



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS**

**Efecto del salbutamol sobre la
concentración de sustancia P y
células inflamatorias en el lavado
bronquioloalveolar de pacientes.
Resultados preliminares**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN:**

NEUMOLOGIA

P R E S E N T A:

ISELA SOLEDAD CISNEROS CHAVEZ



**ASESOR:
Dr. MARIO HUMBERTO VARGAS BECERRA
AGOSTO 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.

Dr. Jorge Salas Hernández
Director de Enseñanza
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
“ Dr. Ismael Cosío Villegas”

Dr. Juan Carlos Vázquez García
Profesor Titular del Curso de Neumología
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
“ Dr. Ismael Cosío Villegas”

Dra. Margarita Fernandez Vega
Jefe del Departamento de Formacion de Posgrado
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
“ Dr. Ismael Cosío Villegas”

Tutor Dr. Mario Humberto Vargas Becerra
Investigador en Ciencias Médicas E
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
“ Dr. Ismael Cosío Villegas”

Tesista

Isela Soledad Cisneros Chávez

Médico Residente de Neumología
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
“ Dr. Ismael Cosío Villegas”

Investigadores

Dr. Mario Humberto Vargas Becerra

Investigador en Ciencias Médicas, Departamento de Investigación en Hiperreactividad
Bronquial
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
“ Dr. Ismael Cosío Villegas”

Dr. Dante Escobedo Sánchez

Jefe del Servicio de Broncoscopio y Endoscopia
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
“ Dr. Ismael Cosío Villegas”

Dr. Jaime Chávez Alderete

Investigador en Ciencias Médicas, Departamento de Investigación en Hiperreactividad
Bronquial
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
“ Dr. Ismael Cosío Villegas”

Dra. Patricia Segura Medina

Jefe del Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
“ Dr. Ismael Cosío Villegas”

Agradecimientos

Dr. Mario Vargas por darme la oportunidad de crecer a su lado.

Dr. Jaime Chávez por el apoyo incondicional, gracias por todo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Al laboratorio de Hiperreactividad Bronquial por abrirme sus puertas para la investigación.

A la Dra Patricia Segura por

A mi familia por darme un ejemplo a seguir.

A mis amigos de toda la vida Marco Antonio, Renata, Ariadna.

A Mónica y Martha por todo sus consejos.

Al Dr. Galván, y al Dr. Castañeda, por estar siempre ahí.

Al Dr. Amador, gracias por toda la confianza.

A ti David, por todo tu apoyo y darme la oportunidad de cumplir este sueño.

A mi familia elegida en este INER, Claudia Mora, Enrique Olaya, Gerardo Magdaleno, Heideger Mateo, David Sandoval, Mariano Díaz, Fabiola Fernández, Gabriela Millán, Irving Landero, Angel Velazquez, Carlos Bonilla, Ernesto Franco, Aleida Champet, Nadia Quiroz, Julio Castañon, Carlos Gomez, Arturo Cortez, Cesar Salazar, Olivia Sánchez, Ariel Rumbo, Edilzar González.

A mis compañeros, maestros y pacientes por darme la oportunidad de compartir este tiempo a su lado.

INDICE

ANTECEDENTES.....	3
Relevancia del salbutamol en la exacerbación asmática.....	3
Efecto negativo del salbutamol sobre el control del asma.....	4
Posible papel de sustancia P y acetilcolina en el descontrol del asma inducido por salbutamol.....	4
JUSTIFICACIÓN.....	6
OBJETIVO GENERAL.....	6
HIPÓTESIS.....	6
MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
Definición del centro.....	7
Diseño del estudio.....	7
Población y grupos de estudio.....	7
<i>Grupo experimental</i>	7
<i>Grupo control</i>	7
Criterios de selección.....	8
<i>Criterios de inclusión</i>	8
<i>Criterios de exclusión</i>	8
<i>Criterios de eliminación</i>	8
Tamaño de la muestra.....	8
Broncoscopia y lavado bronquioloalveolar.....	9
Citología.....	9
Cuantificación de sustancia P.....	10
Análisis estadístico.....	10
RESULTADOS.....	11
DISCUSIÓN.....	13
CONCLUSIONES.....	16
REFERENCIAS.....	17
ANEXOS.....	20

RESUMEN

Antecedentes. Una característica del asma es la inflamación crónica de la vía aérea que se asocia con hiperreactividad bronquial. Los fármacos agonistas adrenérgicos β_2 , en especial el salbutamol, son desde hace varias décadas la base para el tratamiento farmacológico de la exacerbación asmática. La sustancia P es un undecapéptido que es secretado por nervios sensoriales (fibras C) y células inflamatorias como macrófagos, eosinófilos, linfocitos y células dendríticas. Puede liberarse por reto antigénico, histamina, prostaglandinas y leucotrienos, y al actuar sobre su receptor (NK1) provoca inflamación neurogénica, además de aumentar la contractilidad del músculo liso e inducir hipersecreción. Se sospecha que tiene un papel importante en el asma.

Objetivo. Demostrar que la administración de salbutamol por vía inhalatoria causa un aumento estadísticamente significativo de la concentración de sustancia P en el lavado bronquioloalveolar (LBA) de las vías aéreas de sujetos humanos (pacientes que son sometidos a broncoscopia diagnóstica por sospecha de cáncer pulmonar).

Material y métodos. Se trató de un prospectivo, experimental, transversal y analítico, donde se recolectaban a pacientes a los cuales, se les realizaría una broncoscopia diagnóstica con Sospecha de Cáncer Pulmonar, se informaba, solicitaba consentimiento informado y de forma aleatoria se les asignaba un grupo control y experimental, y se les administraba por vía inhalatoria (2.5 mg de Salbutamol) (3.0 ml de solución salina) respectivamente, posterior a ello, se sometían a Estudio de Broncoscopia, donde se realizaba LBA y posterior se realiza conteo de celularidad y cuantificación de Sustancia P y acetilcolina.

Resultados. Se estudiaron 25 pacientes, 44% hombres y 56% mujeres, con una edad promedio (\pm error estándar) de 56.0 ± 3.3 años (extremos de 19 a 86 años). De estos pacientes, 10 correspondieron al grupo control y 15 al grupo experimental. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos con respecto a las principales características de los pacientes. La concentración de la sustancia P en el líquido de LBA tuvo una tendencia a ser mayor en los pacientes que recibieron salbutamol (3.62 ± 0.42 pg/ml), en comparación con el grupo control (3.03 ± 0.40 pg/ml) pero que no alcanzó a tener significancia estadística ($p=0.35$). En comparación con el grupo control, los pacientes que recibieron salbutamol tuvieron una tendencia a presentar menor cantidad de eosinófilos, neutrófilos y linfocitos, en especial con respecto a los eosinófilos ($26,372 \pm 9797$ células/ml en el grupo experimental vs $154,616 \pm 81,622$ células/ml en el grupo control, $p=0.087$).

Conclusiones. La hipótesis planteada en nuestro estudio, solo demuestra que existe muy ligera tendencia a la elevación de Sustancia P posterior a la administración de salbutamol en relación con el grupo control. Por lo que es importante continuar investigando dicha asociación para poder determinar que el uso de salbutamol de forma regular provoca el descontrol.

ANTECEDENTES

Relevancia del salbutamol en la exacerbación asmática

El asma es la enfermedad respiratoria crónica más frecuente en el mundo; se estima que existen 300 millones de individuos afectados y la prevalencia global abarca entre el 1 y el 18% en las diferentes poblaciones.¹ Una característica del asma es la inflamación crónica de la vía aérea que se asocia con hiperreactividad bronquial, lo que induce episodios recurrentes de disnea, opresión torácica, sibilancias, tos y obstrucción variable al flujo de aire que puede ser cuantificado mediante la espirometría o flujometría. Al incremento progresivo de los síntomas que ocurre en un tiempo relativamente corto se le conoce como exacerbación asmática (también llamada crisis asmática o asma agudizada); la gravedad de estas exacerbaciones puede ir desde leve hasta potencialmente fatal.²

Los fármacos agonistas adrenérgicos β_2 , en especial el salbutamol, son desde hace varias décadas la base para el tratamiento farmacológico de la exacerbación asmática, donde el espasmo del músculo liso traqueobronquial es el componente principal.^{1,3} Estos medicamentos producen broncodilatación al unirse a los receptores adrenérgicos β_2 del músculo liso de las vías aéreas, originando la activación de una proteína Gs que, a su vez, favorece la actividad de la adenilato ciclasa e incrementa así las concentraciones intracelulares de AMP cíclico (cAMP). Este último compuesto actúa como segundo mensajero, modulando numerosos procesos involucrados en la relajación del músculo liso de la vía aérea, en especial a través de la activación de la cinasa de proteína A (PKA), tales como la reducción de la concentración de Ca^{2+} intracelular, la activación de canales de K^+ , la inhibición de la hidrólisis de polifosfoinositoles de la membrana celular, la inhibición de la interacción del trifosfato de inositol (IP_3) con su receptor en el retículo sarcoplásmico y la inhibición de la fosforilación de la cinasa de la cadena ligera de miosina.⁴

El salbutamol, llamado también en algunos países albuterol, fue introducido al mercado en 1969 y es, por mucho, uno de los agonistas adrenérgicos β_2 más empleados en el tratamiento de la exacerbación asmática. El salbutamol tiene una alta selectividad para el receptor β_2 (>500 veces que para el β_1). Después de su aplicación por vía inhalatoria, su

efecto broncodilatador inicia rápidamente (2 a 3 min después), la máxima broncodilatación se alcanza en alrededor de 15 min y su efecto persiste por 4-6 h.

Efecto negativo del salbutamol sobre el control del asma

A pesar del papel tan relevante del salbutamol para el control de las exacerbaciones asmáticas, cuando este medicamento se emplea en forma regular varias veces al día (es decir, en forma horaria) existe mayor descontrol del asma, en comparación con sujetos que sólo lo usan cuando es necesario (PRN) para aliviar los síntomas.⁵⁻⁷ Este efecto adverso es más notable cuando el salbutamol se emplea como monoterapia sin el uso concomitante de corticosteroides.

Otros agentes adrenérgicos β_2 distintos al salbutamol han sido señalados como causantes de un incremento en la mortalidad de pacientes asmáticos. A principio de los años 1960s se presentó en el Reino Unido un aumento inexplicable del número de muertes de pacientes asmáticos, y algo similar ocurrió en la década de los 1970s en Nueva Zelanda. La primera de estas epidemias de mortalidad se atribuyó al isoproterenol, mientras que la segunda fue asociada al fenoterol.⁸ En ambas epidemias la mortalidad entre pacientes asmáticos disminuyó abruptamente al ser retirados del mercado los fármacos inculpados. En fecha más reciente el uso de salmeterol también se ha asociado con mayor mortalidad en pacientes asmáticos afroamericanos, especialmente en aquellos que no están siendo tratados simultáneamente con glucocorticosteroides inhalados,^{9,10} y un metaanálisis parece corroborar que el uso regular y prolongado de agentes agonistas β_2 de larga acción incrementa las muertes por asma y las exacerbaciones asmáticas graves que requieren hospitalización.¹¹

Posible papel de sustancia P y acetilcolina en el descontrol del asma inducido por salbutamol

Hace algunos años en el Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial del INER se llevaron a cabo experimentos para dilucidar los mecanismos por los cuales los insecticidas organofosforados producen broncoobstrucción en cobayos.¹² En este estudio se demostró que dicha obstrucción es de naturaleza colinérgica, y sorpresivamente se encontró

que el salbutamol, ya sea administrado por vía inhalatoria o intraperitoneal, causaba una broncodilatación inmediata que sólo duraba unos pocos minutos, reapareciendo posteriormente la obstrucción, lo que hizo sospechar que el salbutamol desencadenaba un mecanismo obstructivo adicional. En un estudio subsecuente, diseñado específicamente para investigar ese posible mecanismo obstructivo del salbutamol,¹³ fragmentos de tráquea de cobayo se incubaron con fisostigmina (para producir una contracción colinérgica) y al adicionar salbutamol se producía una relajación transitoria, que daba paso a una recontracción. Esta recontracción desapareció al preincubar con un antagonista de los receptores NK₁ o un antagonista de receptores M₂, sugiriendo que era producida por la presencia de sustancia P y/o acetilcolina, respectivamente. Más aún, cuando estas tráqueas se incubaron durante una hora con fisostigmina, con la adición de salbutamol en la segunda mitad de este período, la concentración de sustancia P (y en menor grado también la concentración de acetilcolina) presente en el líquido del baño (~5 ml) al final del período fue mayor que en los tejidos controles igualmente incubados con fisostigmina pero sin salbutamol, lo que demostró claramente que el salbutamol liberaba sustancia P y acetilcolina. Nuestros resultados son apoyados por un estudio previo de Keir y col. (2002) en cobayos, en el que la administración continua de salbutamol por 10 días originaba hiperreactividad de las vías aéreas en estos animales, siendo evitada si antes del tratamiento se les administraba capsaicina para depletar a las fibras sensoriales de sus neurotransmisores, en especial la sustancia P.¹⁴

La sustancia P es un undecapéptido con fórmula Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ que es secretado por nervios sensoriales (fibras C) y células inflamatorias como macrófagos, eosinófilos, linfocitos y células dendríticas.¹⁵ Puede liberarse por reto antigénico, histamina, prostaglandinas y leucotrienos, y al actuar sobre su receptor (NK₁) provoca inflamación neurogénica, además de aumentar la contractilidad del músculo liso e inducir hipersecreción. Se sospecha que tiene un papel importante en el asma.¹⁶

Debido a las propiedades proinflamatorias de la sustancia P, resulta evidente que su posible liberación por el salbutamol podría ser una explicación del descontrol que origina este medicamento. Por lo tanto, en el presente estudio se evaluó si la administración

inhalatoria de salbutamol es capaz de liberar sustancia P y acetilcolina en las vías aéreas de seres humanos. En este reporte se presentan los resultados preliminares obtenidos con los primeros 25 pacientes estudiados.

JUSTIFICACIÓN

Los agonistas β_2 de corta duración como el salbutamol siguen siendo los agentes más importantes para el tratamiento de la exacerbación asmática. Sin embargo, se ha informado que, paradójicamente a lo esperado, su uso regular provoca descontrol y agravamiento del asma.⁵

En un estudio en tráqueas de cobayo se demostró que el salbutamol es capaz de liberar sustancia P y, en menor grado, acetilcolina.¹³ En vista del potente efecto que la sustancia P tiene para promover inflamación es importante explorar si esto también ocurre en las vías aéreas del ser humano. De corroborarse lo anterior, este fenómeno podría ser una posible explicación de por qué el uso regular de salbutamol provoca descontrol en el asma.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar que la administración de salbutamol por vía inhalatoria causa un aumento estadísticamente significativo de la concentración de sustancia P en el lavado bronquioloalveolar (LBA) de las vías aéreas de sujetos humanos (pacientes que son sometidos a broncoscopia diagnóstica por sospecha de cáncer pulmonar).

HIPÓTESIS

La administración inhalatoria de salbutamol provoca un aumento estadísticamente significativo de la concentración de sustancia P y acetilcolina en el LBA efectuado en las vías aéreas de seres humanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Definición del centro

El estudio fue diseñado y realizado en el INER, que es un hospital de referencia de tercer nivel e instituto de investigación descentralizado que provee servicios de salud en el ámbito de las enfermedades respiratorias y otorrinolaringológicas. La mayoría de los pacientes que acuden al INER residen en el Distrito Federal, área metropolitana o estados circunvecinos. Los pacientes usualmente son referidos de otros centros hospitalarios o acuden de manera espontánea.

Diseño del estudio

Se trató de un prospectivo, experimental, transversal y analítico. El estudio fue aprobado por el comité institucional de Ciencia y Bioética en Investigación con el número de registro C19-07 (**anexo 1**), se obtuvo consentimiento informado por parte de los pacientes garantizando la confidencialidad de los datos y de los pacientes.

Población y grupos de estudio

En el Servicio de Broncoscopia y Endoscopia del INER se detectaron aquellos sujetos adultos que estaban programados para realizárseles una broncoscopia flexible con fines diagnósticos por sospecha de cáncer broncogénico, y después de darles una explicación detallada del presente estudio se les invitó a participar en el mismo. Aquellos sujetos que aceptaron participar y firmaron la carta de consentimiento informado se asignaron de forma aleatoria a uno de dos grupos de estudio, y 20 a 25 minutos antes de iniciar la broncoscopia se les administró una nebulización con un nebulizadores tipo Hudson conectado a una toma hospitalaria de oxígeno abierta a 3-5 L/min, recibiendo lo siguiente:

Grupo experimental

3 ml de solución salina al 0.9% conteniendo 2.5 mg de salbutamol (Ventolin[®], Glaxo Smith Kline).

Grupo control

3 ml de solución salina al 0.9%.

Durante la broncoscopia se les realizó LBA en el pulmón contralateral al pulmón con sospecha de cáncer (este lavado sirvió para medir la concentración de sustancia P por inmunoanálisis y la acetilcolina por HPLC). Una vez terminado este lavado se continuó con las maniobras programadas con fines diagnósticos de cáncer pulmonar.

Criterios de selección

Criterios de inclusión

1. Pacientes de cualquier sexo y mayores de 18 años de edad.
2. Con indicación de broncoscopia flexible por sospecha diagnóstica de cáncer pulmonar.
3. Sin antecedente de uso regular de agonistas β_2 -adrenérgicos
4. Sin sospecha clínica de broncospasmo al momento del estudio.
5. Que hayan aceptado voluntariamente participar en el estudio y firmado la carta de consentimiento informado.

Criterios de exclusión

1. Que exista sospecha de diseminación del cáncer en ambos pulmones.
2. Que existan causas médicas que impidan prolongar el tiempo del procedimiento broncoscópico.

Criterios de eliminación

1. Pacientes en quienes no haya sido posible obtener un LBA apropiado (se definirá como apropiado cuando el lavado contenga al menos 300,000 células por ml)

Tamaño de la muestra

Este es un tópico inédito, por lo que no existen publicaciones previas en humanos en las cuales basar un cálculo de muestra. El único estudio publicado en el que se ha cuantificado sustancia P liberada por vías aéreas con o sin salbutamol fue el realizado en tráqueas aisladas de cobayo.¹³ En este estudio la concentración de sustancia P en el líquido que bañaba tráqueas con salbutamol era mucho mayor (mediana 34.9 pg/ml) que la encontrada

en tráqueas sin salbutamol (mediana <3.9 pg/ml). La distribución de los valores individuales fue no normal, por lo que para calcular el tamaño muestral seguimos la recomendación del Dr. Steve Simon (bioestadígrafo del Children's Mercy Hospital & Clinics, www.childrensmercy.org/stats/size/mann.asp) quien sugiere calcular el tamaño de muestra como si fuera distribución normal y después dividir entre 0.864 para ajustarlo por su no normalidad. Así, si tomamos los promedios \pm desviación estándar calculados para estos grupos (41.8 ± 16.9 pg/ml vs 5.1 ± 2.1 pg/ml, respectivamente) el tamaño muestral mínimo para un valor alfa de 0.05 y poder de 95% sería 7 pacientes por grupo (PS Power and Sample Size Calculations v2.1), que no varía al ajustarlo por la falta de normalidad.

Obviamente, el cálculo anterior basado en un estudio *in vitro* no es posible traspolarlo directamente a humanos. Por factibilidad, consideramos que podremos reunir 60 pacientes (30 en cada grupo). En la presente tesis reportamos los resultados preliminares de los primeros 25 pacientes estudiados.

Broncoscopia y lavado bronquioloalveolar

El procedimiento broncoscópico se realizó estando el paciente bajo sedación consciente con midazolam a dosis respuesta, y previa anestesia local de la orofaringe con lidocaína al 10%, así como del árbol traqueobronquial con instilación de lidocaína al 2%. Con el paciente en posición de decúbito supino se introdujo un videobroncoscopio Olympus BF XT-160 ó TE 2 dirigiéndolo hacia el pulmón del lado opuesto al que se sospecha contenga la tumoración. Después de exploración inicial del árbol bronquial, y una vez corroborado su aspecto de normalidad, se seleccionó un lóbulo, generalmente el lóbulo medio o de la llingula, para efectuar el LBA con 120 ml de solución salina normal a temperatura ambiental procurando recuperar al menos el 40 % de lo instilado. Posteriormente, el broncoscopio se dirigió hacia el pulmón sospechoso de albergar la tumoración y se continuó con las maniobras diagnósticas programadas.

Citología

Las muestras de LBA recuperadas en jeringas de 60 ml se depositaron inmediatamente en hielo y se enviaron al laboratorio, donde se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min a 4°C.

El sobrenadante se dividió en dos alícuotas que se guardaron a -70°C hasta que se usaron para determinar la concentración de sustancia P y acetilcolina. El botón celular se usó para evaluar la viabilidad celular mediante el método de azul tripan y hacer cuenta celular total en cámara de Neubauer, así como para hacer frotis que se tiñeron con tinción de Romanowsky (Cytospin®, Wescor, Logan, UT, EUA) y hacer cuenta diferencial mediante microscopía convencional.

Cuantificación de sustancia P

Las muestras de LBA se filtraron, liofilizaron y reconstituyeron, con lo cual se concentraron 60 veces. La sustancia P se cuantificó con un equipo comercial de inmunoensayo (Cayman Chem., Ann Arbor, MI, EUA), con lectura a 405 nm usando un fotómetro (Multiskan, Labsystems Oy, Helsinki, Finlandia). Una vez que las unidades ópticas se compararon con las curvas estándar y que se corrigió por el factor de concentración, la cantidad final de sustancia P se expresó en pg/ml. Los límites de detección de sustancia P de este equipo van de 3.9 a 500 pg/ml. En las muestras concentradas de LBA se midió la acetilcolina mediante detección electroquímica con HPLC (modelo 9012, Varian, Walnut Creek, CA, EUA) de acuerdo a la técnica usada en el Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial.¹³ El límite de detección de este sistema es de alrededor de 0.1 nM.

Análisis estadístico

Después de comprobar que las variables de intervalo seguían una distribución normal (prueba de Kolmogorov-Smirnov) se usó promedio \pm error estándar para describir las características generales de la población, y se empleó prueba t de Student no pareada para evaluar diferencias entre el grupo control y el experimental y análisis de correlación de Spearman para buscar asociación entre dos variables. En el caso de las variables categóricas se emplearon frecuencias para su descripción y prueba exacta de Fisher para la comparación entre ambos grupos. La significancia estadística se fijó en un valor de $p < 0.05$ bimarginal.

RESULTADOS

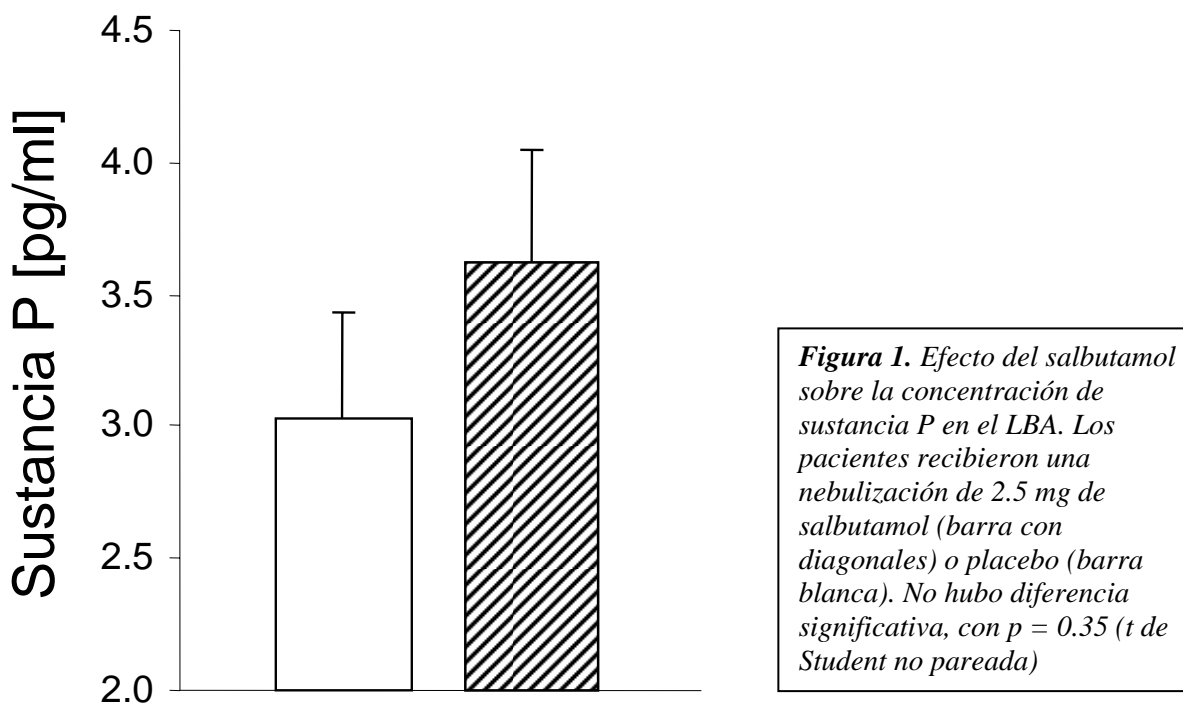
Se estudiaron 25 pacientes, 44% hombres y 56% mujeres, con una edad promedio (\pm error estándar) de 56.0 ± 3.3 años (extremos de 19 a 86 años). De estos pacientes, 10 correspondieron al grupo control y 15 al grupo experimental. Como se puede observar en la **Tabla 1**, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos con respecto a las principales características de los pacientes.

Tabla 1. Características generales de los pacientes estudiados

	Grupo control (n = 10)	Grupo experimental (n = 15)	p
Sexo (M:F)	6:4	5:10	0.24
Edad (años)	54.2 ± 7.1	57.3 ± 3.1	0.66
Diagnóstico final			
Adenocarcinoma	3	3	0.65
Neumonía	2	2	1.00
Cáncer epidermoide	1	2	1.00
Tumor carcinoide	1	2	1.00
Otros tumores	2	1	0.54
Tuberculosis	2	0	0.15
Absceso	0	1	1.00
Granuloma	0	1	1.00
Comorbilidades (n)	5	6	0.70
HAS	1	4	0.61
Diabetes	1	3	0.63
Asma	0	2	0.50
EPOC	1	0	0.40
Otros	2	1	0.54
Sitio de la lesión			
LSD	5	5	0.44
LM	1	3	0.63
LID	0	2	0.50
LSI	3	3	0.65
LII	1	2	1.00
Tabaquismo (n)	5	10	0.44
Índice tabáquico (paquetes-año)	74.9 ± 33.2	35.3 ± 17.6	0.26

*Los valores corresponden a frecuencias o a promedio \pm error estándar. *Prueba exacta de Fisher o t de Student no pareada*

La concentración de la sustancia P en el líquido de LBA tuvo una tendencia a ser mayor en los pacientes que recibieron salbutamol (3.62 ± 0.42 pg/ml), en comparación con el grupo control (3.03 ± 0.40 pg/ml) pero que no alcanzó a tener significancia estadística ($p=0.35$) (*Figura 1*).



En el análisis por HPLC no fue posible detectar acetilcolina en el líquido de LBA.

Con respecto a la cuenta celular presente en el LBA, se tuvieron que eliminar del análisis 3 pacientes del grupo experimental y uno del grupo control debido a que la muestra fue sanguinolenta. En la *Figura 2* se muestran los resultados de análisis citológico en el resto de los pacientes. En comparación con el grupo control, los pacientes que recibieron salbutamol tuvieron una tendencia a presentar menor cantidad de eosinófilos, neutrófilos y linfocitos, en especial con respecto a los eosinófilos ($26,372 \pm 9797$ células/ml en el grupo experimental vs $154,616 \pm 81,622$ células/ml en el grupo control, $p=0.087$).

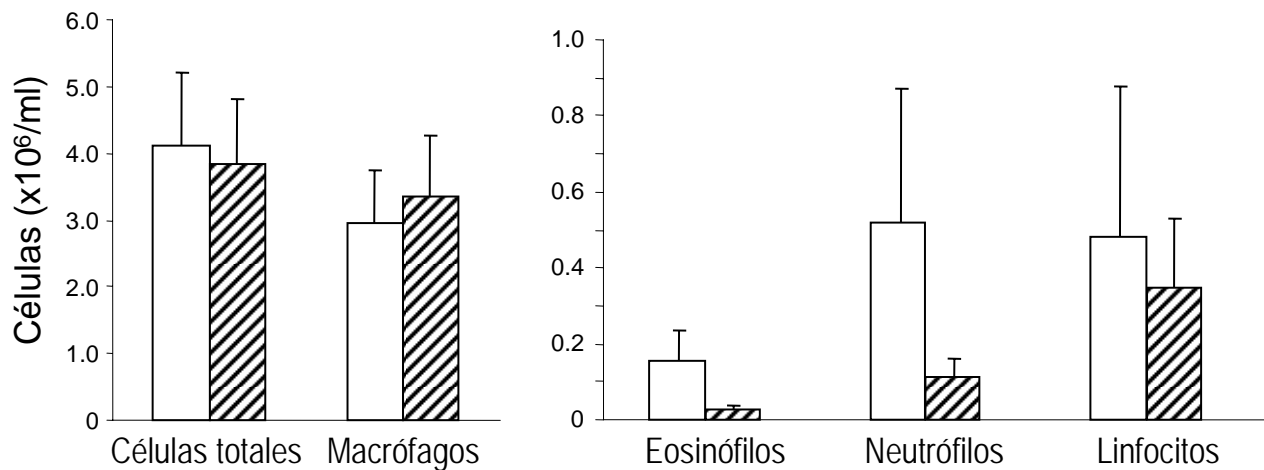


Figura 2. Efecto del salbutamol sobre la celularidad recuperada en el LBA. Los pacientes recibieron una nebulización de 2.5 mg de salbutamol (barra con diagonales) o placebo (barra blanca). No hubo diferencias significativas (*t* de Student no pareada), siendo la más cercana la de los eosinófilos ($p = 0.087$)

La concentración de sustancia P se correlacionó de forma inversa con la cantidad de eosinófilos encontrados en el LBA, con una $r = -0.45$, $p=0.04$ (**Figura 3**). Aunque la sustancia P también tuvo tendencia a correlacionar de forma inversa con células totales, macrófagos y neutrófilos, estas asociaciones no alcanzaron significancia estadística.

DISCUSIÓN

En este estudio se trató de investigar si la nebulización de salbutamol a pacientes que iban a ser sometidos a broncoscopia podía incrementar las concentraciones de sustancia P en el LBA. Los resultados preliminares parecen apoyar esta posibilidad, pues se encontró una tendencia a encontrar concentraciones más elevadas de este neuropéptido en el grupo experimental, si bien no se alcanzó la significancia estadística probablemente debido a que todavía es un número insuficiente de pacientes estudiados. En el análisis del poder del estudio se encontró que éste era apenas del 13%, lo que concuerda con la necesidad de incrementar el tamaño muestral para poder confirmar o descartar nuestra hipótesis.

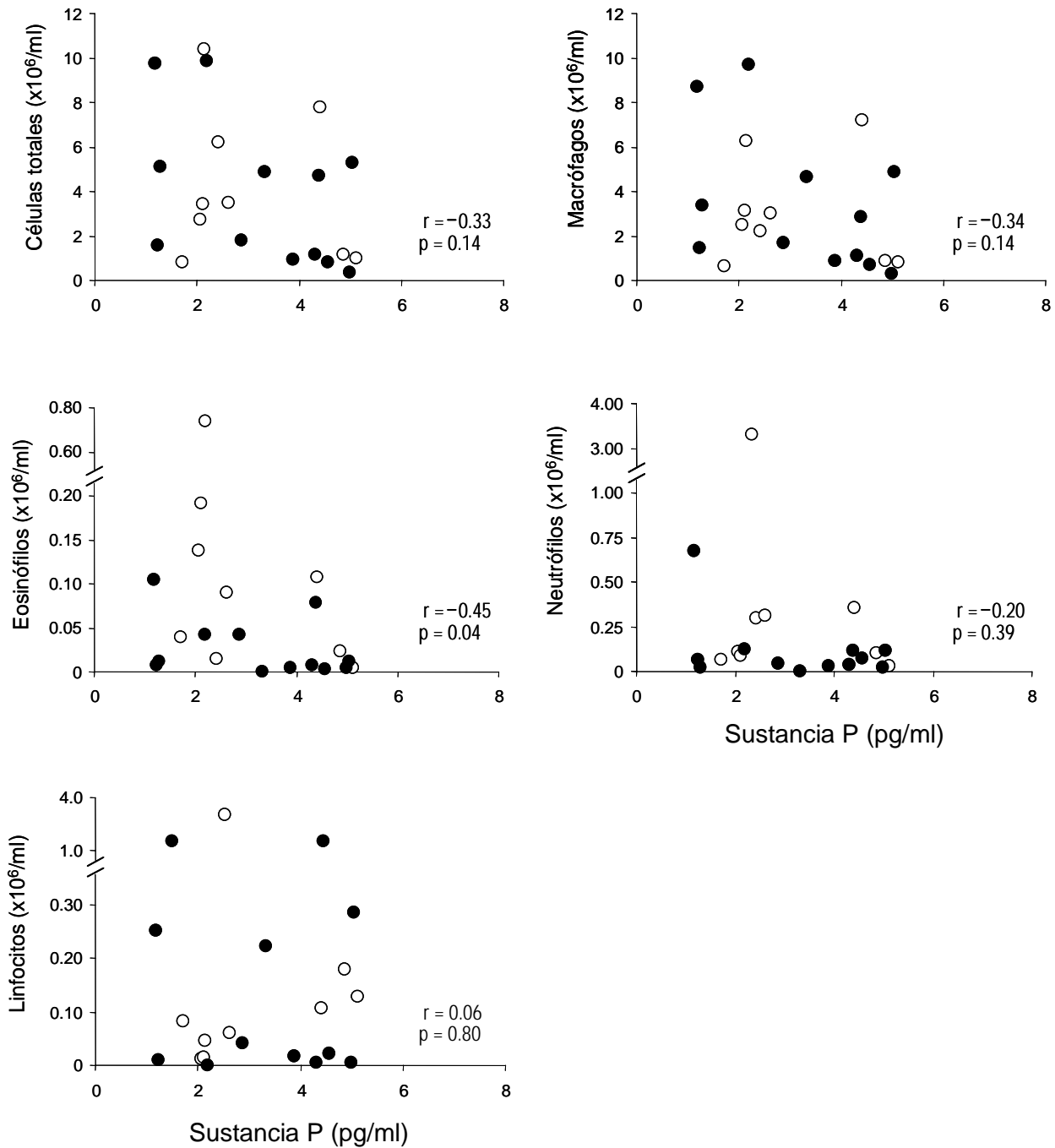


Figura 3. Asociación de la concentración de sustancia P y de la celularidad en el LBA. Los círculos negros corresponden a pacientes que recibieron una nebulización de 2.5 mg de salbutamol antes de la broncoscopia. Los círculos blancos son pacientes que recibieron placebo. En cada panel se muestra el coeficiente de correlación de Spearman y su significancia.

Un hallazgo interesante es que el grupo experimental que recibió salbutamol tuvo una clara tendencia a tener una menor cantidad de eosinófilos en el LBA, en comparación con el grupo control. Si el número de eosinófilos encontrados en el grupo control es el esperada, esto implica que la maniobra experimental (administrar salbutamol) fue capaz de reducirlos con tan solo 25 a 30 minutos de haber sido aplicada. Un efecto así podría encontrarse si el fármaco pudiera inducir apoptosis de los eosinófilos, sin embargo, se sabe que, por el contrario, el salbutamol inhibe la apoptosis de los eosinófilos y también de otras células como del epitelio bronquial, prolongando su supervivencia.¹⁷⁻¹⁹ Otra posibilidad es que el salbutamol esté bloqueando la llegada de nuevos eosinófilos a las vías aéreas y, más específicamente, a la luz bronquial. En este sentido, en un modelo de asma alérgica en ratones se encontró que la administración crónica de salbutamol en los días finales de la sensibilización alérgica a ovoalbúmina redujo notablemente el influjo de eosinófilos a las vías aéreas y al LBA.²⁰ Sin embargo, estudios *in vitro* han encontrado que la administración del salbutamol no modifica la quimiotaxis eosinofílica inducida por PAF,^{21,22} por lo que más que tener un efecto directo sobre el eosinófilo el salbutamol podría estar actuando en otras células distintas evitando la liberación de factores quimiotácticos, pero no hay estudios que apoyen esta hipótesis. Finalmente, el efecto del salbutamol podría estar enfocado en provocar una disminución de la permeabilidad vascular de las vías aéreas.²³

La asociación inversa de la concentración de sustancia P y cantidad de eosinófilos o, en menor grado, de macrófagos, no tiene una explicación clara. Se sabe que la sustancia P es quimiotáctica para eosinófilos y potencia la quimiotaxis inducida por otros compuestos como el PAF, el LTB4 y la IL-5, y además tiene efectos similares sobre linfocitos y monocitos e induce quimiotaxis, adherencias y activación de neutrófilos.²⁴⁻²⁶ Por lo tanto, el efecto esperado era que se relacionara con mayor celularidad en el LBA, lo cual no ocurrió.

Cabe destacar que los datos encontrados en este reporte preliminar son producidos por el efecto agudo de una dosis única de salbutamol, pero en el caso de pacientes asmáticos que usan de forma repetida y por periodos prolongados este medicamento los efectos sobre la sustancia P y la celularidad podrían ser más notables.

CONCLUSIONES

1. En este reporte preliminar encontramos que la inhalación de salbutamol produjo un ligero incremento de la concentración de sustancia P en el LBA, pero que no fue suficiente para alcanzar significancia estadística.
2. La inhalación de salbutamol se asoció con una tendencia a la disminución de la cantidad de eosinófilos recuperados en el LBA.
3. Hubo una asociación inversa de la concentración de sustancia P y la cantidad de eosinófilos en el LBA.

REFERENCIAS

1. GINA. Global strategy for asthma management and prevention. NHLBI/WHO Workshop Report.; Revisión 2006.
2. Cavailles A, Pinot D, Nieves A, Botturi K, Lorec AM, Vervloet D, Lara MT, Magnan A. [Exacerbation in asthma: definitions and immunopathology]. *Presse Med* 2008;37(1 Pt 2):136-142.
3. Sears MR, Lotvall J. Past, present and future--beta2-adrenoceptor agonists in asthma management. *Respir Med* 2005;99(2):152-170.
4. Montaña LM, Vargas, M. H. Fármacos utilizados en el tratamiento del asma. In: Mendoza N, editor. *Farmacología Médica*. México: Ed. Médica Panamericana; 2008.
5. Sears MR, Taylor DR, Print CG, Lake DC, Li QQ, Flannery EM, Yates DM, Lucas MK, Herbison GP. Regular inhaled beta-agonist treatment in bronchial asthma. *Lancet* 1990;336(8728):1391-1396.
6. Swystun VA, Gordon JR, Davis EB, Zhang X, Cockcroft DW. Mast cell tryptase release and asthmatic responses to allergen increase with regular use of salbutamol. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106(1 Pt 1):57-64.
7. Taylor DR, Sears MR, Herbison GP, Flannery EM, Print CG, Lake DC, Yates DM, Lucas MK, Li Q. Regular inhaled beta agonist in asthma: effects on exacerbations and lung function. *Thorax* 1993;48(2):134-138.
8. Hancox RJ. Concluding remarks: can we explain the association of beta-agonists with asthma mortality? A hypothesis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2006;31(2-3):279-288.
9. Nelson HS, Weiss ST, Bleecker ER, Yancey SW, Dorinsky PM. The Salmeterol Multicenter Asthma Research Trial: a comparison of usual pharmacotherapy for asthma or usual pharmacotherapy plus salmeterol. *Chest* 2006;129(1):15-26.
10. O'Byrne PM, Adelroth E. Beta2 deja vu. *Chest* 2006;129(1):3-5.

11. Salpeter SR, Buckley NS, Ormiston TM, Salpeter EE. Meta-analysis: effect of long-acting beta-agonists on severe asthma exacerbations and asthma-related deaths. *Ann Intern Med* 2006;144(12):904-912.
12. Segura P, Chavez J, Montano LM, Vargas MH, Delaunois A, Carbajal V, Gustin P. Identification of mechanisms involved in the acute airway toxicity induced by parathion. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999;360(6):699-710.
13. Chavez J, Segura P, Vargas MH, Arreola JL, Flores-Soto E, Montano LM. Paradoxical effect of salbutamol in a model of acute organophosphates intoxication in guinea pigs: role of substance P release. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292(4):L915-923.
14. Keir S, Page C, Spina D. Bronchial hyperresponsiveness induced by chronic treatment with albuterol: Role of sensory nerves. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110(3):388-394.
15. O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol* 2004;201(2):167-180.
16. Joos GF, Germonpre PR, Pauwels RA. Role of tachykinins in asthma. *Allergy* 2000;55(4):321-337.
17. Kankaanranta H, Lindsay MA, Giembycz MA, Zhang X, Moilanen E, Barnes PJ. Delayed eosinophil apoptosis in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106(1 Pt 1):77-83.
18. Parkkonen J, Hasala H, Moilanen E, Giembycz MA, Kankaanranta H. Phosphodiesterase 4 inhibitors delay human eosinophil and neutrophil apoptosis in the absence and presence of salbutamol. *Pulm Pharmacol Ther* 2008;21(3):499-506.
19. Tse R, Marroquin BA, Dorscheid DR, White SR. Beta-adrenergic agonists inhibit corticosteroid-induced apoptosis of airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285(2):L393-404.
20. Henderson WR, Jr., Banerjee ER, Chi EY. Differential effects of (S)- and (R)-enantiomers of albuterol in a mouse asthma model. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116(2):332-340.

21. Eda R, Sugiyama H, Hopp RJ, Okada C, Bewtra AK, Townley RG. Inhibitory effects of formoterol on platelet-activating factor induced eosinophil chemotaxis and degranulation. *Int Arch Allergy Immunol* 1993;102(4):391-398.
22. Hosford D, Mencia-Huerta JM, Braquet P. Platelet-activating factor (PAF) and PAF antagonists in asthma. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1990;7(3):261-273.
23. Liu CY, Kuo HP. The different effect of salbutamol and aminophylline on platelet activating factor-induced plasma exudation into guinea pig tracheal wall and lumen. *Changeng Yi Xue Za Zhi* 1996;19(3):211-216.
24. Joos GF, Geppetti, P. Neural mechanisms in asthma. *Eur Respir Mon* 2003;23:138-163.
25. Joos GF, Pauwels RA. Pro-inflammatory effects of substance P: new perspectives for the treatment of airway diseases? *Trends Pharmacol Sci* 2000;21(4):131-133.
26. Maggi CA. The effects of tachykinins on inflammatory and immune cells. *Regul Pept* 1997;70(2-3):75-90.

ANEXOS



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
"ISMAEL COSIO VILLEGAS"

COMITÉ DE CIENCIA Y BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

Dr. Mario H. Vargas Becerra
Investigador Principal

DI/CCB/484/07

Asunto: DICTAMEN DEL COMITÉ DE CIENCIA Y BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN.
APROBACIÓN.

Título del proyecto: Evaluación de la capacidad del salbutamol para inducir liberación de
sustancia P y acetilcolina en vías aéreas de humano.

Código asignado por el Comité: C19-07

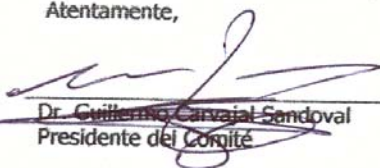
Le informamos que su proyecto de referencia ha sido evaluado por el Comité y las opiniones
acerca de los documentos presentados se encuentran a continuación:

	Nº y/o Fecha Versión	Decisión
Protocolo	7 de septiembre 07	APROBADO
Carta de consentimiento	7 de septiembre 07	APROBADA

Le recordamos que este proyecto deberá ser nuevamente aprobado por el Comité antes de
septiembre de 2008.

Para ello, le rogamos tenga en cuenta que deberá enviar al Comité un reporte de progreso al
menos 40 días antes de la fecha de caducidad anterior. El Comité dispone en su página
electrónica de un formato estándar de reporte de progreso que deberá usarse al efecto.

Atentamente,


Dr. Guillermo Carvajal Sandoval
Presidente del Comité

9 de octubre de 2007

*Recibe consentimiento inform
observación, e informe al título*

CALZ. DE TLALPAN 4502 14080 MEXICO, D.F.



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

CARTA DE CONSENTIMIENTO

para participar en el proyecto de investigación titulado
**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DEL SALBUTAMOL PARA
INDUCIR LIBERACIÓN DE SUSTANCIA P Y ACETILCOLINA EN
VÍAS AÉREAS DE HUMANO”**

México, D. F., a ____ de _____ de 200_

Yo, _____ acepto participar en el estudio de investigación titulado “EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DEL SALBUTAMOL PARA INDUCIR LIBERACIÓN DE SUSTANCIA P Y ACETILCOLINA EN VÍAS AÉREAS DE HUMANO”, que se realizará en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y que ha sido aprobado con el registro _____ por los Comités Científico y Ético de esta institución.

Se me ha explicado que debido a mi enfermedad de los pulmones próximamente se me hará un estudio llamado broncoscopia, que consiste en que estando yo acostado se me meterá por la nariz o por la boca un tubo largo llamado broncoscopio flexible, que se dirigirá hasta mis pulmones y permitirá a los médicos clínicos ver el interior de mis bronquios e incluso tomar muestras de células mediante un ligero enjuague, cepillado o pellizco con una pinza. Entiendo que este estudio de broncoscopia ayudará a que los médicos diagnostiquen con más precisión lo que me pasa en los pulmones, y que los investigadores quieren aprovechar que se me va a hacer esta broncoscopia para al mismo tiempo hacer una investigación relacionada con el asma.

Los investigadores me explicaron que **el propósito** de la investigación es saber si un medicamento llamado salbutamol, que es usado por millones de personas en todo el mundo para curar las crisis de asma, hace que los bronquios liberen dos compuestos llamados “sustancia P” y “acetilcolina”; de comprobarse esta teoría, daría información importante para saber por qué a veces los enfermos con asma no pueden tener un buen control de su enfermedad.

Entiendo que **mi única participación** en la investigación será que unos minutos antes de la broncoscopia respiraré por una mascarilla un nube de **aerosoles** de salbutamol durante alrededor de 10 minutos, y que durante la broncoscopia los médicos harán un **enjuague** de uno de mis pulmones metiendo y sacando agua estéril ligeramente salada, para después estudiar el líquido y saber si los pulmones produjeron la “sustancia P” o la “acetilcolina”. Las demás cosas que se me hagan durante la broncoscopia serán exclusivamente porque las necesito para el diagnóstico de mi enfermedad. Me explicaron que las únicas **molestias** que pudiera tener por los aerosoles es que si soy muy sensible al salbutamol tenga durante algunas horas ligero nerviosismo, palpitaciones o ligero temblor en los dedos, y con respecto al enjuague de los bronquios me explicaron que éste es un procedimiento que casi siempre se hace en las broncoscopias y que muy rara vez da problemas de que disminuya el oxígeno de la sangre.

CARTA DE CONSENTIMIENTO para participar en el proyecto de investigación titulado
"EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DEL SALBUTAMOL PARA INDUCIR LIBERACIÓN DE SUSTANCIA P Y ACETILCOLINA EN VÍAS AÉREAS DE HUMANO"

Entiendo que mi participación en la investigación **no me costará** nada, ni afectará lo que me está cobrando el INER por mi atención médica.

Se me ha explicado que para que el estudio tenga mayor calidad científica, durante la aplicación de los aerosoles algunos pacientes recibiremos salbutamol, algunos otros una variante del salbutamol, y otros más tan solo agua ligeramente salada. Por lo tanto, los pacientes que entramos al estudio seremos seleccionados mediante un **sorteo** para estar en uno de tres grupos.

De cualquier forma, se me ha asegurado que si decido no participar en este estudio de investigación nadie se va a enojar conmigo o se va a desquitar de alguna forma, y que mi negativa para participar **no afectará** para nada el estudio de broncoscopia que se me va a hacer o la calidad de la atención médica que recibo por parte de los médicos del Instituto. De igual forma, se me ha dicho que si decido entrar al estudio pero luego me arrepiento, puedo retirarme de la investigación (aunque ya haya firmado esta carta) en el momento en que yo lo desee.

Además, se me ha garantizado que toda la información que se produzca con mi participación será totalmente **confidencial**, sin que mi nombre o datos personales se den a conocer en las comunicaciones que deriven de esta investigación.

Finalmente, entiendo que yo en lo personal no obtendré ningún **beneficio o pago** de esta investigación, pero que gracias a este estudio de investigación se podría conocer mejor qué está pasando en los enfermos de asma.

Acepto participar en la investigación

Investigador

Firma del paciente

Dr. Dante Escobedo
Jefe del Servicio de Broncoscopia
Tel: 56664539 ext 5251

Testigo 1

Firma _____

Nombre _____

Relación con el paciente _____

Testigo 2

Firma _____

Nombre _____

Relación con el paciente _____

HOIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Protocolo de investigación
Evaluación de la capacidad del salbutamol para inducir liberación de sustancia P y acetilcolina en vías aéreas de humano

Núm. de
Paciente:

Fecha de la broncoscopia: Día _____ Mes: _____ Año: _____

Nombre del paciente: _____

Masc. Fem. Edad: _____ Expediente _____

Diagnóstico motivo de la broncoscopia:

Sospecha de cáncer (tipo, sitio, etc.): _____

Otro diagnóstico: _____

Antecedentes y diagnósticos adicionales:

Tabaquismo. Paquetes-año: _____

Fumó el último cigarrillo hace _____

Asma } { Tratamiento: _____

Bronquitis crónica } { _____

Enfisema } { _____

Infección de vías aéreas: _____

Neumonía: _____

Otros antecedentes o diagnósticos: _____