intranasal e inhalado el que refleja esta diferencia (Fig. 10A). La DP200 muestra una diferencia significativa entre los ratones sensibilizados usando el modelo intranasal-inhalado y el grupo control (Fig. 10B).

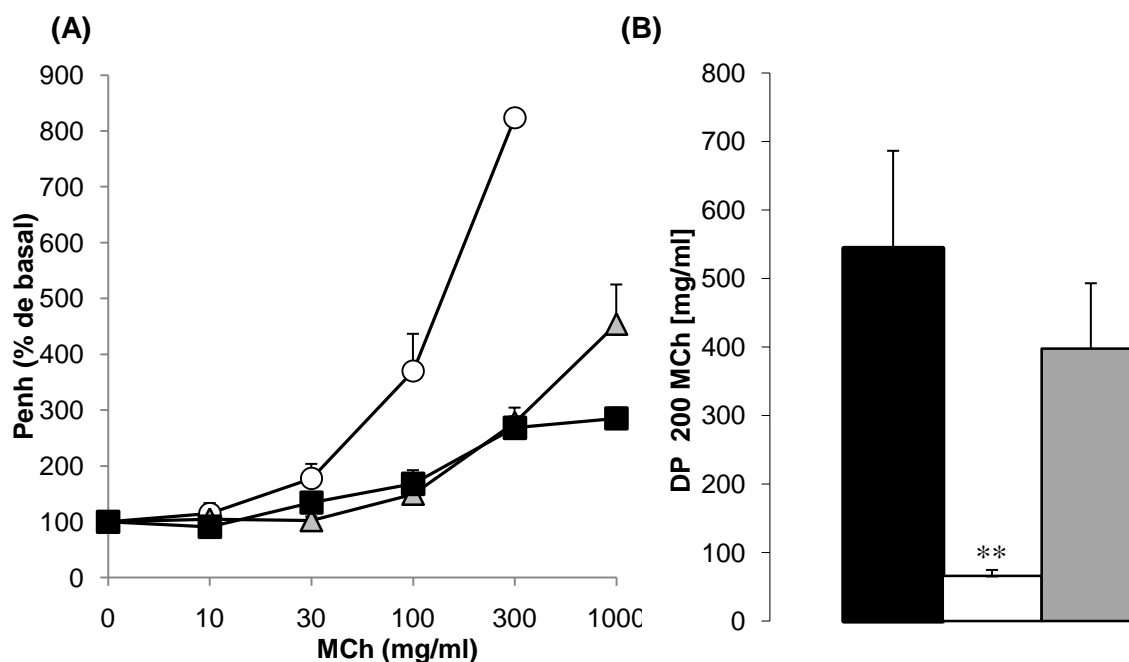


Fig. 10. Efecto de la sensibilización con OVA en ratones Balb/c.

(A) Curva dosis-respuesta a MCh inhalada en ratones Balb/c sensibilizados de acuerdo al modelo intranasal-inhalado y al modelo subcutáneo-inhalado. La MCh inhalada induce un incremento progresivo en el valor de Penh en ratones Balb/c sensibilizados con OVA usando ambos modelos intranasal-inhalado (○) n= 8, el subcutáneo-inhalado (△) n=10 y grupo control (■) n=5. (B) DP 200 a MCh inhalada para Balb/c sensibilizados de acuerdo al modelo intranasal-inhalado (□) y subcutáneo-inhalado (■), controles

(■). **p< 0.01. Los símbolos representan el promedio ± error estándar. r= 0.9759 i.p-i.n., 0.9779 i.p-inh respecto al grupo control.

En la curva dosis-respuesta a metacolina inhalada en ratones C57BL/6 sensibilizados con el modelo intranasal-inhalado, se observan diferencias significativas mientras que, en el modelo subcutáneo-inhalado no existen diferencias a lo largo de toda la curva (Fig. 11A). La DP200 muestra que existe diferencia entre los ratones sensibilizados usando el modelo intranasal-inhalado y el grupo control (Fig. 11B).

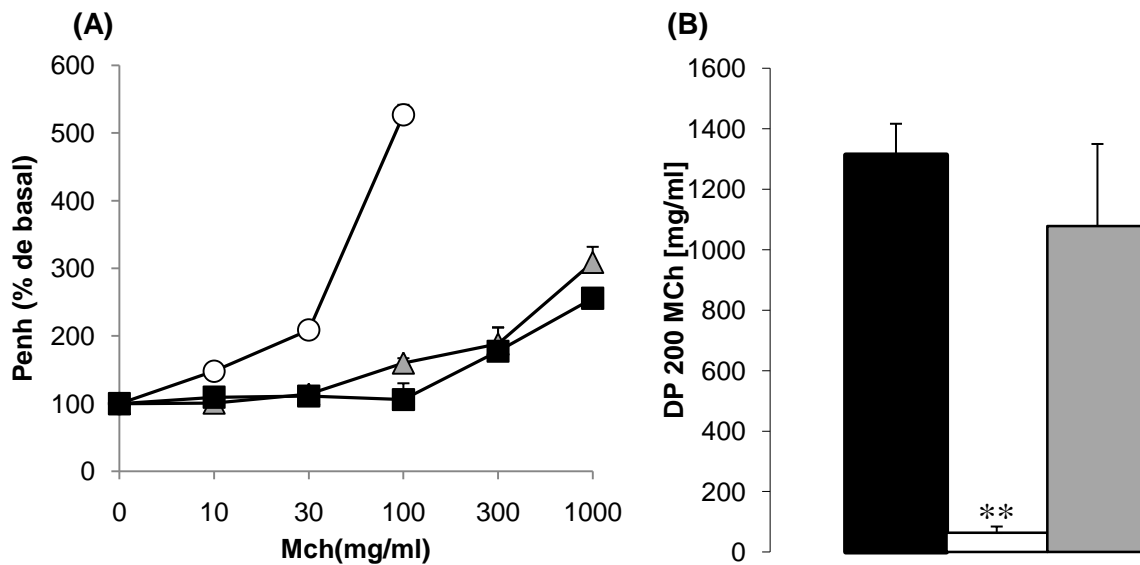


Fig. 11. Efecto de la sensibilización con OVA en ratones C57BL/6. **(A)** Curva dosis-respuesta a MCh inhalada en ratones C57BL/6 sensibilizados de acuerdo al modelo intranasal-inhalado y subcutáneo-inhalado. Intranasal-inhalado (○)n= 9, subcutáneo-inhalado (▲)n=9 y grupo control (■) n=5. **(B)** DP 200 a MCh inhalada para Balb/c sensibilizados intranasal-inhalado (□) y subcutáneo-inhalado (■) controles (■). **p< 0.01. Los símbolos representan el promedio ± error estándar. r= 0.9764 i.n-inh, 0.9810 s.c.-inh respecto al grupo control.

Efecto de la sensibilización con OVA en tipos celulares presentes en LBA

En ratones sensibilizados Balb/c y C57BL/6 con estos modelos, los conteos celulares diferenciales muestran que en ambos casos el número de células inflamatorias aumento en distinta proporción y muestran diferencias significativas entre los animales sensibilizados de manera intranasal-inhalada y

el grupo control. Por otro lado en los animales sensibilizados usando el modelo subcutáneo-nebulizado se presentan diferencias en los eosinófilos, linfocitos y neutrófilos (Fig. 12).

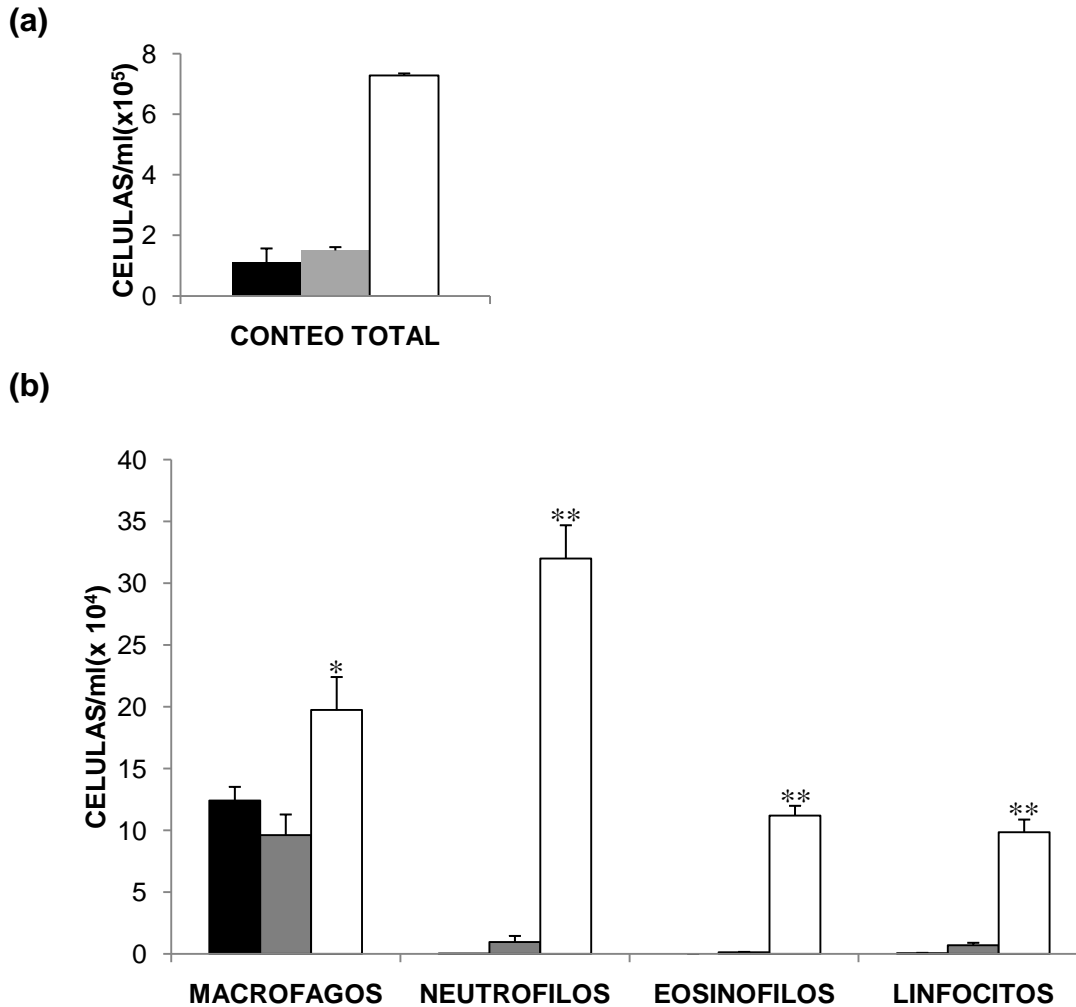


Fig. 12. Cambios en el conteo diferencial en los lavados broncoalveolares de ratones instilados con OVA en animales en libre movimiento. **(a)** Conteo celular total. **(b)** Los tipos celulares varían dependiendo del tratamiento, intranasal-inhalado (□), subcutáneo-nebulizado (■), controles (■). **p< 0.01, *p< 0.05. Los símbolos representan el promedio ± error estándar.

Pletismografía barométrica en animales ventilados mecánicamente.

En la curva dosis-respuesta el efecto de la administración de metacolina inhalada en ratones sensibilizados Balb/c no se aprecia ninguna diferencia significativa en ninguno de los modelos de sensibilización usado (Fig. 13A). La DP200 muestra una marcada hiperreactividad de las vías aéreas inducida por OVA a la administración de MCh i.v. con respecto al grupo control (Fig. 13B).

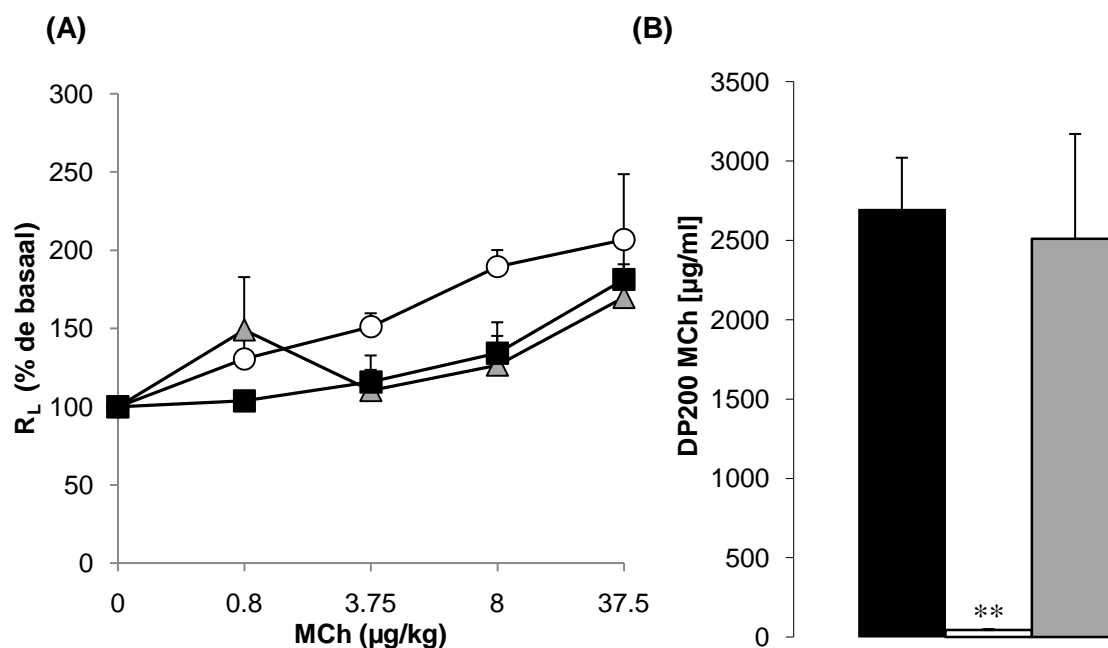


Fig. 13. Efecto de la sensibilización con OVA en ratones Balb/c
(A) Curva dosis-respuesta a MCh i.v. en ratones Balb/c sensibilizados de acuerdo al modelo intranasal-inhalado o subcutáneo-inhalado. La MCh i.v. induce un incremento progresivo en el valor de R_L en ratones Balb/c sensibilizados usando los modelos intranasal-inhalado (○) n= 6, subcutáneo-inhalado (▲) n=7 y el grupo control (■) n=8. **(B)** DP 200 a MCh i.v. para Balb/c sensibilizados de acuerdo al modelo de sensibilización intranasal-inhalado (□) y subcutáneo-inhalado (■) controles (■). **p< 0.01. Los símbolos representan el promedio ± error estándar. r = 0.8871 i.n-inh, 0.9223 s.c.- inh respecto al grupo control.

En ratones C57BL/6 sensibilizados usando el modelo intranasal-inhalado se aprecian diferencias significativas entre los ratones sensibilizados y el grupo control, mostrando la mayor diferencia con respecto al grupo control en comparación con el modelo subcutáneo-inhalado (Fig. 14A).

La DP200 muestra una diferencia significativa entre los ratones sensibilizando usando el modelo intranasal-inhalado y el grupo control (Fig. 14B).

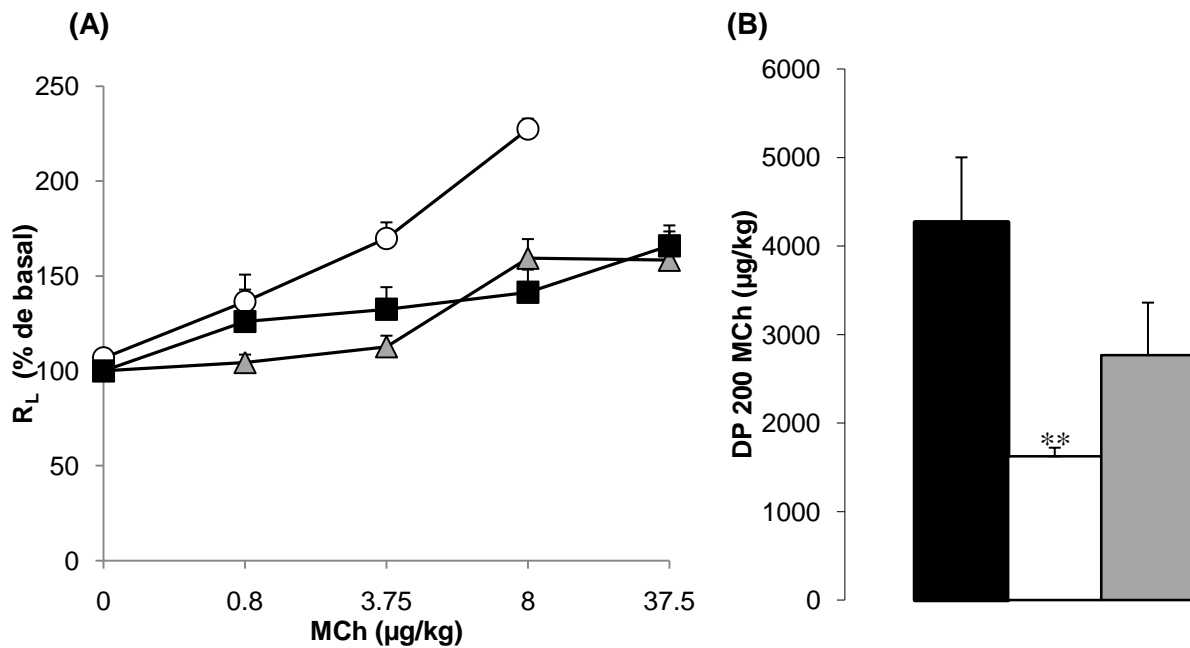


Fig. 14. Efecto de la sensibilización con OVA en ratones C57BL/6.

(A) Curva dosis-respuesta a MCh i.v. en ratones C57BL/6 sensibilizados de acuerdo al modelo intranasal-inhalado o subcutáneo-inhalado. La MCh i.v. induce un incremento progresivo en el valor de R_L intranasal-inhalado (○)n= 9, subcutáneo-inhalado (▲)n=6 y el grupo control (■) n=8. **(B)** DP 200 a MCh i.v. para C57BL/6 sensibilizados por el método intranasal-inhalado (□) y subcutáneo-inhalado (■) controles (■). **p< 0.01. Los símbolos representan el promedio ± error estándar. r= 0.9332 i.n-inh, 0.7946 s.c- inh respecto al grupo control.

Inflamación generada por OVA.

En los ratones sensibilizados con estos modelos los conteos celulares diferenciales muestran que en ambos casos el número de células inflamatorias aumentó en distinta proporción y presenta diferencias significativas entre los sensibilizados con el modelo intranasal-inhalado y el grupo control para todos los tipos celulares, mientras que el grupo sensibilizado con el modelo subcutáneo-inhalado tuvo diferencias sólo en neutrófilos y linfocitos. En este último la diferencia es significativa con respecto al control, mientras que en eosinófilos y macrófagos no hubo diferencia (Fig. 15).

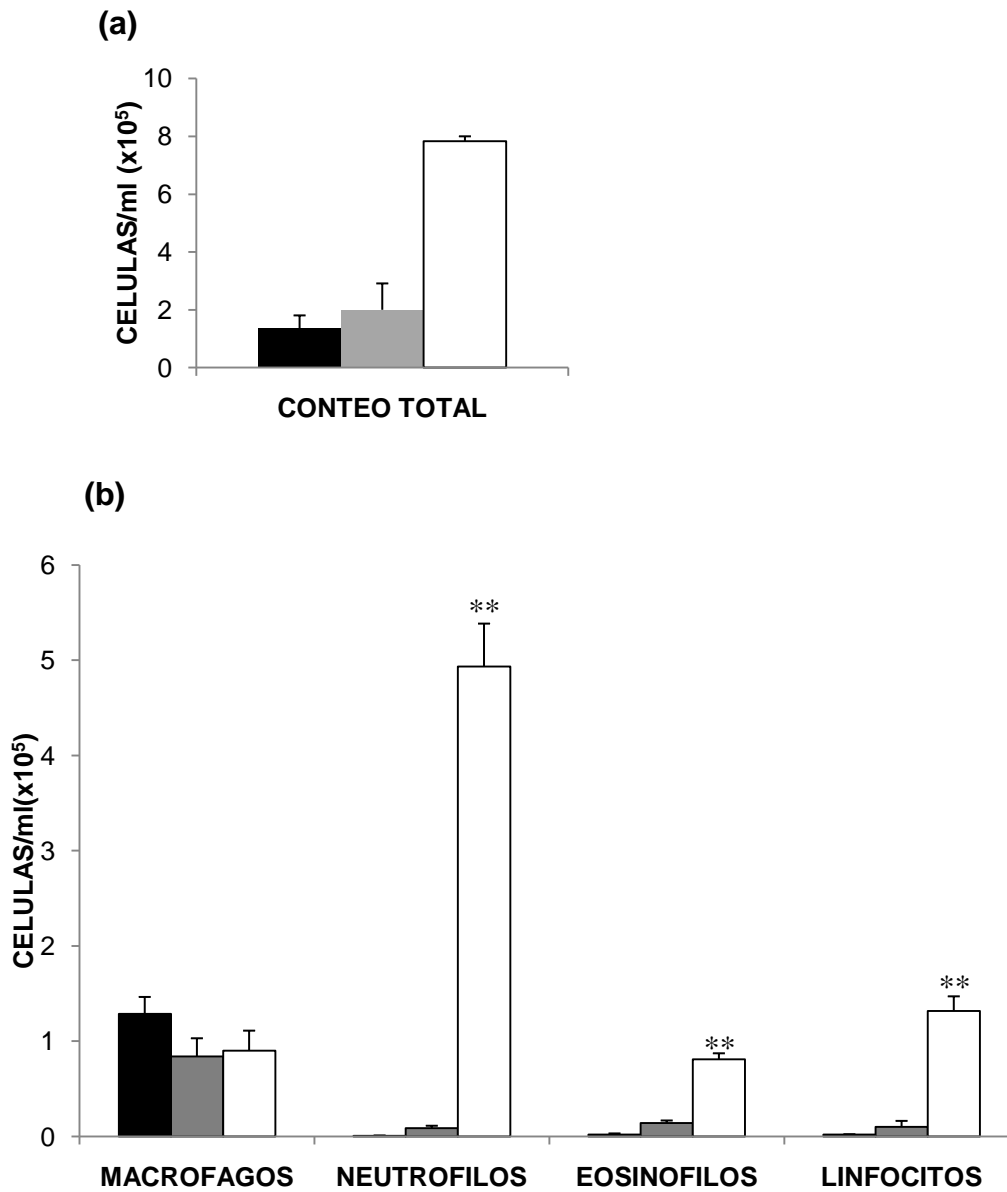


Fig. 15 Conteo celular en ratones instilados con OVA en animales anestesiados. **(a)** Conteo celular total. **(b)** Los tipos celulares varían dependiendo del tratamiento, intranasal-inhalado (▒) subcutáneo-inhalado (□), controles (■). ** $p < 0.01$. Los símbolos representan el promedio \pm error estándar.

Discusión

La administración intranasal de LTC₄ indujo un decremento significativo en la DP 150 y DP200 en la respuesta de las vías aéreas al estímulo de metacolina (i.v. e inhalada) en ambas cepas de ratones con resultados más pronunciados en Balb/c, tanto para animales ventilados mecánicamente como en libre movimiento, mientras que en el grupo instilado con LTD₄ no hubo cambios significativos en su DP150 y DP 200 con respecto al control en ambas cepas.

Los cysLTs (LTC₄ y LTD₄) inducen broncoconstricción y otros efectos biológicos mediante la activación de la proteína G acoplada al receptor CysLT₁ y se ha propuesto que existe una relación entre los niveles endógenos de agonista y la respuesta de vías aéreas a LTD₄ inhalado (59); en contraste algunos autores postulan que el LTD₄ inhalado no afecta la respuesta de vías aéreas a ACh (57), (63). Los resultados obtenidos en este trabajo confirman lo antes dicho ya que se observa que la DP 150 y DP200 no disminuyeron sus valores en animales instilados con LTD₄, mientras que con LTC₄ se observa una diferencia significativa tanto en los valores de Penh en Balb/c (Fig. 5A) y en C57BL/6 (Fig.6A) como en R_L en Balb/c (Fig. 7A) y C57BL/6 (Fig. 8A) con respecto a los controles, así como también en la DP150 para animales en libre movimiento Balb/c (Fig. 5B), C57BL/6 (Fig.6B) y animales anestesiados Balb/c (Fig. 7B) y C57BL/6 (Fig.8B).

Cowburn y col. proponen al LTC₄ como un componente principal para mantener el tono en el músculo liso y como elemento suficiente para inducir respuestas hiperreactoras (60), aunque se ha hipotetizado que los resultados obtenidos dependen del volumen de LT que se instile o se inhale en el modelo, así como de las condiciones experimentales (39), (40), (42), (49), (60-62). En estos dos modelos de pletismografía, la respuesta más acentuada se da en la cepa Balb/c. Otro de los factores a considerar es la diferencia en la respuesta entre especies. En el caso de los ratones se debe tomar en cuenta la diferencia de respuesta entre cepas a cysLTs; Underwood y col. demostraron que LTD₄ en aerosol induce eosinofilia en cobayos pero no en ratas bajo las mismas condiciones experimentales (63), mientras que Kawada y col demostraron que LTD₄ inhalado no inducía eosinofilia ni hiperreactividad de las vías aéreas en ratones 129 Sv (64).

Se ha acumulado evidencia que sugiere que los cysLTs contribuyen a la acumulación y activación de eosinófilos, el tipo celular predominante en el infiltrado de inflamación alérgica y fuente endógena de cysLTs (65). La inhalación de cysLTs ha sido asociada con eosinofilia incrementada en las vías aéreas en asmáticos (65). En este trabajo encontramos que en el conteo celular diferencial se aprecia significativamente elevado el número de eosinófilos y neutrófilos en ratones de cepas Balb/c y C57BL/6 instilados con LTC₄ (Fig.9), mientras que en ambas cepas de ratones instilados con LTD₄ se presentan diferencias significativas en el número de eosinófilos y de neutrófilos (Fig.9). Estudios donde se ha examinado esputo de pacientes asmáticos han demostrado que existe un incremento en el número de eosinófilos en respuesta a LTD₄ administrado vía nasal (61,62). El desarrollo de inflamación eosinofílica involucra una serie de pasos incluyendo procesos de adhesión y migración celular a través de las células endoteliales y prolongación de supervivencia eosinofílica (65), estos efectos biológicos son derivados de la interacción de LTD₄ con su receptor cysLT₁ (66). Dicho receptor ha sido identificado en células de músculo liso humano y macrófagos alveolares (67,68). LTC₄ y LTD₄ inhiben directamente la apoptosis en eosinófilos prolongando así su supervivencia (69).

Por otro lado, la mayoría de los modelos de asma han sido desarrollados usando alérgenos de alto peso molecular como la ovoalbúmina; la sensibilización con esta proteína ha sido ampliamente usada y se han obtenido diversos rasgos en modelos murinos que semejan las características del asma en humanos. Existen muchas variaciones dentro del modelo de sensibilización con ovoalbúmina que abarcan la cepa, el método de sensibilización, la ruta de administración, dosis y la duración de la misma, todo esto influye en la naturaleza de la respuesta fisiológica de los modelos animales.

La sensibilización con OVA indujo un decremento significativo en la DP 200 en la respuesta de las vías aéreas al estímulo de metacolina, las diferencias entre los modelos de sensibilización fueron significativas, siendo el método de Kato (1999) el menos eficiente en el desarrollo de la AHR, mientras que con los modelos de sensibilización por vía intranasal-inhalada se obtuvieron mejores resultados, con el modelo subcutáneo-inhalado la DP200 tuvo una diferencia

altamente significativa en relación con el grupo control en animales en libre movimiento en Balb/c (Fig. 10) y en C57BL/6 (Fig.11) y en animales anestesiados Balb/c (Fig.13) y C57BL/6 (Fig. 14). Con el modelo de sensibilización por vía inhalada no hubo diferencias tanto en animales anestesiados como en libre movimiento.

Las variables más importantes en los modelos de sensibilización con ovoalbúmina son: la ruta de administración y la duración del reto antigénico, los animales pueden ser retados por administración intratraqueal, instilación intranasal e inhalación de aerosol (38). En el presente trabajo, la diferencia más significativa entre los dos modelos es la instilación intranasal en el modelo de sensibilización vía intranasal lo que induce hiperreactividad bronquial en los ratones tratados con este modelo, acentuada en ratones Balb/c.

Los tipos celulares que se presentan en el infiltrado celular en lavados broncoalveolares de ratones sensibilizados con ovoalbúmina esta predominantemente compuesto por neutrófilos en proporción significativamente distinta al control, aumento significativo de eosinófilos y moderado de linfocitos para el modelo de sensibilización vía intranasal, mientras que para el modelo de sensibilización vía inhalada la composición es mayormente de neutrófilos, menor de eosinófilos y moderada de linfocitos para animales en libre movimiento (Fig. 12) y animales anestesiados (Fig.15).

La elección de la cepa de ratón afecta directamente el patrón de inflamación obtenido en los modelos murinos de asma. Algunas veces se da preferencia a aquellas cepas en las que se obtiene una respuesta inmune tendiente a Th2 y/o a la producción de IgE. Las diferencias generalmente se basan en la susceptibilidad de estas cepas a infecciones parasitarias, usualmente de *Leishmania major* y la respuesta que induce en las distintas cepas en Balb/c induce una respuesta Th2 pronunciada con elevados niveles de IgE en contraste con C57BL/6, donde se desarrolla una robusta respuesta Th-2 en respuesta a otros antígenos y ha sido reportado que en protocolos de sensibilización con ovoalbúmina en aerosol el reclutamiento de eosinófilos en LBA fue mayor en estos ratones y en 129/SvIm que en ratones A/J y Balb/c. Sin embargo Balb/c produce mayores niveles de anticuerpos IgE anti-ovoalbúmina y la concentración de citocinas Th2 como IL-4 e

IL-5 en fluido de lavado bronqueoalveolar es más alta en BALB/c que en C57BL/6. (70). Los resultados de inflamación fueron confirmados en este trabajo (Fig. 12 y 15).

En el presente trabajo, la respuesta de vías aéreas a MCh es diferente en ambas cepas, siendo BALB/c la que muestra mayor susceptibilidad que se ve reflejada en una disminución en la DP150 en el modelo de cysLTs en ratones Balb/c (Fig.5B) en libre movimiento y en animales anestesiados (Fig. 7B), en comparación con C57BL/6 en libre movimiento (Fig.6B) y en animales anestesiados (Fig. 8B). En el modelo de sensibilización con ovoalbúmina, esta diferencia es más marcada; la DP 200 de ambas cepas es diferente, aunque Balb/c sigue mostrando mayor susceptibilidad (Fig. 10B) en animales en libre movimiento y anestesiados (Fig. 13B) en comparación la obtenida para C57BL/6 en animales en libre movimiento (Fig. 11B) y en animales anestesiados (Fig.14B).

La dependencia de la cepa a la reactividad de vías aéreas ha sido ampliamente documentada (38), (71). Dichas diferencias pueden estar relacionadas en parte a polimorfismos del receptor de IL-4 (71), aunque el método de sensibilización también influye de manera notable como podemos observar en los resultados obtenidos con ambos protocolos de sensibilización con ovoalbúmina.

En este trabajo encontramos que con la técnica de pletismografía en animales que respiran espontáneamente (animales en libre movimiento), se obtienen datos de Penh que correlacionan con los obtenidos en la técnica de pletismografía en animales ventilados mecánicamente (animales anestesiados) cuando se trabaja con el mismo animal en ambas técnicas.

Conclusión

El uso de modelos murinos para reproducir algunas características de patologías humanas ha sido ampliamente aplicado, debido a las ventajas que representa en comparación con otros modelos animales.

El modelo de hiperreactividad en ratones de diversas cepas ha sido ampliamente usado con diversas variaciones, que van desde el tiempo de exposición, la dosis, la vía de exposición y tipo de reactivo usado en la sensibilización. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que:

- La cepa más adecuada para trabajar en un modelo de hiperreactividad bronquial es Balb/c debido a que es más susceptible a la sensibilización con ovoalbúmina, así como a la instilación con los cysLTs utilizados.
- La vía de administración es de suma importancia en los modelos de sensibilización. En este caso la instilación intranasal es sumamente relevante en la inducción de hiperreactividad de vías aéreas.
- La pletismografía barométrica en animales mecánicamente ventilados (animales anestesiados) y en animales respirando espontáneamente (libre movimiento) es un buen método de medir la reactividad de vías aéreas.
- Los resultados en ambas técnicas de pletismografía correlacionan entre sí.

Bibliografía

1. *The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma.* **Larché M, Robinson D, Kay A.** 2003, *Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology.*, págs. 450-451.
2. *Global Initiative for Asthma (GINA) and its objectives.* **J., Bousquet.** 2s-5s, s.l. : Clin Exp Allergy, 2000, Vol. 30.
3. *Aspectos epidemiológicos del asma infantil en México.* **Vargas HM, Sierra-Mionge JJ, Díaz-Mejía GS, Olvera-Castillo R, De León-González M.** 255-265, s.l. : Gac Med Mex , 1996, Vol. 132.
4. **Holgate, Stephen T.** *Alergia.* España : Elsevier, 2001.
5. *Inflammatory mediators of asthma: an update.* **Barnes PJ, Chung KF, Page CP.** 515-595, s.l. : Pharmacol Rev , 1998, Vol. 50.
6. *The role of T Lymphocytes in the pathogenesis of asthma.* **Mark L, Douglas S, A. Barry K.** United kingdom : s.n., 2003, *Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology*, págs. 450-463.
7. *Recombinant human interleukin-5 is a selective activator of human eosinophil function.* **Lopez A. F., C. J. Sanderson , J. R. Gamble, H. D. Campbell, I. G. Young, M. A. Vadas.** 167, 1988, *Journal of Experimental Medicine*, págs. 219-224.
8. *Shifts in lung lymphocyte profiles correlate with the sequential development of acute allergic and chronic tolerant stages in a murine asthma model.* **Yiamouyiannis C A, Schramm CM, Puddington L, et al.** 154, 1999, *Am J Pathol*, págs. 1911-1921.
9. *Asthma.* **Nadel A, Busse W.** California : s.n., 1998, *American Journal respiratory* , Vol. 157, págs. 130-131.
10. **Barnes PJ.** *Pathophysiology of Asthma In: Asthma, Chung, F., and Fabbri, L.M eds. . Vol. 8 Chapter 5.* 5, 2003, *European Respiratory Monograph*, Vol. 8, págs. 84-110.
11. *Asthma and allergy foundation of america.* [En línea] [Citado el: 11 de febrero de 2009.] <http://www.aafa.org/display.cfm?id=8&cont=6>.
12. **J., Martin R.** *Nocturnal asthma: an overview.* [ed.] Martin R.J. *Nocturnal asthma: mechanisms and treatment.* NY : Futura, 1993, págs. 71-115.
13. *Nocturnal Asthma: Mechanisms and Management .* **Skloot, Gwen S.** 3, New York : s.n., may de 2002, *The Mount Sinai Journal of Medicine* , Vol. 69, págs. 140-147.
14. *Pulmonary responses to bronchoconstrictor agonists in the mouse.* **martin TR, Gerard NP, Galli SJ, Drazen JM,.** 64, 1988, *J Appl Physiol*, págs. 2318-2323.
15. *Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography.* **Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, Gelfand EW.** 766-775, s.l. : *Am Respir Crit Care Med*, 1997, Vol. 156.
16. *A reevaluation of the validity of unrestrained plethysmography in mice.* **Lundblad LKA, Irvin CG, Adler A, Bates JHT.** 1198-1207, s.l. : *J Appl Physiol*, 2002, Vol. 93.
17. *Spontaneous changes in guinea-pig respiratory pattern during barometric plethysmography: role of catecholamines and nitric oxide .* **Bazán-Perkins B, Vargas MH, Sanchez-Guerrero E, Chávez J, Montaña LM.** 623-628, s.l. : *Exp Physiol*, 2004, Vol. 89.
18. *Bronchial smooth muscle mechanics of a canine model of allergic airway hyperresponsiveness.* **Jiang H, Rao K, Halayko AJ, Kepron W, Stephens NL.** 72, 1992, *J Appl Physiol*, págs. 39-45.
19. *Antiinflammatory effects of genistein, a tyrosine inhibitor, on a guinea pig model of asthma.* **Duan W, Kuo IC, Selvaaran S, Chua KY, Bay BH, Wong WS.** 167, 2003, *Am J Respir Crit Care Med*, págs. 185-192.

20. *Augmented acetylcholine-induced, Rho-mediated Ca²⁺ sensitization of bronchial smooth muscle contraction in antigen induced airway hyperresponsive rats.* **Chiba Y, Takada Y, Miyamoto S, Mitsui-Saito M, Karaki H, Misawa M.** 127, 1999, Br J Pharmacol, págs. 597-600.
21. *Airway hyperresponsiveness to bradykinin induced by allergen challenge in actively sensitised Brown Norway rats.* **Ellis KM, Cannet C, Mazzone L, Fozard JR.,** 369, 2004, Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, págs. 166-178.
22. *Effect of an orally active Th1/Th2 balance modulator, M50367, on IgE production, eosinophilia, and airway hyperresponsiveness in mice.* **Kato Y, Manabe T, Tanaka Y, Mochizuki H.,** 162, 1999, J Immunol, págs. 7470-7479.
23. *Chronic inhaled ovalbumin exposure induces antigen-dependent but not antigen-specific inhalational tolerance in a murine model of allergic airway disease.* **Schramm CM, Puddington L, Wu C, Guernsey L, Gharaee-Kermani M, Phan SH.** 164, 2004, Am J Pathol, págs. 295-304.
24. **D., Shapiro S. Demeo.** *Genomic Physiology in animals.* Oxford : Silverman EK, Shapiro SD, Lomas D, Weiss SA, editors., 2005. págs. 177-190.
25. *Animal models of occupational asthma.* **M.H, Karol.** 7, Texas : s.n., 1994, Eur Respir J, págs. 555-568.
26. *Invasive and non invasive methods for studying pulmonary function.* **Thomas Glaab, Christian Taube, Armin Braun, Wayne Mitzner.** 63, 2007, Respiratory Research, Vol. 8.
27. *CD4⁺ T- Lymphocytes and interleukin-5 mediate antigen-induced eosinophil infiltration into the mouse trachea.* **Nakajima H, Iwamoto I, Tomoe S, Matsumura R, Tomioka H, Takatsu K, Yoshida S.** 146, s.l. : Am Rev Respir Dis, 1992, págs. 374-377.
28. *Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice.* **Coffman RL, Seymour BWP, Hudak S, Jackson J, Rennick D.** 245, s.l. : Science, 1989, págs. 308-310.
29. *Asthma and inflammation.* **AB, Kay.** 87, s.l. : J Allergy Clin Immunol, 1991, págs. 893-910.
30. *Eosinophils, bronchial hyperreactivity and late-phase asthmatic reactions.* **Durham SR, Kay AB.,** 15, s.l. : Clin Allergy, 1985, págs. 411-418.
31. *Modelling allergic asthma in mice: pitfalls and opportunities.* **Kumar RK, Foster PS.** 27, 2002, Am J Respir Cell Mol Biol, págs. 267-272.
32. *Airway Hyperreactivity in exacerbation of chronic asthma is independent of eosinophilic inflammation.* **Jessica S. Siegle, Nicole Hansbro, Cristan Herbert, Ming Yang, Paul S. Foster, Rakesh K. Kumar.** June de 2006, American Journal of respiratory cell and molecular biology, Vol. 35, págs. 565-570.
33. *Cordula Koerner-Rettberg, Sandra Doths, Anke Stroet, Jürgen Schwarze. Reduced lung function in a chronic asthma model is associated with prolonged inflammation, but independent of peribronchial fibrosis.* Luxembourg : s.n., 2008. PLoS one.
34. *Chronic inhaled ovalbumin exposure induces antigen-dependent but not antigen-specific inhalational tolerance in a murine model of allergic airway disease.* **Craig M. Schramm., Lynn Puddington, Caro Wu, Linda Guernsey, Mehrnaz Gharaee-Kermani, Sem H. Phan, Roger S. Thrall.** 1, Washington : s.n., 2004, American Journal of Pathology, Vol. 164, págs. 295-303.
35. *Interactions between leukotriene C4 and Interleukin 13 Signaling Pathways in a mouse model of airway disease.* **Chavez J, Young H, Corry D, Lieberman M.** 2006, Arch Pathol Lab Med, Vol. 130, págs. 440-446.
36. *A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III, and alpha 1-proteinase inhibitor .* **Hunt LT, Dayhoff MO.** 864-871, s.l. : Biochemical and biophysical research communications, 1980, Vol. 95(2).
37. *Animal models of asthma.* **Shapiro, Steven D.** s.l. : American journal of respiratory and critical care medicine, 2006, Vol. 174, págs. 1171-1178.

38. *The "Classical" ovalbumin challenge model of asthma in mice.* **Rakesh K. Kumar, Cristian Herbert and Paul S. Foster.** 6, Australia : s.n., 2008, Current Drug Targets, Vol. 9, págs. 485-494.
39. *Inflammatory mediators of asthma: an update .* **Barnes, P.J., K.F. Chung, C.P. Page.** 50, 1998, Pharmacology, págs. 515-596.
40. *Leukotrienes and inflammation.* **Busse, W.W.** 157, 1998, American Journal of Respiratory critic care medical, págs. 210-213.
41. *The biologically active leukotrienes.* **Lewis R A, Austen K F,.** 1984, J Clin Invest , Vol. 73, págs. 889-897.
42. *Leukotrienes and airway responses .* **Drazen J M, Austen K F,.** 136, 1987, Am Rev Resp Dis, págs. 985-998.
43. *Mouse models of airway responsiveness: physiological basis of observed outcomes and analysis of selected examples using these outcome indicators.* **Drazen JM, Finn PW, De Sanctis GT.** 61, 1999, Annu Rev Pysiol, págs. 593-625.
44. *Cysteinyl Leukotrienes and Their Receptors: Cellular Distribution and Function in Immune and Inflammatory Responses.* **Kanaoka Y, Boyce J. A.** 173, 1994, The Journal of Immunology, págs. 1503-1510.
45. *Leukotriene C: slow-reacting substance from murine mastocytoma cells .* **Murphy R C, Hammaström S, Samuelsson B.** USA : s.n., 1979, Proc Natl Acad Sci , Vol. 76, págs. 4275-4279.
46. *Leukotrienes as mediators of asthma.* **S. Nicosia, V. Capra, G.E. Rovati.** 14, 2001, Pulmonary Pharmacology & Therapeutics, págs. 3-19.
47. **J., Drazen.** Regulation by Leukotrienes. [ed.] JB West RG Crystal. *The Lung.* s.l. : Raven Press, 1991, págs. 917-926.
48. *Elevated levels of leukotriene C4 in bronchoalveolar lavage fluid from atopic asthmatics after endobronchial allergen challenge .* **Wenzel, S.E., G. L. Larsen, K. Johnston, N. F. Voekel et al.** 142, 1990, American Rev of respiratory disease, págs. 112-119.
49. *The importance of leukotrienes in airway inflammation in a mouse model of asthma.* **Henderson, W.R., Jr., D.B. Lewis, R. K. Albert, Y. Zhang , W.J. Lamm, G.K. Chiang, F. Jones, P. Eriksen, Y.T. Tien, M. Jonas, and E.Y. Chi.** 184, 1996, J. Exp. Med, págs. 1483-1494.
50. *Effects of dexamethasone on leukotriene synthesis and airway responses to antigen and leukotriene D4 in rats.* **Powell, W.S., L. J. Xu and J. G. Martin.** 151, 1995, Am J. Respi. Crit. Care Med, págs. 1143-2250.
51. *Increased leukotriene E4 excretion during antigen-induced bronchoconstriction in allergic sheep.* **Tagari, P., W. M. Abraham, J. McGolrick, S. Charleson, M. Soler, A. Ahmed, A.Cortez and A. W. Ford-Hutchinson.** 68, 1990, J. Appl. Physiol, págs. 1321-1327.
52. *Identification, molecular cloning, expression and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor.* **Sarau HM, Ames RS, Chambers J, Ellis C, Elshourbagy N, Foley JJ, Schmidt DB, Muccitelli RM, Jenkins O, Murdock PR, Herrity NC, Halsey W, Sathe G, Muir AI, Nuthulaganti P, Dytko GM, Buckley PT, Wilson S, Bergsma DJ, Hay DW.** 56, s.l. : Mol Pharmacol, 1999, Vol. 3, págs. 657-673.
53. *Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor.* **Heise CE, O'Dowd BF, Figueroa DJ, Sawyer N, Nguyen T, Im DS, Stocco R, Bellefeuille JN, Abramovitz M, Cheng R, Williams DL Jr, Zeng Z, Liu Q, Ma L, Clements MK, Coulombe N, Liu Y, Austin CP, George SR, O'Neill GP, Metters KM, Lynch KR, Evans JF.** 29, 2000, J Biol Chem. 275(39):30531-6.
54. *Involment of the Cysteinyl-Leukotrienes in Allergen-Induced Airway Eosinophilia and Hyperresponsiveness in the Mouse.* **Seok-Yong E, Karim M, Qutayba H, Holly C, David H, James G.** 203, American Journal of Respiratory Cell and Molcular Biology, Vol. 28, págs. 25-32.
55. *A barometric method for measuring ventilation in newborn infants .* **Drorbaugh JE, Fenn WO.** 81-87, s.l. : Pediatrics, 1955, Vol. 16.

56. *A theoretical analysis of the barometric method for measurement of tidal volume.* **Epstein MA, Epstein RA.** 105-120, s.l. : Respir Physiol, 1978, Vol. 32.
57. **Alderete, Jaime Chavez.** Efecto paradójico del salbutamol sobre las vías aéreas en un modelo de intoxicación aguda por organofosforados en cobayos. *Tesis doctoral.* México, Distrito federal : s.n., Noviembre de 2007. pág. 26.
58. **Cervantes, Maria Eugenia Betina Sommer.** Determinación de la hiperreactividad de las vías aéreas por exposición a ozono en el cobayo: diferencias en las respuestas por el uso de agentes broncoconstrictores nebulizados y endovenosos. *Tesis.* Mexico, Distrito federal : s.n., 2001. págs. 11-12.
59. *Nomenclature for leukotriene and lipoxin receptors.* **Brink C, Dahlen Se, Drazen JM, et al.** 55, 2003, Pharmacol Rev, págs. 195-227.
60. *overexpression of leukotriene C4 synthase in bronchial biopsies from patients with aspirin-intolerant asthma .* **Cowburn, A.S. , K. Sladek, J. Soja, L. Adamek, E. Nizankowska, A. Szczeklik, B.K. Lam, J. F. Penrose, K. F. Austen, S.T Holgate, A.P. Sampson.** 101, J. Clin. Invest, págs. 834-846.
61. *The effect of inhaled leukotriene D4 and methacoline on cell differentials in sputum from patients with asthma.* **Diamant Z, Hilterman JT, Van Rensen EL, Callenbach PM, Veselic-Charvat M, van der Veen H, Sont JB, Sterk PJ.** 155, 1997, Am J Respir Crit Care Med, págs. 1247-1253.
62. *Pulmonary gas exchange and sputum cellular responses to inhaled leukotriene D4 in asthma.* **Echazarreta AL, Dahlen B, Garcia G, Agusti C, Barbera JA, Roca J, Dahlen Se, Rodriguez-Roisin R.** 164, 2001, Am J Respir Crit Care Med, págs. 202-206.
63. *Persisten airway eosinophilia after leukotriene D4 administration in the guinea pig: Modulation by the LTD4 receptor antagonist, pranlukast, or an interleukin-5 monoclonal antibody.* **Underwood DC, Osborn PR, Newshole SJ, Torphy TJ, Hay DW.** 154, 1996, Am J Respir Crit Care Med, págs. 850-857.
64. *The effect of leukotriene D4 inhalation on the antigen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation in 5-lipoxygenase gene-deficient mice.* **Naoki Kawada, Takatoshi Yamada, Yoshimasa Takahashi, Shouta Tokuoka, Taisei Masuda, Hiroyuki Tanaka, Hiroichi Nagai.** 126, 2001, Int Arch allergy Immunol, págs. 309-317.
65. *The roles of Cysteinyl Leukotrienes in Eosinophilic Inflammation of Asthmatic Airways.* **Makoto Nagata, Keiko Saito.** s.l. : Int Arch Allergy Immunol, 2003, Vol. 131, págs. 7-10.
66. *Leukotrienes in asthma: the potential therapeutic role of antileukotriene agents .* **L.J., Smith.** 156, 1996, arch Intern Med, págs. 2181-2189.
67. *Characterization of the human cysteinyl leukotriene cysLT1 receptor.* **Lynch K.R. G.P. O'Neill, Q. Liu, D.S IM, N. Sawyer, K.M Metters, N. Coulombe, M. Abramovit, D.J Figueroa, Z. Zeng, B.M Conolly, C. Bai, C.P. Austin, A. Chateaufneuf, R. Stocco, G.M. Greig, S.Kargman, S.B. Hooks, E. Hosfield, D.L. Williams Jr., A.W.Ford-Hut.** 399, 1999, Nature, págs. 789-793.
68. *Characterization of specific receptors for leukotriene D4 on human alveolar macrophages.* **Opmeer, F.A., and H.C Hoogsteden.** 28, 1984, Prostaglandins, págs. 183-194.
69. *Leukotriene receptors antagonists and synthesis inhibitors reverse survival in eosinophils of asthmatic individuals.* **Lee E, Robertson T., Smith J, Kilfeather S.** 161, 2000, Am J Respir Crit Care Med, págs. 1881-1886.
70. *The classical ovalbumin challenge model of asthma in mice.* **R.K. Kumar, C. Herbert, P. Foster.** 9, 2008, current drug targets, págs. 485-494.
71. *Polymorphisms in IL-4R Correlate with Airways Hyperreactivity, Eosinophilia, and Ym Protein Expression in Allergic IL-13-/- Mice.* **Webb D. C., Matthaei K. I., Cai Yeping, Mc Kenzie A., Foster P.** January de 2004, J. Immunol, Vol. 172, págs. 1092-1098.

72. *Leukotrienes and inflammation*. **Busse, W.W.** 157, 1998, American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.
- 73.
74. *Structure and properties of ovalbumin*. **Huntington JA, Stein PE.** 189-198, s.l. : Journal of Chromatography, 2001, Vols. B 756(1-2).
75. *Pulmonary responses to bronchoconstrictor agonists in the mouse*. **Martin TR, Gerard NP, Galli SJ, Drazen JM.** 64, 1988, J Appl Physiol, págs. 2318-2323.
76. *Measuring lung function in the mouse: the challenge of mouse*. **Irvin CG, Bates JH.** 4, 2003, Respir Res, pág. 4.
77. *A practical guide to evaluating cardiovascular, renal, and pulmonary function in mice*. **JN, Loenz.** 282, 2002, Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol, Vol. RI, págs. 565-582.
78. *Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mast-cell deficient mice*. **Takeda K, Hamelmann E, Joetham A, Shultz LD, Larse GL, Irvin CG.** 186, 1997, J Exp Med, págs. 449-454.
79. *The role of IL-13 in established allergic airway disease*. **Taube C, Duez C, Cui ZH, Takeda K, Rha YH, Park JW, Balhorn A, Donaldson DD, Dakhama A, Gelfand EW.** 2002, J Immunol, Vol. 169, págs. 6482-6489.
80. *Bronchial reactivity to inhaled histamine: a method and clinical survey*. **Cockcroft DW, Killian DN, Mellon JJ, Hargreave FE.,** 7, 1977, Clinical Allergy, págs. 235-243.
81. *Roles of hyperresponsiveness and airway inflammation in bronchial asthma*. **Magnussen H, Nowak D.** 55, 1989, Respiration, págs. 65-74.
82. *The role of leukotrienes and the effects of leukotriene receptor antagonists in the inflammatory response and remodeling of allergic asthma*. **PK, Jeffery.** 2001, Clin Exp Allergy Rev, Vol. 1, págs. 148-153.
83. *The role of leukotrienes in inflammation*. **Jr, Hendeso WR.** 121, 1994, Ann Intern Med, págs. 684-697.
84. *The effect of cysteinyl leukotrienes on growth of eosinophil progenitors from peripheral blood and bone marrow of atopic subjects*. **Braccioni F, Dorman SC, O'Byrne PM, Inman Md, Denburg JA, Parameswaran K, Baatjes AJ, Foley R, Gauvreau.** 110, 2002, J Allergy Clin Immunol, págs. 96-101.
85. **Brewer, J.P.; Kisselgof, A.B. and Martin, T.R.** 160, 1999, Am. J. Respir. Crit. Care Med., págs. 1150-1156.
86. **Whitehead, G.S., Walker J.K., Berman K.G, Foster W.M., Schwartz D.A.** 285, 2003, Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., págs. L32-42.
87. **Herz U., Braun A., Ruckert R., Renz H.** 1998, Vol. 28, págs. 625-634.
88. *Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography*. **Hammelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, Gelfand EW.** 156, 1998, Am J Respir Crit Care Med, págs. 766-775.