

11261 3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DETERMINACION DE LA HIPERREACTIVIDAD DE LAS VIAS AEREAS POR EXPOSICION A OZONO EN EL COBAYO: DIFERENCIAS EN LAS RESPUESTAS POR EL USO DE AGENTES BRONCOCONSTRICTORES NEBULIZADOS Y ENDOVENOSOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(F A R M A C O L O G I A)
P R E S E N T A:
M.V.Z. MARIA EUGENIA BETINA SOMMER CERVANTES

TUTOR:

DR. LUIS MANUEL MONTAÑO RAMIREZ

COASESORES:

DR. MARIO HUMBERTO VARGAS BECERRA

DRA. TERESA FORTOUL VAN DER GOES

112613

MEXICO, D.F.

AGOSTO, 2001



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.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores:

Dr. Luis Manuel Montaña R

Por su contagiosa y nunca satisfecha curiosidad científica y por su infalible apoyo.

Dr. Mario Humberto Vargas B.

Por su inagotable deseo de enseñar y aprender y por compartirlo siempre.

Dra. Teresa Fortoul van der Goes

Por su interés en la superación académica y personal de todos sus alumnos.

Agradezco al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) por permitirme el uso de su material (biológico y farmacológico) para la realización de los experimentos de este trabajo.

A la Dra. Norma Bobadilla por la amable y detallada corrección a la versión final de esta tesis.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social, en particular a la Dra. María G. Campos, por su apoyo durante mis estudios de Maestría.

A mis padres, siempre presentes.

Por su cariño y paciencia:

A Irene y Andrés

A Gerhard, Esther, Anna y Gerd.

A Hermann, Hermann Jr., Frieda y Ulrich.

A Lala, Luis, Camila y Santiago, Paz y Jeff, Vero, Juan, Faina, Fabián y Mauri, Carmina, Paty y Victoria, Márgara, Camila y Sergio, Andrea, Natasha, Dandara y Náyades.

A mis amigos del Laboratorio: Blanca, Patty, Jaime, José Luis y y a quienes tienen la fortuna de compartir sus vidas. Y, por supuesto, a Vero Carvajal.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	1
CONTENIDO.....	3
ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN.....	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	8
HIPOTESIS.....	8
OBJETIVOS GENERALES.....	9
OBJETIVOS PARTICULARES.....	9
MÉTODOS.....	10
<i>Animales y diseño xperimental</i>	10
<i>Pletismografía de animales respirando espontáneamente</i>	10
<i>Pletismografía de animales mecánicamente ventilados</i>	11
<i>Reto Bronquial</i>	12
<i>Exposición a Ozono</i>	12
<i>Método de Sensibilización a Ovoalbúmina</i>	12
<i>Determinación de la Actividad de la Acetilcolinesterasa</i>	13
<i>Análisis estadístico</i>	13
RESULTADOS	15
<i>Animales respirando espontáneamente/nebulizados (en libre movimiento)</i>	17
<i>Animales respirando espontáneamente/intravenosos</i>	17
<i>Animales respirando espontáneamente/nebulizados (restringidos)</i>	17
<i>Animales respirando espontáneamente/intravenosos</i>	17
<i>Animales mecánicamente ventilados/nebulizados</i>	17
<i>Animales mecánicamente ventilados intravenosos</i>	18
<i>Actividad de la acetilcolinesterasa</i>	18
DISCUSION.....	19
CONCLUSIONES.....	21
REFERENCIAS.....	22
FIGURAS.....	19

ABREVIATURAS

O ₃	Ozono
His	Histamina
Ach	Acetilcolina
Penh	Enhanced pause
ppm	Partes por millón
g	Gramos
i v	Intravenosa
ml	Militros
s	Segundos
min	Minutos
SSF	Suero salino fisiológico
OA	Ovoalbúmina
R _L	Resistencia pulmonar
ΔP	Diferencia de presión
$\Delta V'$	Diferencia de flujo
DP ₂₀₀	Dosis provocativa 200%
nm	Nanometros
i p	Intraperitoneal
iRL	Indice de resistencia pulmonar

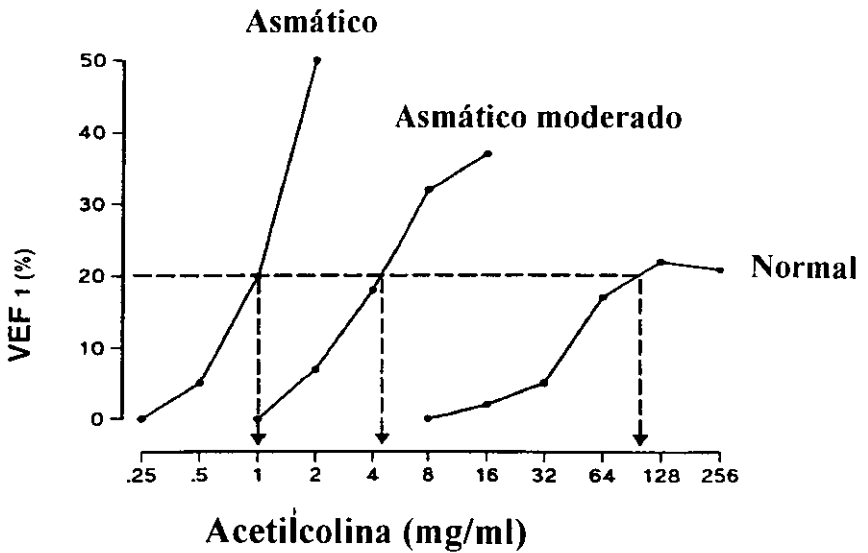
RESUMEN

La hiperreactividad de las vías aéreas en animales de laboratorio se demuestra generalmente a través de curvas dosis-respuesta a un agente broncoconstrictor inhalado o intravenoso. Sin embargo, la semejanza entre estas dos vías de entrada no ha sido bien estudiada. Por eso, examinamos las respuestas de las vías aéreas a acetilcolina e histamina 16 a 18 h después de la exposición a O₃ (3 ppm, 1 h) u a aire por medio de dos métodos pletismográficos (**respirando espontáneamente y ventilados mecánicamente**) y usando dos vías de administración: **inhalada e intravenosa**. Encontramos que el O₃ causa hiperreactividad de las vías aéreas a agonistas intravenosos, pero no a los nebulizados, independientemente del método pletismográfico usado. La eficacia de la vía inhalatoria para definir la hiperreactividad de las vías aéreas en animales respirando espontáneamente se corroboró con acetilcolina inhalada después de un reto antigénico o prolongando la exposición a O₃ a 3 h. La actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) no se modificó por la exposición a O₃ ni en homogenados de pulmón, ni en muestras de sangre. Así, concluimos que los agentes inhalados son menos eficaces para la determinación de hiperreactividad por O₃ que los intravenosos, al menos para una exposición de una hora a 3 ppm, y esta diferencia parece no estar relacionada con la inhibición de la actividad de AChE por la exposición a O₃.

I. INTRODUCCIÓN

El asma es un padecimiento de etiología variada y tal vez, multifactorial. Se caracteriza por inflamación de las vías aéreas, disminución reversible del flujo aéreo, hiperreactividad y aumento en la variabilidad día-noche del flujo expiratorio (NHLBI, 1995). El enfermo asmático presenta hiperreactividad de las vías aéreas que correlaciona con la severidad del padecimiento (O'Byrne, 1992) y que se define como un aumento en la facilidad con que el músculo liso se contrae en respuesta a estímulos farmacológicos o físicos (Hargreave y Col., 1981). Puede deberse a un daño epitelial de las vías aéreas (Barnes y Col., 1985), a la liberación de mediadores químicos de la célula cebada (Shields, R.L. y Gold, W.M., 1987), a la generación de un proceso inflamatorio (Fabbri y Col., 1984), a la estimulación del reflejo vagal (Campos y Col., 1992), a la estimulación del sistema contráctil no adrenérgico no colinérgico (NANC) (Lundberg y Col., 1983) y al aumento del calcio citosólico (Montaño y col., 1993). La hiperreactividad se evalúa realizando en el paciente un reto bronquial, es decir, administrándole dosis crecientes de agentes broncoconstrictores nebulizados y registrando el volumen espiratorio forzado al primer segundo (VEF_1). Las respuestas espiratorias a cada dosis del reto bronquial se expresan como porcentaje de disminución en el VEF_1 y si éste es superior a un 20% se considerará que ese individuo padece la enfermedad (Fig A).

Fig A. Curvas dosis-respuesta a acetilcolina nebulizada en sujetos normales y en asmáticos con hiperreactividad moderada y severa. Las respuestas se miden como caída porcentual en el VEF_1 desde su valor basal. El VEF_1 del sujeto normal y del asmático moderado alcanza una meseta, pero no el del asmático.



La hiperreactividad de las vías aéreas puede reproducirse en animales de laboratorio por diferentes métodos. Uno consiste en la exposición de diferentes especies animales, inclusive el cobayo, (Campos y Col 1992, Seltzer y Col 1986; Montañó y Col 1993) a una concentración aguda (3 ppm) de ozono (O_3). Otro método considerado como el modelo tradicional es la sensibilización de los animales a un alérgeno como la ovoalbumina (Campos y Church, 1992, Vargas y Col., 1994, Pretolani y Col., 1994). En los cobayos sensibilizados nebulizados con este antígeno se desarrollan síntomas respiratorios específicos de una sensibilización anafiláctica (tos, broncoconstricción). Al cabo de 1 a 3 h, estos síntomas desaparecerán y se desarrollará hiperreactividad a His o Ach. (Kallós O y Kallos L, 1984). Estos síntomas se deben a que durante la nebulización con el antígeno las células inflamatorias liberan diversas aminas bioactivas (proteína catiónica y proteína básica mayor del eosinófilo), mediadores inflamatorios lipídicos (factor agregador de plaquetas PAF, leucotriénos LTC₄, LTD₄, LTE₄, prostaglandina D₂), y citocinas (TNF, IL-1, IL-4, IL-5, y la IL-6) (Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, 1995).

En este estudio utilizamos el primer método con el fin de evaluar este modelo como herramienta de estudio de la hiperreactividad, ya que es más sencillo y requiere menor tiempo que la sensibilización a ovoalbumina. Tanto en la exposición a O_3 , como en la sensibilización, los animales desarrollan hiperreactividad, es decir, se vuelven más sensibles a la histamina (His) o a la acetilcolina (Ach). En modelos experimentales, estos agentes se administran por vía inhalada (Nishikawa y Col. 1990, Kudo y Col., 1996) o intravenosa (Vargas y Col., 1998, Yeadon y Col., 1992), pero las diferencias entre ellas han sido poco investigadas por lo que decidimos estudiar si ambas vías son confiables y/o equiparables (Roum J.H. y Murlas, C., 1984). En la clínica, estos agentes se administran por vía inhalada, ya que es útil para obtener un diagnóstico certero evitando la necesidad de usar un método invasivo.

En el laboratorio, la hiperreactividad se evalúa por medio de la pletismografía de animales en libre movimiento (técnica no invasiva; Buxco, Inc., N.Y., USA) ya que, a través de un paquete computacional calcula un índice de broncoconstricción (Penh, "enhanced pause" o pausa incrementa) que toma en cuenta varios parámetros respiratorios (tiempo espiratorio, tiempo de relajación, pico del flujo espiratorio y pico del flujo inspiratorio). Este índice correlaciona con la resistencia de las vías aéreas (Eum y Col., 1995) y se reporta como un índice de resistencia pulmonar (iR_L).

Para evaluar los resultados de la administración de agentes broncoconstrictores por vía endovenosa se usa generalmente pletismografía para animales anestesiados y se registra la resistencia pulmonar total (R_L). Este método también tiene ventajas como conocer con certeza las dosis administradas y evitar la pérdida (dilución) del fármaco como ocurre cuando el agente es administrado por vía inhalada. Estas ventajas sobre la vía inhalada hacen a la vía endovenosa más exacta para la evaluación de la hiperreactividad, por lo que pensamos que la vía de administración del agente broncoconstrictor modificará de manera distinta el iR_L y el R_L . Este argumento se sustenta en el trabajo de Corddry y Col., quienes demostraron en perros que las mediciones de la resistencia pulmonar total y de la resistencia de las vías aéreas periféricas presentaban el mismo patrón de respuesta a la histamina intravenosa, mientras que con histamina nebulizada obtenían resultados diferentes.

La determinación de hiperreactividad usando agonistas nebulizados 16 a 18 h después de la exposición parece depender de la duración de ésta (Murlas, C y Roum, J.H., 1985), por lo que será interesante comparar los resultados de exposiciones cortas con los de exposiciones largas. En este trabajo encontramos que a la exposición a 3 ppm de O_3 por una hora los agentes inhalados no detectan la hiperreactividad como los intravenosos y se describen algunos posibles mecanismos para explicar esa diferencia.

Otras líneas de investigación señalan que la exposición a O_3 inactiva algunas enzimas, entre ellas la acetilcolinesterasa (Buckley, RD y Col , 1975, Gordon, T y Col , 1981); en ambos casos la medición de la actividad de esta enzima fue realizada corto tiempo después de la exposición al gas. Nuestro objetivo en este sentido sería caracterizar si la acetilcolinesterasa se inactiva 16-18 h después de la exposición a O_3 .

En este trabajo encontramos que la manifestación de la hiperreactividad por O_3 varía al administrar los agentes broncoconstrictores por vía inhalada o endovenosa, los agentes inhalados son menos efectivos que los endovenosos para detectar este fenómeno. Por otro lado, la actividad de la acetilcolinesterasa no se altera 16-18 h después de la exposición a O_3 .

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La hiperreactividad de las vías aéreas generada por la exposición a O_3 puede determinarse por la administración endovenosa o inhalada de agonistas broncoconstrictores. Sin embargo, la manifestación de este fenómeno parece estar influida por la vía de administración del agente broncoconstrictor, por la duración de la exposición a O_3 y/o por la inactivación de la acetilcolinesterasa.

HIPÓTESIS

- La hiperreactividad inducida por la exposición a O_3 puede estar mediada por la inactivación de la acetilcolinesterasa y será influida por la vía de administración del agente broncoconstrictor y la duración de la exposición.

III. OBJETIVOS OBJETIVOS GENERALES

Determinar si la hiperreactividad de las vías aéreas en respuesta a la exposición aguda a O_3 , se manifiesta por agonistas broncoconstrictores administrados por vía inhalatoria o por vía intravenosa.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Investigar si la hiperreactividad de las vías aéreas del cobayo generada por la exposición aguda a O_3 (3 ppm/1 h) se relaciona con la vía de administración del agente broncoconstrictor.
2. Definir, usando agentes nebulizados, si la hiperreactividad de las vías aéreas del cobayo generada por O_3 se relaciona directamente con la duración de la exposición (3 ppm por 1 ó por 3 h).
3. Caracterizar si la actividad de la acetilcolinesterasa pulmonar o sanguínea se inhibe por la exposición a O_3 .

IV. MÉTODOS

Animales y diseño experimental

Se emplearon cobayos Hartley, machos, entre 400 y 500 g de peso, criados en condiciones convencionales (aire acondicionado filtrado, $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 50-70% de humedad, cama esterilizada, alimentados con pellets Purina, suplementados con alfalfa fresca desinfectada y agua esterilizada *ad libitum*). La hiperreactividad de las vías aéreas a acetilcolina (ACh) e histamina (His) se evaluó construyendo curvas dosis-respuesta para cada agonista. Usamos dos métodos para medir la respuesta: pletismografía en animales respirando espontáneamente y platismografía de animales mecánicamente ventilados. En cada método, los retos bronquiales se realizaron administrando las drogas por la vía nebulizada o intravenosa, para lo cual se estudiaron 4 grupos de animales:

- Libre movimiento respirando espontáneamente/nebulizados
- Libre movimiento respirando espontáneamente/ intravenosos
- Respirando mecánicamente/nebulizados
- Respirando mecánicamente/intravenosos

Con respecto al grupo **respirando espontáneamente/nebulizados**, la naturaleza no-invasiva de esta técnica nos permitió realizar dos curvas dosis-respuesta en el mismo cobayo. En estos animales la primera curva se realizó aproximadamente 24 h antes del O_3 o del aire (grupos control), y la segunda se realizó 16 a 18 h después de la exposición. En los grupos restantes, se realizó únicamente una curva dosis-respuesta después de la exposición a aire u O_3 en cada animal. Además, un grupo de animales sensibilizados, respirado espontáneamente, se sometió a una curva dosis-respuesta a ACh inhalada 24 h antes y 3 h después del reto antigénico. Finalmente, grupos adicionales de cobayos con o sin exposición a O_3 se usaron para evaluar la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) en homogenados de pulmón y en sangre.

Pletismografía de animales respirando espontáneamente

Cada cobayo se colocó en una caja pletismográfica (Buxco Electronics Inc., Troy, NY, USA) diseñada para animales en libre movimiento. Esta cámara recibe un flujo continuo de aire (10 ml/s) que no modifica las señales respiratorias. Esta metodología ha sido descrita detalladamente en varios trabajos (Chand y Col., 1993, Chávez y Col., 1996, Hamelmann y Col., 1997). Brevemente, la presión dentro de la cámara se midió por medio de un transductor de presión diferencial (SCXL004DN, Sen Sym, Milpitas, CA, USA) conectado a un preamplificador y monitoreando continuamente por medio de un paquete computacional (Buxco Biosystem XA v1.1). Los cambios en la presión de la cámara representan la diferencia entre la expansión/contracción torácica y el volumen residual (aire extraído/añadido a la cámara durante la inspiración/espирación). La presión de la caja se diferencia para obtener una señal de pseudo-flujo, que luego se analiza por un paquete computacional para obtener un índice llamado "pausa incrementada" o Penh (enhanced pause). El valor de Penh se obtiene para cada respiración por medio de la fórmula:

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

Dónde T_e = tiempo espiratorio, R_t = tiempo de relajación, PEP = pico de presión espiratoria y PIP = pico de presión inspiratoria. Los valores de *Penh* usados en nuestro estudio se obtuvieron promediando valores registrados cada 15 s. El paquete computacional se ajustó para que aceptara únicamente respiraciones con un volumen corriente de 1 ml o más, con un tiempo inspiratorio de 0.15 s, un tiempo máximo inspiratorio de 3 s y una diferencia máxima entre los volúmenes inspiratorio y expiratorio de 10%. Un estudio reciente en ratones (Hamelmann y Col., 1997) demostró que el *Penh* tenía una correlación positiva con la medición de resistencia pulmonar total (Rt), que refleja la resistencia de las vías aéreas (Raw) y/o la resistencia del parénquima pulmonar (Rti). Por eso, en este estudio el *Penh* se consideró como un índice de resistencia pulmonar total (iRL), como se ha propuesto previamente por otros y nosotros (Allen y Col., 1995, Chávez y Col., 1996, Hamelmann y Col., 1997, Sommer y Col., 1998). Más aun, en este estudio usamos la pletismografía para medir las respuestas agudas a dosis crecientes de ACh o His. Estas respuestas se caracterizaron por un incremento transitorio de los valores de iRL, regresando espontáneamente a los valores basales después de aproximadamente 10 min, lo que implica una reversibilidad del incremento en la resistencia pulmonar, señalando que la obstrucción de las vías aéreas es el componente principal de ese incremento. Esta consideración está de acuerdo con el descubrimiento reciente de que la sensibilidad de las vías aéreas a histamina (evaluado como PC100) obtenido en cobayos por medio de mediciones de *Penh* es muy similar al obtenido con mediciones de sRaw (resistencia específica de las vías aéreas) (Chong y Col., 1998). Por ello, es muy probable que en nuestro estudio el iRL refleje principalmente la resistencia de las vías aéreas.

En ésta cámara pletismográfica se usaron dos rutas de administración: inhalatoria (**respirando espontáneamente/nebulizados**) e intravenosa (**respirando espontáneamente/intravenosos**). En este último caso, la ACh (0.18 a 56 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) o la His (0.18 a 56 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v) se administraron como bolo único por medio de un cateter introducido en la vena yugular izquierda, y cada cobayo se colocó en una jaula metálica que restringía sus movimientos, limitando así la posibilidad de que pudiera arrancarse el cateter. Debido a esta última maniobra (restricción de movimientos y procedimientos invasivos), la comparación con los animales en libre movimiento tal vez no sea apropiada. Por eso, otro grupo de cobayos **respirando espontáneamente/ nebulizados** fue sometido a las mismas operaciones que los animales del grupo **respirando espontáneamente/ intravenosos**.

Pletismografía para animales mecánicamente ventilados.

La Rt se midió a través del método isovolumétrico en una caja pletismografica (Buxco Electronics Inc.) cerrada. Los cobayos se anestesiaron con pentobarbital sódico (35 mg/kg i.p.), y la profundidad de la anestesia se mantuvo con la administración de pentobarbital (aproximadamente 9 mg/kg i.v.) cada hora. Cada animal recibió bromuro de pancuronio (0.06 mg/kg, i.v.) para evitar los movimientos respiratorios espontáneos. Después de canular la tráquea, cada animal se ventiló mecánicamente (Harvard Apparatus Ltd., modelo 50-1700, Inglaterra) con un volumen corriente de 10 ml/kg y 48 respiraciones/min. La vena yugular derecha y la carótida izquierda se canularon para la administración de medicamentos y para el registro de la presión arterial por medio de un poligrafo Beckmann R-612. Una cánula con agua se colocó en el tercio medio del esófago para medir la presión intraesofágica como un sustituto de la presión intrapleurar. Las presiones obtenidas de las cánulas traqueales y esofágica se registraron por medio de un transductor de presión diferencial (SCXL004DN, Sen Sym). La presión dentro de la cámara pletismográfica también se registró 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 RI por medio de la fórmula $RI = \Delta P / \Delta V$ mediante el software previamente mencionado

Reto bronquial.

La hiperreactividad de las vías aéreas se evaluó por medio de retos bronquiales usando agonistas inhalados o intravenosos en cobayos respirando espontánea o mecánicamente

El reto bronquial nebulizado en animales respirando espontáneamente se hizo en la cámara pletismográfica. Por ello, después de una nebulización basal (0.9% NaCl por 2 min) se nebulizaron durante 2 minutos dosis crecientes de Ach (0.056 a 3.2 mg/ml) o His (0.018 a 3.2 mg/ml). El intervalo entre dosis fue de aproximadamente 5 a 12 minutos, tiempo suficiente para recuperar el valor basal de iRL. Después de cada dosis, se registró el iRL durante 5 min y se calculó el valor promedio. El procedimiento terminó cuando, después de una dosis, se dobló tres veces el valor basal de iRL (obtenido después del suero salino fisiológico) Las nebulizaciones se hicieron usando un nebulizador Bennett US-1 (flujo 2 ml/min), con una mezcla de tamaño de partícula de 44% <4 μ m, 38% 4-10 μ m, y 18% > 10 μ m (Multi-Stage liquid impinger, 20 L/min, Bukard Manufacturing Co., Ltd., England). En el caso de los cobayos ventilados mecánicamente, el agente nebulizado se distribuyó llevándolo a la entrada del ventilador por medio de un reservorio plástico, y en estos últimos animales la exposición a los agonistas nebulizados duró únicamente 1 min.

Con respecto al reto bronquial intravenoso, después de una respuesta basal con suero salino fisiológico (0.1 ml de NaCl 0.9%, i.v.) se fabricó una curva dosis-respuesta para Ach (0.18 a 56 μ g/kg, i.v.) o His (0.18 a 56 μ g/kg, i.v). Después de cada dosis, se obtuvo la respuesta máxima (iRL en animales **respirando espontáneamente** y RL para los **ventilados mecánicamente**) como promedio de 10 respiraciones durante 3 minutos. Como se describió en el párrafo anterior, la curva dosis-respuesta se terminó cuando se obtuvo un valor de 3 veces el valor basal de iRL o de RL.

Exposición a Ozono

Otro grupo de cobayos Hartley fue instalado, inmediatamente después de ser destetados, en un ambiente con una concentración mínima de O₃ (<0.015 ppm) que se logra empleando filtros de aire (Heaven, AllerMed Corp., USA). Entre 16 y 18 h antes de la caracterización de la hiperreactividad, los cobayos experimentales fueron expuestos a 3 ppm de O₃ durante 1 ó 3 h. El O₃ se produjo pasando un flujo continuo de aire (3 L/min) a través de un ozonizador (Puraqua-V, purificadores Eléctricos por Ozono, México, D.F.) en el que un arco eléctrico convierte el aire en O₃. Se verificó continuamente la concentración del gas empleando un analizador de O₃ por luz ultravioleta (modelo 1008 PC, Dasibi Environmental, CA, USA) conectado a la cámara de exposición (48 X 73 X 32 cm) por medio de tubería de Tygon (diámetro interno 3/16", diámetro externo 1/4" Cole-Parmer Instrument Company, Illinois, USA)

Método de Sensibilización a Ovoalbúmina

Un grupo de 5 cobayos fue sensibilizado a ovoalbúmina, según la metodología reportada por nosotros (Sommer y Col., 2001). Al alcanzar 300 g de peso, los cobayos de este grupo recibieron intraperitonealmente 0.5 ml de suero salino fisiológico (SSF) donde previamente se habían disuelto 40 μ g de ovoalbúmina (OA) y 1 mg de Al(OH)₃. Ocho días después, estos

respuesta consecutivamente. La significancia estadística se estableció a dos colas, $p < 0.05$. Los datos en el texto e ilustraciones se expresan como promedio \pm error estándar de la media.

IV. RESULTADOS

Valores basales de la función pulmonar y su relación con la hiperreactividad de las vías aéreas.

En la mayoría de los grupos estudiados, la medición basal del iRt. o el Rl. no se modificó antes o después de la exposición a O₃ o del reto antigénico. Sin embargo, en los grupos de cobayos expuestos a 3 ppm de O₃ durante 1 h, nebulizados con histamina y aquellos que recibieron Ach endovenosa (respirando espontáneamente) así como los expuestos durante 3 h, si se modificaron significativamente los valores basales de PENH (Tabla 1).

Tabla 1. Valores basales de iRL y RL de los grupo estudiados.

	Reto a Acetilcolina		Reto a Histamina	
	Antes de la Exposición	Después de la exposición	Antes de la Exposición	Después de la exposición
Respirando espontáneamente/nebulizados (iRL)				
Aire	0.210 ± 0.013 (n=6)	0.213 ± 0.204 (n=6)	0.333 ± 0.047 (n=7)	0.367 ± 0.063 (n=7)
Ozono 3 ppm, 1 h	0.221 ± 0.020 (n=6)	0.204 ± 0.020 (n=6)	0.251 ± 0.019 (n=6)	0.287 ± 0.022 (n=6)**
Ozono 3 ppm, 3 h	0.222 ± 0.011 (n=11)	0.263 ± 0.019 (n=11)*		
Antígeno	0.245 ± 0.013 (n=5)	0.239 ± 0.018 (n=5)		
Respirando espontáneamente/nebulizados (movimientos restringidos) (iRL)				
Aire		0.298 ± 0.019 (n=6)		0.393 ± 0.020 (n=4)
Ozono 3 ppm, 1 h		0.324 ± 0.045 (n=4)		0.487 ± 0.039 (n=4)
Respirando espontáneamente/intravenosos (RL)				
Aire		0.453 ± 0.028 (n=7)		0.454 ± 0.022 (n=7)
Ozono 3 ppm, 1 h		0.324 ± 0.026 (n=6) †		0.381 ± 0.048 (n=6)
Ventilados mecánicamente/nebulizados (RL, cmH₂O·ml⁻¹·s)				
Aire		0.805 ± 0.073 (n=7)		0.845 ± 0.061 (n=7)
Ozono 3 ppm, 1 h		0.865 ± 0.024 (n=6)		1.030 ± 0.140 (n=7)
Ventilados mecánicamente/intravenosos (RL, cmH₂O·ml⁻¹·s)				
Aire		0.887 ± 0.055 (n=6)		1.056 ± 0.163 (n=5)
Ozono 3 ppm, 1 h		0.936 ± 0.028 (n=6)		1.039 ± 0.120 (n=6)

iRL= índice de resistencia pulmonar total (Penh) RL= resistencia pulmonar total. * p<0.05 y ** p<0.01 comparado con el grupo "antes de la exposición" † p<0.01 comparado con el grupo "aire". Los valores corresponden al promedio ± error estándar de la media

Animales respirando espontáneamente/nebulizados (en libre movimiento)

Cuando se usó la vía inhalatoria para evaluar pletismográficamente las respuestas de las vías aéreas en animales en libre movimiento, el grupo control expuesto a aire mostró respuestas menores a la segunda curva de Ach, es decir, se desarrolló una clara hiporreactividad (DP_{200} 0.41 ± 0.12 para la primera curva y 0.86 ± 0.24 mg/ml para la segunda curva, $n=6$, $p<0.05$, **Fig. 1A**). La exposición a O_3 durante una hora no modificó la respuesta de las vías aéreas a Ach (DP_{200} 0.50 ± 0.07 antes vs. 0.96 ± 0.24 mg/ml después del O_3 , $n=6$, **Fig. 1B**). Sin embargo, cuando la exposición a O_3 fue más prolongada (3 h), se observó hiperreactividad a Ach (DP_{200} 0.40 ± 0.06 antes vs. 0.27 ± 0.09 mg/ml después del O_3 , $n=11$, $p<0.05$, **Fig. 1C**).

Animales respirando espontáneamente/intravenosos

La DP_{200} a His aerolizada no fue diferente antes y después de la exposición a aire (DP_{200} 0.048 ± 0.01 vs. 0.052 ± 0.01 mg/ml, respectivamente, $n=7$, **Fig. 2**), o antes y después de la exposición a O_3 por una h (0.06 ± 0.02 vs 0.05 ± 0.01 mg/ml, respectivamente, $n=6$). Finalmente, se desarrolló hiperreactividad en animales sensibilizados a ovoalbúmina después de un reto a esa proteína, ya que la DP_{200} de Ach nebulizada fue estadísticamente menor después de ese reto (0.24 ± 0.10 vs. 0.67 ± 0.12 mg/ml, $n=5$, $p<0.0005$, **Fig. 1D**).

Animales respirando espontáneamente/nebulizados (restringidos)

La exposición a O_3 no modificó la reactividad a Ach ni a His cuando se comparó con los grupos respectivos expuestos a aire. Así, los valores de DP_{200} que se observaron después de las exposiciones a aire u O_3 , ya sea para la curva de Ach (0.68 ± 0.18 , $n=6$, vs. 0.56 ± 0.10 mg/ml, $n=4$, respectivamente, $p=0.65$, **Fig. 3A**) y para la curva de His (0.07 ± 0.01 , $n=4$, vs. 0.07 ± 0.01 mg/ml, $n=4$, respectivamente, $p=0.94$, **Fig. 4A**).

Animales respirando espontáneamente/intravenosos

Contrastando con los animales **respirando espontáneamente/nebulizados (restringidos)**, cuando se administró Ach o His por la vía intravenosa, se encontró hiperreactividad por O_3 a ambos agonistas con la exposición de menor duración (1 h) (**Fig. 3B y 4B**). Así, los valores DP_{200} de Ach o His en cobayos sometidos a O_3 (7.36 ± 2.74 , $n=6$, y 1.41 ± 0.51 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $n=6$, respectivamente) fueron significativamente más bajos que en los animales que recibían únicamente aire (25.14 ± 4.28 , $n=7$, $p<0.01$, y 9.38 ± 1.78 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $n=7$, $p<0.005$, respectivamente).

Animales mecánicamente ventilados/nebulizados

La exposición a O_3 no modificó la reactividad de las vías aéreas a los agentes nebulizados administrados a animales canulados y ventilados mecánicamente después de la exposición a aire u O_3 , ya que los valores de DP_{200} (0.84 ± 0.19 mg/ml, $n=6$) no fueron estadísticamente diferentes de los observados en el grupo de animales expuestos a aire (1.61 ± 0.30 mg/ml, $n=7$, $p=0.062$, **Fig. 5A**). De manera similar, los valores de DP_{200} entre los grupos

de animales expuestos a O₃ y a aire fueron similares (0.15 ± 0.06 , n=7, y 0.19 ± 0.07 mg/ml, n=7, respectivamente, p=0.70, Fig. 6A)

Animales mecánicamente ventilados /intravenosos

Usando animales anestesiados, la exposición a 3 ppm de O₃ durante 1 h generó hiperreactividad de las vías aéreas a ACh e His. Así, después del O₃ la DP₂₀₀ a ACh (10.26 ± 2.43 µg/kg, n=6, Fig. 5B) fue significativamente menor al compararse con el grupo de aire (50.38 ± 16.14 µg/kg, n=6, p<0.05). De manera similar, la DP₂₀₀ para la His fue significativamente menor para el grupo de animales expuestos a O₃ al compararse con el expuesto a aire (8.85 ± 1.94 , n=6, vs 23.39 ± 5.50 µg/kg, n=5, respectivamente, p<0.02, Fig. 6B).

Actividad de la Acetilcolinesterasa.

La exposición a O₃ no causó cambios estadísticos en la actividad de la AChE ni en los homogenizados de pulmón (1.022 ± 0.345 , n=6, vs. control 0.301 ± 0.069 IU, n=5, p=0.09) ni en muestras de sangre total (1.926 ± 0.470 , n=6, vs. control 1.320 ± 0.232 IU, n=4, p=0.35, Fig. 7)

V. DISCUSION

La hiperreactividad de las vías aéreas generada por la exposición a O_3 es un fenómeno bien caracterizado y muy bien estudiado en animales de laboratorio desde hace muchos años. Sin embargo, varios factores pueden influir sobre los efectos del O_3 : la concentración y duración de la exposición, el tiempo transcurrido entre la exposición y la curva al agonista, y la naturaleza del agente broncoconstrictor usado para determinar la hiperreactividad. Otro factor que ha sido poco estudiado es la vía de administración utilizada para administrar el agonista broncoconstrictor (Roum JH y Murlas C., 1984). En este estudio encontramos que, al menos bajo nuestras condiciones experimentales (3 ppm de O_3 durante 1 h), las pruebas realizadas con agentes nebulizados no permitieron que la hiperreactividad desarrollada por la exposición a O_3 se manifestase, mientras que los agentes administrados por la vía intravenosa siempre la evidenciaron. Estas contrastantes respuestas fueron independientes del método pletismográfico usado.

Nuestros resultados difieren de algunos trabajos publicados previamente y realizados con cobayos en los que la hiperreactividad de las vías aéreas a los agonistas inhalados se encontró poco después de la exposición a 3 ppm de O_3 durante 1 h o menos (Fedan y Col., 2000, Kudo y Col., 1996, Nishikawa y Col., 1990, Yeadon y Col., 1992). Sin embargo, la mayoría de estos estudios midió la hiperreactividad de las vías aéreas cuando existía un cambio significativo en el calibre basal de las vías aéreas (un incremento de entre 60% y 120%), y por ello esa hiperreactividad podría explicarse solamente por razones mecánicas. En ese sentido, hemos encontrado que esta broncoconstricción temporal puede durar hasta 3 h (Sommer y Col., 1998), y por ello, la hiperreactividad inducida por O_3 debida a procesos no-mecánicos sólo debería medirse cuando ese proceso obstructivo hubiese terminado. Aunque tuvimos cuidado de evitar cambios significativos por la exposición a O_3 en los valores basales del iRL y de la RL, encontramos un incremento estadísticamente significativo en dos grupos. En ambos casos, el incremento fue menor al 19% y sólo se observó hiperreactividad asociada en uno de ellos. Más aún, no hubo correlación entre los valores basales de iRL o de RL y su hiperreactividad correspondiente ni en grupos individuales ni en animales en libre movimiento respirando espontáneamente (datos no mostrados). Por ello, es probable que los cambios en la reactividad de las vías aéreas generados por el O_3 obtenidos en nuestro estudio no se deban a modificaciones en los valores basales.

Contrastando con nuestros resultados para la exposición a 3 ppm de O_3 durante 1 h, observamos que una exposición más prolongada (3 h) sí indujo hiperreactividad de las vías aéreas a los agonistas inhalados. En este sentido, algunos investigadores han expuesto cobayos a la misma concentración de O_3 hasta por 2 h, y encontraron hiperreactividad de las vías aéreas a las 5 h (Nishikawa y Col., 1990), o a las 4, 14 y 24 h (Roum JH y Murlas C., 1984) después de la exposición. Por eso, al menos a 3 ppm, la duración de la exposición a O_3 parece influir el desarrollo de hiperreactividad de las vías aéreas a los agonistas inhalados.

En general, estos resultados sugieren que la vía de administración fue el factor principal en la caracterización de la hiperreactividad generada por O_3 . Esto concuerda con los datos publicados previamente por Roum y Murlas (1984), que concluyen que la técnica inhalatoria no es apropiada para demostrar la hiperreactividad a agentes colinérgicos inducida por O_3 debido a su gran variabilidad, mientras que el método intravenoso es más consistente. Los diferentes resultados observados cuando los agentes broncoconstrictores se administraron por la vía aerosolizada o intravenosa podrían tener varias explicaciones.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

En primer lugar, es posible que la ACh o la His administradas por inhalación no hayan alcanzado el área donde el O_3 está causando las mayores disfunciones. En contraste, la vía intravenosa debe llegar homogéneamente a todos los lados, detectando así las modificaciones funcionales debidas a la exposición a O_3 . Esta hipótesis concuerda con los resultados observados en perros por Corddry y Col. (1991), quienes concluyeron que la reactividad de las vías aéreas evaluada por medio de la resistencia pulmonar y total así como por la resistencia de las vías aéreas periféricas eran muy similares cuando se usó un reto intravenoso a His, mientras que ambos métodos daban resultados diferentes con His nebulizada. Por ello, la ruta endovenosa parece ser más eficaz que la nebulizada para detectar respuestas periféricas. Por otro lado, ya se ha demostrado (Castelman y Col., 1980, Harkema y Col., 1993) que la exposición a O_3 causa cambios morfológicos en las vías aéreas periféricas. Más aún, en un trabajo previo observamos que en tiras de parénquima pulmonar, más no en cadenas traqueales obtenidas de cobayos expuestos a 3 ppm de O_3 durante 1 h se desarrolló hiperreactividad a His, sugiriendo que el O_3 produce anomalías funcionales en las vías aéreas periféricas (Campos y Col., 1992). Esta hipótesis está de acuerdo con los resultados obtenidos al incrementar el tiempo de exposición a 3 h, ya que este estímulo más fuerte podría estar produciendo disfunciones a un nivel más proximal de las vías aéreas. Este postulado explicaría también la hiperreactividad a los agentes aerosolizados después del reto antigénico en cobayos sensibilizados observada por nosotros y por otros (Chand y Col., 1993), ya que es bien conocido que la sensibilización en modelos animales sucede a todos los niveles de las vías aéreas.

En segundo lugar, una llegada incrementada de los agentes broncoconstrictores al músculo liso de la vía aérea explicaría también el efecto diferente que tiene el O_3 sobre la hiperreactividad. En este sentido, es sabido que la exposición a O_3 produce un aumento en la permeabilidad vascular (Nishikawa y Col., 1992), el cual podría favorecer una mayor llegada de los agonistas al músculo liso de las vías aéreas lo cual no ocurriría cuando éstos son nebulizados. Se necesita investigar más para evaluar con certeza esta hipótesis. Por otro lado, algunos estudios han encontrado que la actividad de la AChE de homogenados y de sangre disminuye poco después de la exposición a O_3 (Buckley y Col., 1975, Gordon y Col., 1981). Por eso, es razonable especular que nuestro estudio la inhibición de la AChE en el tejido pulmonar no fue suficiente para producir la hiperreactividad de las vías aéreas a ACh inhalada, pero cuando se usó la vía intravenosa la inhibición adicional de AChE en la sangre podría haber causado que mayor cantidad de ACh alcanzara al músculo liso de las vías aéreas, causando hiperreactividad. Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales encontramos que el O_3 no inhibió la actividad de la AChE (de hecho, se notó una tendencia opuesta). Esta discrepancia con los trabajos publicados podría explicarse por el periodo más largo entre la exposición a O_3 y la medición de la actividad de AChE. Por ello, la inhibición de la AChE parece no estar involucrada en las diferentes respuestas de las vías aéreas a los agonistas inhalados e intravenosos usados para demostrar la hiperreactividad inducida por O_3 .

Por último, en el grupo de animales **respirando espontáneamente/nebulizados en libre movimiento** encontramos que la segunda administración de ACh nebulizada fue mucho menos eficaz que la primera, es decir, se desarrolló hiporreactividad a ese agonista. Este fenómeno no ocurrió cuando la ACh se administró por la vía endovenosa (datos no mostrados). La razón de este fenómeno no está clara, pero una posibilidad es que la ACh nebulizada libere un factor relajador con mayor eficiencia que la ACh intravenosa. Aunque este fenómeno explicaría parcialmente la falta de respuesta de las vías aéreas expuestas a O_3 a los agonistas nebulizados, debe notarse que esta respuesta disminuida a una segunda curva no se observó para la His, y

que por ello debería haber hiperreactividad por O_3 al usar ese agente, lo cual no fue el caso. Así, este mecanismo no basta para explicar la ausencia de hiperreactividad a los agonistas inhalados después de la exposición a O_3 .

En conclusión, en los dos métodos pleurométricos usados por nosotros, encontramos que los agonistas inhalados son menos eficientes que los endovenosos para revelar la hiperreactividad de las vías aéreas después de una exposición aguda a O_3 , al menos para la exposición de 1 h a 3 ppm. Esta diferencia no se relaciona con la inhibición de la actividad de la AChE debida a la exposición a O_3 .

VI. CONCLUSIONES

El modelo animal para el estudio de la hiperreactividad de las vías aéreas de cobayos 16 a 18 h después de haber sido expuestos a 3 ppm ozono durante 1 h es muy útil cuando los agentes broncoconstrictores se administran por vía endovenosa, no así cuando éstos agonistas son administrados por la vías inhalada. En este último caso, la duración de la exposición es primordial para la manifestación de la hiperreactividad, pues sólo incrementándola será posible revelar el fenómeno. Esta diferencia en la determinación de la hiperreactividad manifiesta por agentes intravenosos y no por agentes inhalados, no se debe a la inhibición de la AChE tisular, ni sanguínea.

La hiperreactividad de las vías aéreas de los cobayos nebulizados 2 veces con acetilcolina con un intervalo de 16-18 h, puede deberse a la inactivación de un agente broncodilatador, un posible mecanismo del desarrollo del asma (Laitinen y Col.). No existen reportes de un fenómeno parecido en otras especies animales. Este resultado abre nuevas posibilidades par continuar nuestro estudio del síndrome asmático.

VII. REFERENCIAS

1. Mecanismos efectores de las reacciones inmunitarias iniciadas por la inmunoglobulina E. En Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS *Inmunología Celular y Molecular*, Ed McGraw-Hill-Interamericana de España, Madrid, 1995
2. Allen DL, Pollard KR, Hughes BL, Dorato MA, y Wolf RK. Use of head dome system to compare i.v. metacholine- induced bronchoconstriction in conscious vs. anesthetized rhesus monkeys. *J Appl Toxicol* 15: 13-17, 1995
3. Buckley RD, Hackney JD, Clark K, Posin C. Ozone y human blood. *Arch Environ Health* 30:40-43, 1975
4. Campos MG y Church MK. How useful are guinea-pig models of asthma? *Clin. Exp. Allergy*. 22(7):665-6, 1992
5. Campos MG, Segura P, Vargas MH, Vanda B, Ponce-Monter H, Selman M, y Montaña LM. O₃-induced airway hyperresponsiveness to noncholinergic system and other stimuli. *J Appl Physiol* 73: 354-361, 1992
6. Castleman WL, Dungworth DL, Schwartz LW, y Tyler WS. Acute respiratory bronchiolitis. An ultrastructural and autoradiographic study of epithelial cell injury and renewal in Rhesus monkeys exposed to ozone. *Am J Pathol* 98: 811-840, 1980.
7. Chand N, Nolan K, Pillar J, Lomask M, Diamantis W, y Sofia RD. Aeroallergen-induced dyspnea in freely moving guinea pigs: quantitative measurement by bias flow ventilated whole body plethysmography. *Allergy* 48: 230-235, 1993
8. Chávez J, Montaña LM, Sommer B, Gustin P, y Vargas MH. Obstrucción de las vías aéreas en un modelo de intoxicación por paratión en cobayos. *Neumol Cir Tórax* 55: 49-54, 1996.
9. Chong BTY, Agrawal DK, Romero FA, Townley RG. Measurement of bronchoconstriction using whole-body plethysmograph: comparison of freely moving versus restrained guinea pigs. *J Pharmacol Toxicol Methods* 39: 163-168, 1998.
10. Corddry DH, Sauder RA, Weinmann GG, Hirshman CA, Mitzner W. Use of collateral airways to assess airway reactivity. *J Appl Physiol* 70: 349-356, 1991.
11. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new y rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-95, 1961.
12. Eum SY, Hailé S, Lefort J, Huerre M y Vargaftig BB. Eosinophil recruitment into the respiratory epithelium following antigenic challenge in hyper-IgE mice is accompanied by interleukin-5-dependent bronchial hyperresponsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:12290-12294, 1995

- 13 Fabbri LM, Aizawa H, Alpert SE, Walters EH, O'Byrne PM, Gold BD, Nadel JA y Holtzman MJ. Airway hiperresponsiveness and changes in cell counts in bronchoalveolar lavage after ozone exposure in dogs. *Am Rev Respir Dis.* 129:288-291, 1984
- 14 Fedan JS, Millecchia LL, Johnston RA, Rengasamy A, Hubbs A, Dey RD, Yuan LX, Watson D, Goldsmith WT, Reynolds JS, Orsini L, Dortch-Carnes J, Cutler D, and Frazer DG. Effect of ozone treatment on airway reactivity and epithelium-derived relaxing factor in guinea pigs. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 724-734, 2000
- 15 Gordon T, Taylor BF, Amdur MO. Ozone inhibition of tissue cholinesterase in guinea pigs. *Arch Environ Health* 36:284-288, 1981
- 16 Hamelmann EH, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irwin CG, y Gelfand EW. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 766-775, 1997
- 17 Hargreave FE, Ryan G, Thomson NC, O'Byrne PM, Latimer K, Juniper EF y Dolovich H. Bronchial responsiveness to histamine or metacoline in asthma: measurement and clinical significance. *J Allergy Clin. Immunol* 68: 347-355, 1981.
- 18 Harkema JR, Plopper CG, Hyde DM, St. Georges JA, Wilson DW, y Dungworth DL. Response of macaque bronchiolar epithelium to ambient concentration of ozone. *Am J Pathol* 143: 857-866, 1993.
- 19 Kallós O y Kallos L. Experimental asthma in guinea pigs revised. *Int. Archs. Allergy appl. Immun.* 73: 77-85, 1984.
- 20 Kudo M, Nishikawa M, Ikeda H, y Okubo T. Involvement of superoxide anions in ozone-induced airway hyperresponsiveness in unanesthetized guinea pigs. *Environ Toxicol Pharmacol* 2: 25-30, 1996.
- 21 Laitinen LA, Heino M, Laitinen A, Kava T, Haatela T. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 131:599-606, 1985
- 22 Lundberg JM, Martling CR y Saria A: Substance P and capsaicin induced contraction of human bronchi. *Acta Physiol Scand* 119:49-53, 1983
23. Montaña LM, Jones JL, O'Byrne PM, y Daniel EE. Effect of ozone exposure in vivo on response of bronchial rings in vitro: role of intracellular Ca^{2+} . *J Appl Physiol* 75. 1313-1322, 1993.
24. NHLBI, Global initiative for asthma. Global strategy for asthma management and prevention. NHLBI/WHO Workshop Report. *NIH publication* No. 95-3659. Bethesda MD. 1995.

- 25 Nishikawa M, Suzuki S, Ikeda H, Fukuda T, Suzuki J, y Okubo T. Dose-response relationship of ozone-induced airway hyperresponsiveness in unanesthetized guinea pigs. *J Toxicol Environ Health* 30: 123-134, 1990
- 26 Nishikawa M, Ikeda H, Nishiyama H, Yamakawa H, Suzuki S, y Okubo T. Combined effects of ozone and cigarette smoke on airway responsiveness and vascular permeability in guinea pigs. *Lung* 170: 311-322, 1992
- 27 O'Byrne PM. Mechanisms of Airway Hyperresponsiveness. In: Holgate ST., Busse WW, eds. *Inflammatory Mechanisms in Asthma*. New York: Marcel Dekker, 891-906, 1992
- 28 Pretolani M, Ruffie C, Joseph D, Campos MG, Church MK, Lefort J, Vargaftig BB. Role of eosinophil activation in the bronchial reactivity of allergic guinea pigs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149(5): 1167-74, 1994
29. Roum JH, y Murlas C. Ozone-induced changes in muscarinic bronchial reactivity by different testing methods. *J Appl Physiol Respir Environ Exercise Physiol* 57: 1783-1789, 1984
- 30 Schwartz LW, Dungworth DL, Mustafa MG, Tarkington BK, y Tyler WS. Pulmonary responses of rats to ambient levels of ozone: effects of 7-day intermittent or continuous exposure. *Lab Invest* 34: 565-78, 1976.
- 31 Seltzer J, Bigby BG, Stulbarg M, Holtzman MJ, Nadel JA, Ueki IF, Leikauf GD, Goetzl EL, y Boushey HA. O₃-induced change in bronchial reactivity to metacholine and airway inflammation in humans. *J Appl Physiol* 60: 1321-1326, 1986
32. Shields RL y Gold WM. Effect of inhaled ozone on lung histamine in conscious guinea pig. *Environ Res.* 42:435-445, 1987
33. Sommer B, Montaña LM, Chavez J, Gustin P, y Vargas MH. Guinea pig lung shows circadian rhythmicity not influenced by ozone. *Respir Physiol* 113: 223-229, 1998.
34. Sommer B, Vargas MH, Chávez J, Carbajal V, Segura P, Montaña LM. Differences between inhaled and intravenous bronchial challenge to detect O₃-induced airway hyperresponsiveness. Aceptado en *J Appl Physiol*, 2001
35. Vargas MH, Segura P, Campos MG, Hong E, Montaña LM. Effect of ozone exposure on antigen-induced airway hyperresponsiveness in guinea pigs. *J. Toxicol. Environ. Health* 42(4):435-42, 1994
- 36 Vargas MH, Romero L, Sommer B, Zamudio P, Gustin P, y Montaña LM. Chronic exposure to O₃ causes tolerance to airway hyperresponsiveness in guinea pigs: lack of SOD role. *J Appl Physiol* 84: 1749-1755, 1998.
- 37 Yeadon M, Wilkinson D, Darley-Usmar V, O'Leary VJ, y Payne AN. Mechanisms contributing to ozone-induced bronchial hyperreactivity in guinea pigs. *Pulmonary Pharmacol* 5: 39-50, 1992.

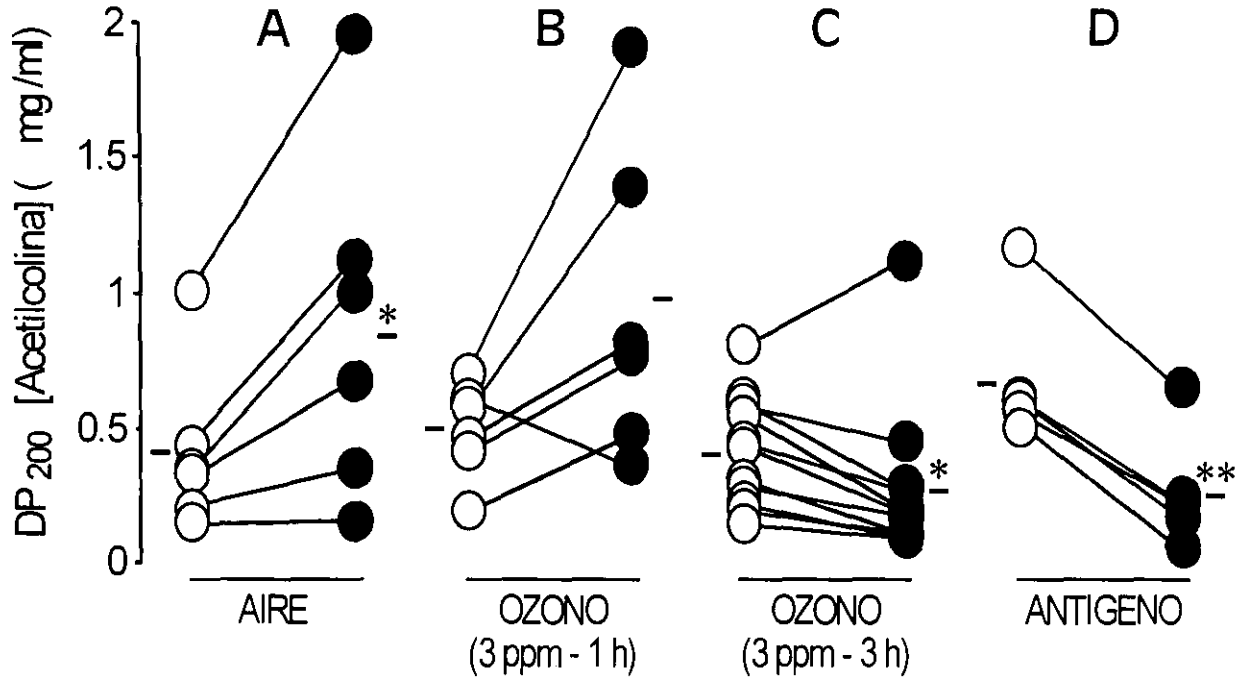


FIG 1. Efecto de diferentes estímulos sobre las respuestas de las vías aéreas a acetilcolina nebulizada, expresado como dosis provocativa 200% (DP_{200}), en cobayos en libre movimiento, respirando libremente. La primera curva dosis-respuesta para acetilcolina (círculos abiertos) se realizó 24 h antes de la exposición a aire, ozono u antígeno, mientras que la segunda curva (círculos cerrados) se elaboró en el mismo animal 16-18 h después de la exposición a aire u ozono, u 3 h después del reto antigénico (ovoalbúmina). Las barras horizontales indican el promedio del grupo.

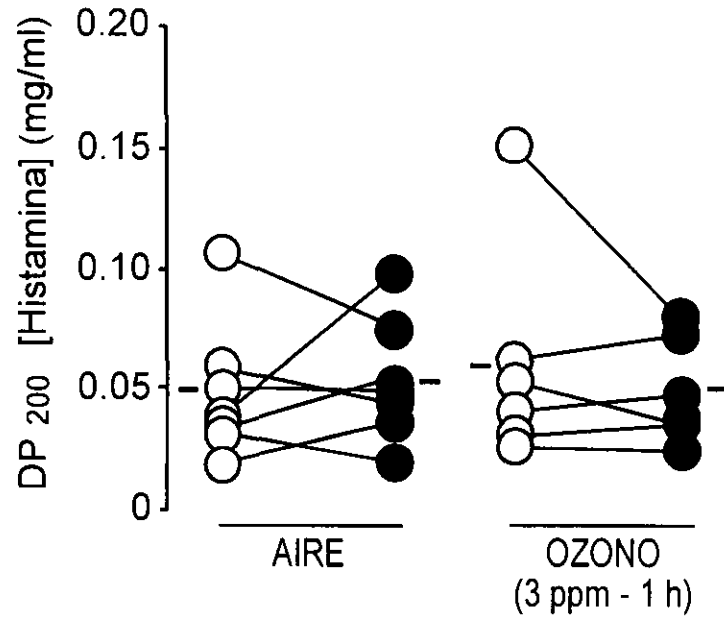


FIG 2. Efecto de la exposición a aire u ozono sobre la reactividad de las vías aéreas a histamina aerosolizada, expresada como dosis provocativa 200% (DP₂₀₀) en cobayos en libre movimiento respirando libremente. La primera curva dosis-respuesta para histamina (círculos abiertos) se realizó 24 h antes de la exposición, mientras que la segunda curva (círculos cerrados) se realizó en el mismo animal 16-18 h después de la exposición. Las barras horizontales indican el promedio del grupo.

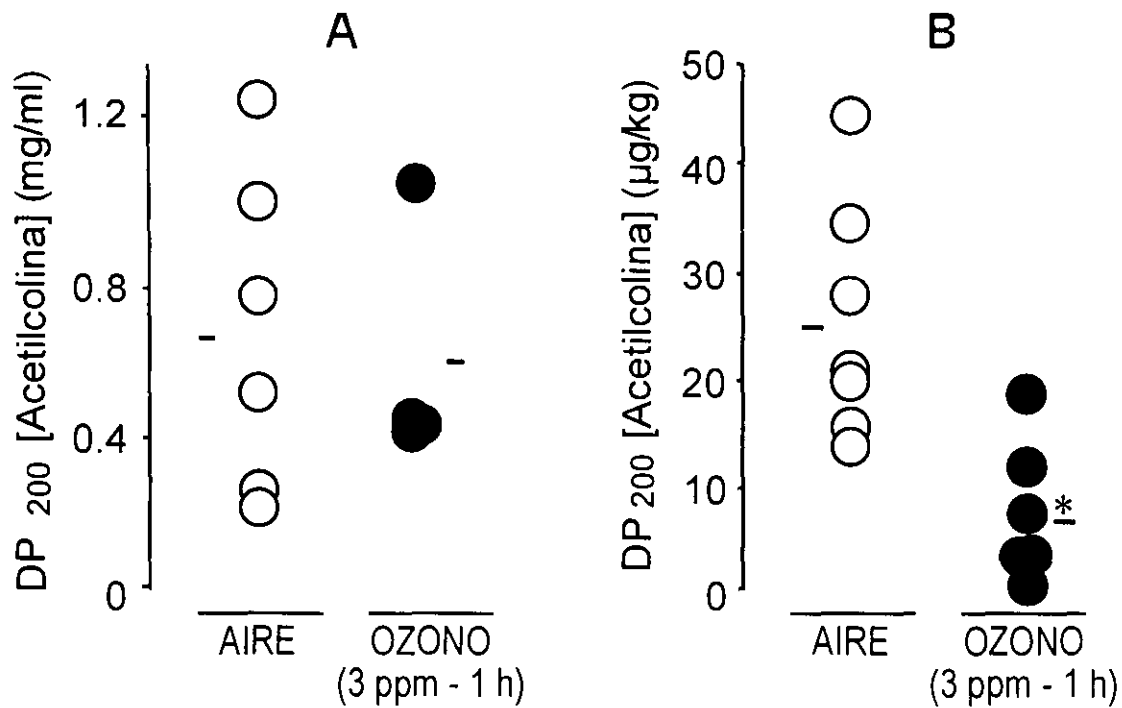


FIG 3. Efecto de la exposición a aire u ozono sobre la reactividad de las vías aéreas a acetilcolina expresada como dosis provocativa 200% (DP₂₀₀) en (A) acetilcolina nebulizada en cobayos restringidos, respirando espontáneamente y en (B) acetilcolina intravenosa en cobayos restringidos respirando espontáneamente. Cada curva dosis-respuesta se realizó en animales separados 16-18 h después de la exposición. Las barras horizontales indican el promedio del grupo. *P < 0.01

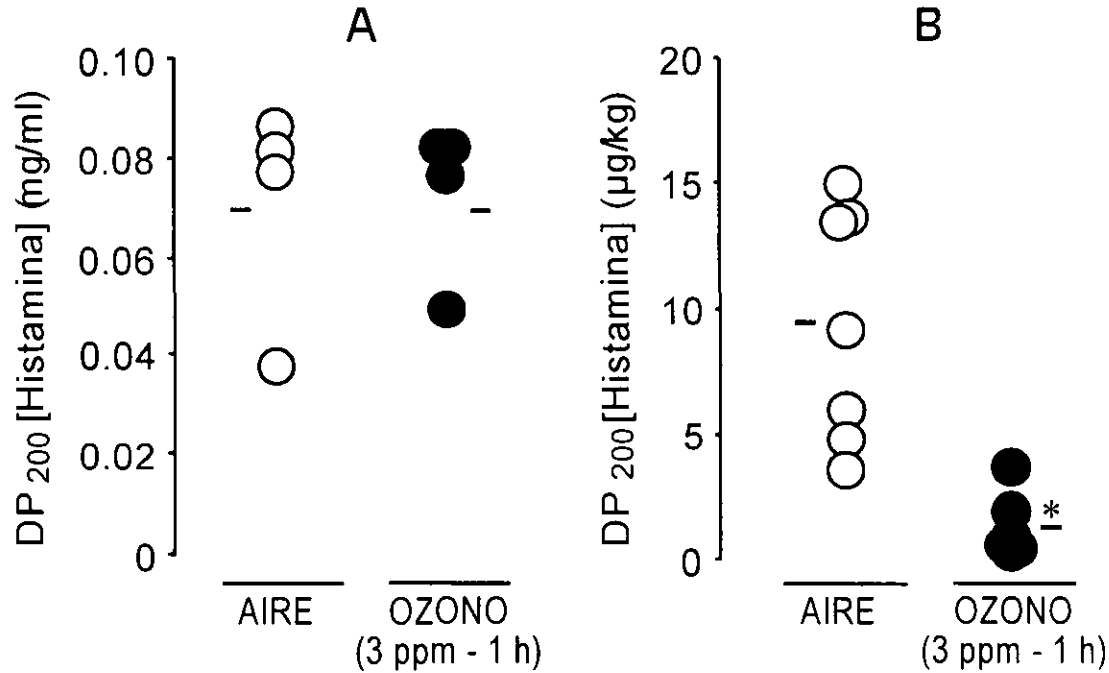


FIG 4. Efecto de la exposición a aire u ozono sobre la reactividad de las vías aéreas histamina expresada como dosis provocativa 200% (DP₂₀₀) en (A) histamina nebulizada e cobayos restringidos, respirando espontáneamente y en (B) histamina intravenosa e cobayos restringidos respirando espontáneamente. Cada curva dosis-respuesta se realizó e animales separados 16-18 h después de la exposición. Las barras horizontales indican e

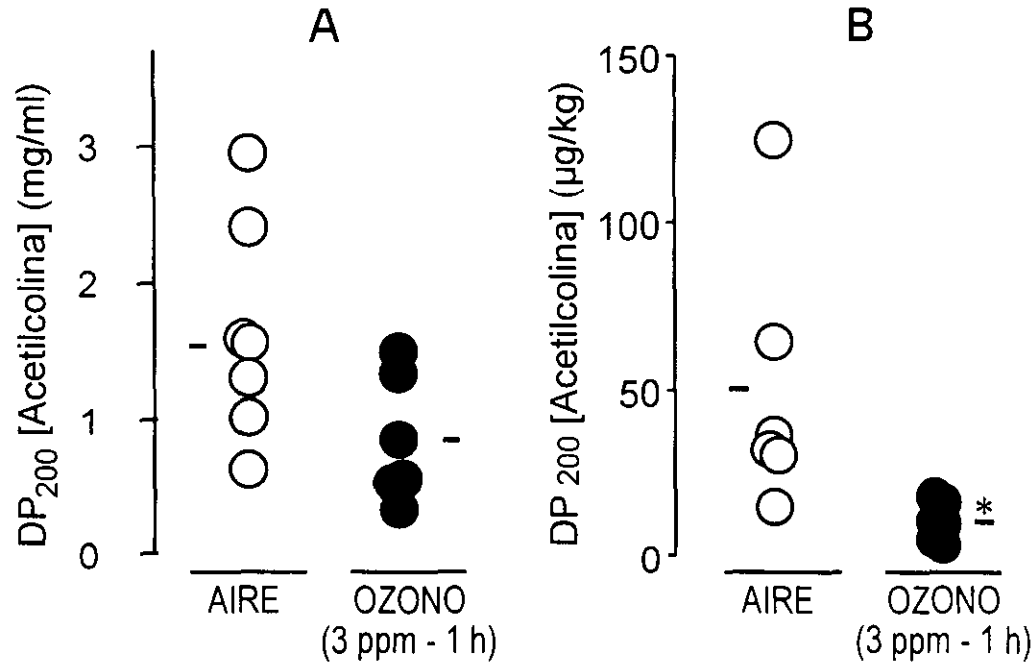


FIG 5. Efecto de la exposición a aire u ozono sobre la reactividad de las vías aéreas acetilcolina expresada como dosis provocativa 200% (DP₂₀₀) en (A) cobayo mecánicamente ventilados que recibieron acetilcolina nebulizada y (B) en cobayo mecánicamente ventilados que recibieron acetilcolina intravenosa. Cada curva dosis respuesta se realizó en animales separados 16-18 h después de la exposición. Las barra horizontales indican el promedio del grupo. * P < 0.05

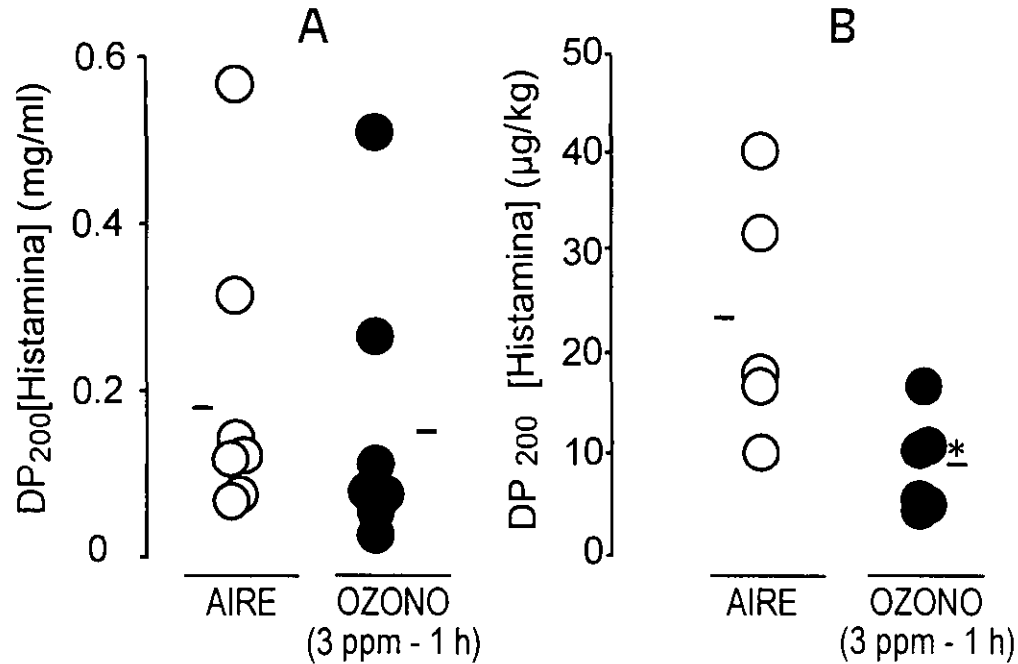


FIG 6. Efecto de la exposición a aire u ozono sobre la reactividad de las vías aéreas histamina expresada como dosis provocativa 200% (DP₂₀₀) en (A) cobayo mecánicamente ventilados que recibieron histamina nebulizada y (B) en cobayo mecánicamente ventilados que recibieron histamina intravenosa. Cada curva dosis respuesta se realizó en animales separados 16-18 h después de la exposición. Las barra horizontales indican el promedio del grupo. * P < 0.02

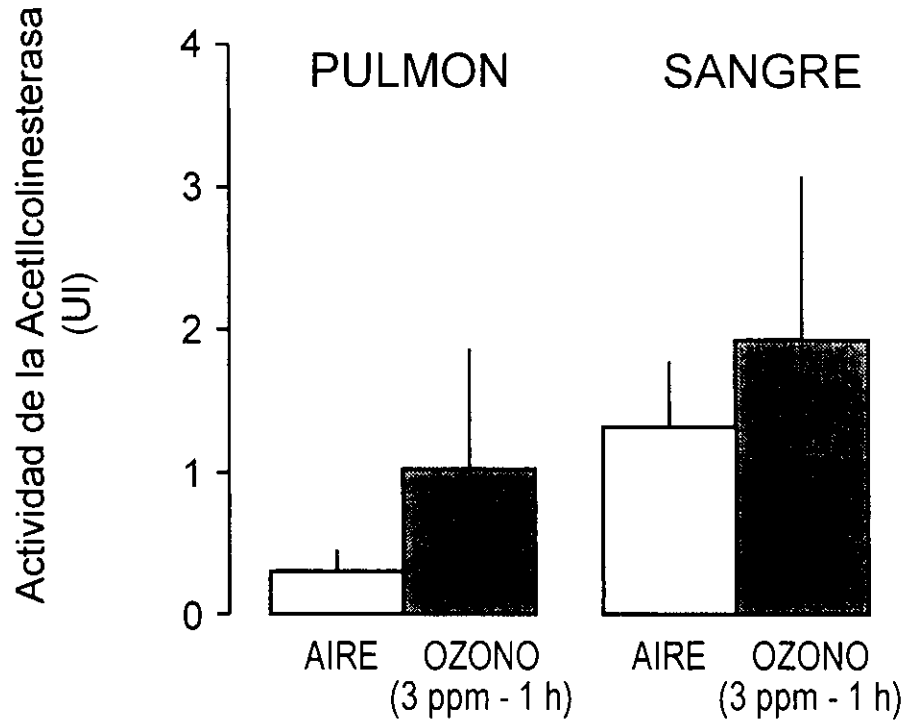


FIG 7. Efecto de la exposición a aire u ozono sobre la actividad de la acetilcolinesterasa e homogenados pulmonares o en sangre. Las unidades internacionales (UI) corresponden moles de sustrato hidrolizadas/minuto/g de tejido o a moles de sustrato hidrolizado/min/m de sangre. Las barras indican promedios y las líneas verticales error estándar de la media.