



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"EFECTO DEL AMORTIGUADOR DE CITRATOS EN LA
RESPUESTA DE BRONCOCONSTRICION E
HIPERREACTIVIDAD DE LAS VIAS AEREAS DEL COBAYO".

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A
NANCY SANCHEZ FUENTES

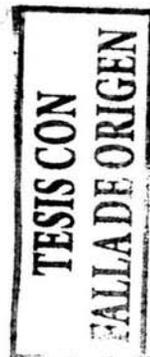
DIRECTORA DE TESIS

DRA. BLANCA MARGARITA BAZAN PERKINS



2004

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



ACADEMIA NACIONAL DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Sánchez Fuentes Nancy
FECHA: 17-02-04
FIRMA: [Firma]

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
"Efecto del amortiguador de citratos en la respuesta de broncoconstricción e hiperreactividad de las vías aéreas del cobayo"

realizado por Sánchez Fuentes Nancy

con número de cuenta 9632957-5 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins

Propietario

M. en C. José Luis Arreola Ramírez

Propietario

Dra. Patricia Segura Medina

Suplente

Dra. María Luisa Fanjul Peña

Suplente

Dra. María de Lourdes Segura Valdéz

Consejo Departamental de Biología FACULTAD DE CIENCIAS

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLÓGIA

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Dios por darme la vida, y fuerza de superar los obstáculos que se me presentaron durante el largo camino de la primaria a la universidad.

A todo el laboratorio de asma en especial a Paola por su apoyo académico y moral, así como a Vero, Paty Segura, Betina, José Luis, Sra. Toñita, Paty Campos, Lulú (secretaria).

Obviamente a Dr. Luis Montaña y Blanca B. por permitirme usar las instalaciones del laboratorio de asma, del INNER.

También al laboratorio de Neurofisiología Comparada de Invertebrados, sobre todo a la Dra. Banjul y Julio.

De igual forma a mis papás y hermanos (Blanca E, Asai), en especial a mi mamá por su apoyo.

Agradezco también a todos mis primos, principalmente a Rosy, Marvin, Genis, por su apoyo moral y motivación, a Tino por la transmisión de su sabiduría, su apoyo moral y económico, a Chuy por su motivación.

A todos mis amigos por creer en mí, aunque sólo mencionaré los que estuvieron conmigo más recientemente, pero todos contribuyeron en darme confianza para concluir esta etapa:

Fernando, Marlen, Siomara, Cinthya, Genaro, Tere, Rafa, Marisol, Blanca S., Adrian, Melquiades... *Entre otros.*

También a mis padrinos que confiaron en que lograría terminar, y al coro Renacimiento, por su apoyo moral.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
INTRODUCCION.....	4
1. Fisiopatología del asma.....	4
2. El estrés oxidativo.....	5
3. El glutatión.....	7
4. El GSH y el sistema inmune.....	7
5. El ácido cítrico.....	10
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVOS.....	13
MÉTODOS.....	14
Animales.....	14
Experimentos <i>in vivo</i>	
1. Procedimiento de sensibilización.....	14
2. Pletismografía.....	14
3. Reactividad a la histamina.....	18
4. Lavado broncoalveolar.....	18
Experimentos <i>in vitro</i>	
1. Obtención del tejido traqueal.....	19
2. Reto antigénico.....	19
3. Curvas concentración-respuesta a carbacol e histamina....	20
Fármacos.....	20
Análisis de datos.....	21

RESULTADOS	22
Experimentos <i>in vivo</i>	
1. Efecto del amortiguador de citratos en el reto con ovoalbúmina	22
2. Efecto del amortiguador de citratos en la reactividad de las vías aéreas a la histamina.....	22
3. Cuentas celulares diferenciales.....	23
Experimentos <i>in vitro</i>	
1. Reto antigénico.....	28
2. Curvas concentración-respuesta a carbacol. e histamina....	22
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIÓN	35
GLOSARIO	36
REFERENCIAS	40

RESUMEN

El ciclo del ácido cítrico es la vía degradativa más importante para la generación de trifosfato de adenosina (ATP). Recientemente se ha descrito que una consecuencia de la acumulación de citratos, debido a la inhibición del ciclo del ácido cítrico por ATP, es la generación de grandes cantidades de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH), un precursor en la generación de glutatión reducido (GSH). El GSH además de ser un antioxidante, también ha mostrado propiedades importantes en la regulación de la respuesta inmune.

El incremento del GSH en las células presentadoras de antígeno disminuye la producción de la interleucina 4 y aumenta la producción de interferon γ . Este fenómeno impide la maduración de linfocitos T helper o auxiliares 2 (Th2) y polariza la maduración a Th1. La disminución de los linfocitos Th2 reduce de manera importante la expresión de inmunoglobulina E y de citocinas pro-inflamatorias. De acuerdo a lo anterior, si la acumulación de citratos incrementa la producción de GSH, inhibiendo la maduración de los linfocitos Th2 (reguladores de la producción de anticuerpos involucrados en las enfermedades alérgicas), entonces la administración de citratos o su equivalente, el amortiguador de citratos, podría disminuir la respuesta al reto antigénico de cobayos sensibilizados a ovoalbúmina. Para evaluar esta hipótesis, se sensibilizaron cobayos a ovoalbúmina para posteriormente retarlos antigénicamente con aerosoles de esta proteína. Los retos se llevaron a cabo cada 10 días durante dos meses y en cada reto se determinó el índice de broncoconstricción máximo alcanzado durante una hora. El tratamiento con tres dosis diferentes del amortiguador de citratos (0.15, 0.3 y 0.6 ml de 0.1 M) administrado durante la primer semana de administración de reto antigénico y con un refuerzo al mes, fue capaz de disminuir la respuesta máxima de broncoconstricción producida por el reto durante los dos meses siguientes. En el último día de estudio se evaluó la reactividad a la histamina en los cobayos sensibilizados. Tres de los cuatro cobayos tratados con 0.6 ml del amortiguador de citratos mostraron hiperreactividad y sólo uno fue hiporreactor. Las células en los lavados bronqueoalveolares de los animales sensibilizados presentaron neutrófilia y ésta no fue modificada por el tratamiento con el amortiguador de citratos.

Adicionalmente, se observó que el amortiguador de citratos no modifica la respuesta *in vitro* del músculo liso traqueal a la histamina, carbacol, ni al reto con ovoalbúmina. Con estos resultados concluimos que el amortiguador de citratos es capaz de disminuir la respuesta al reto antigénico de cobayos sensibilizados por un efecto que no incide de forma directa sobre el músculo liso. Adicionalmente, debido a que los citratos no modificaron la hiperreactividad a la histamina *in vivo*, es probable que el efecto del fármaco no se deba a la disminución del proceso inflamatorio en el pulmón.

ANTECEDENTES

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas en la que participan muchas células y elementos celulares, en particular células cebadas, eosinófilos, linfocitos T, macrófagos, neutrófilos y células epiteliales. En personas susceptibles, esta inflamación causa episodios recurrentes de respiración sibilante, falta de aliento, opresión del pecho y tos, especialmente en las noches y por la mañana. Estos episodios están usualmente asociados a una obstrucción difusa y variable del flujo aéreo, que suele ser reversible ya sea en forma espontánea o con tratamiento. Un rasgo característico de esta enfermedad es la hiperreactividad de las vías aéreas. Esta última consiste en un incremento de la sensibilidad del músculo liso traqueobronquial ante estímulos físicos (aire frío, inhalación de soluciones hipotónicas etc.) o químicos (agonistas colinérgicos, histamina etc.) Esta situación hace que las vías aéreas respondan en forma exagerada ante estos estímulos produciendo una disminución en su calibre y dificultando el paso del aire (Expert Panel Report 1997).

Los factores desencadenantes de una crisis de asma pueden ser de tipo inmunológico o no inmunológico. En el primer tipo se producen anticuerpos en respuesta a una primera exposición a un antígeno o alergeno en un proceso llamado *sensibilización*. Este proceso se inicia cuando un individuo susceptible se expone a un alergeno y éste es captado por las células presentadoras de antígeno (células dendríticas), que lo procesan y lo presentan a los linfocitos T auxiliares (helper) indiferenciados conocidos también como Th0. Dependiendo del tipo de citocinas presentes en el medio extracelular, los linfocitos Th0 pueden diferenciarse a Th1 o Th2 (Wu y col. 2001; Ma y Ma 2002; Kidd 2003). Estos últimos son capaces de interactuar con los linfocitos B, que después de convertirse en células plasmáticas, producen inmunoglobulina E (IgE) con especificidad para ese alergeno. Esta IgE es capaz de unirse a la superficie de eosinófilos, monocitos, mastocitos y basófilos. Cuando tiene lugar un nuevo contacto con el alergeno, éste es reconocido por la IgE unida a estas células provocando una cascada de eventos que involucran la activación de células y

liberación mediadores (histamina, prostaglandinas, leucotrienos, citocinas, etc.) que darán lugar a los síntomas de la reacción alérgica y a la inflamación local (Barnes 2003). Los individuos con tendencia a desarrollar de manera potente la respuesta al alérgeno (sensibilidad inmediata) se conocen como alérgicos. En el asma no inmunológica al parecer no hay una sensibilización como tal y la inflamación es ocasionada por estímulos muy variados como la inhalación de químicos, infecciones virales, factores genéticos o antígenos desconocidos (Humbert y col. 1999; Hoffmann y col. 2002). No obstante, la inflamación en este tipo de asma también está controlada por los linfocitos Th2 (Kips y col. 2001; Barnes 2003).

INTRODUCCIÓN

1. Fisiopatología del asma

La inflamación de las vías aéreas ha resultado ser el factor más importante en la patogénesis del asma (Expert Panel Report 1997). La inflamación es una respuesta que defiende al individuo de la invasión de microorganismos y toxinas. Consiste principalmente en la incorporación de neutrófilos, monocitos, basófilos, eosinófilos y linfocitos dentro del sitio de infección o daño y su activación para la eliminación del agente infeccioso (Abbas 2000; Yáñez y col. 2000). La respuesta inflamatoria en el asma se caracteriza principalmente por la infiltración de eosinófilos, de manera semejante a los procesos inflamatorios de las infecciones, pero la presencia persistente del estímulo puede perpetuar la eosinofilia con secuelas importantes en la patogénesis de la enfermedad (Lemanske y Busse 2003). Adicionalmente, después de la exposición al alérgeno se produce un incremento transitorio en el número de neutrófilos. Esta neutrofilia se vuelve crónica si el asma es severa y, debido a la gran cantidad de mediadores que liberan estas células (proteasas, especies reactivas de oxígeno, citocinas etc.) este tipo celular contribuye fuertemente dañando a la vía aérea (Chung y O'Byrne 2003; Hellings y col. 2003).

Una consecuencia de la inflamación es la obstrucción de las vías aéreas debido a la disminución o limitación de flujo aéreo. Esta limitación es resultado de múltiples factores fisiológicos y estructurales que inducen la contracción del músculo liso, generando edema, hipersecreción de moco, etc. (Bousquet 2000; Jeffery 2001; Busse 2003). Por ejemplo, mediadores secretados durante la activación de algunas células inflamatorias tales como histamina, cisteinil leucotrienos (LTC₄, LTD₄, LTE₄), prostaglandina D₂, factor activador de plaquetas entre otros, pueden directamente contraer al músculo liso bronquial. Después del reto antigénico la broncoconstricción inmediata es consecuencia de la liberación de histamina principalmente de los mastocitos (De Boer y col. 1998).

Aunque la obstrucción de las vías aéreas en el asma se considera reversible, existe cada vez más información acerca de pacientes con asma con modificaciones permanentes en sus funciones respiratorias (Brinke y col. 2001; Vignola y col. 2003). Se ha planteado que esos cambios permanentes son una consecuencia de procesos repetidos de daño y reparación, producidos por la inflamación crónica, que "remodelan" la vía aérea (Wang y col. 2003). Esta remodelación es responsable de que en las vías aéreas se presente una mayor reactividad a diversos estímulos, un fenómeno conocido como hiperreactividad (Wang y col. 2003; O'Byrne e Inman 2003; Boulet 2003). Existen dos tipos celulares importantes en el proceso de inflamación-remodelación que también están fuertemente ligados con la hiperreactividad: la eosinofilia y la neutrofilia (De Boer y col. 1998; Barnes 2003; Lemanske y Buse 2003).

El estrés oxidativo es una importante consecuencia de la inflamación. Esta se genera debido a que en las vías aéreas existe una producción persistente de oxidantes que es equilibrada por mecanismos antioxidantes, pero durante la inflamación se presenta un desequilibrio al incrementarse de manera exacerbada las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Henderson WR y col. 2002; Comhair y Erzurum 2002; Wood y col. 2003; Barnes 2003). Este desequilibrio se ha relacionado con una mayor inflamación, hiperreactividad, hipersecreción de moco, daño epitelial, exudación vascular así como en un decremento en la actividad de los mecanismos antioxidantes en el tracto respiratorio, exacerbando el estrés oxidativo (Grimble 1998; Barnes 2000; Comhair y Erzurum 2002).

2. El estrés oxidativo

Los eosinófilos, macrófagos alveolares y neutrófilos de pacientes con asma producen más ERO que los individuos sanos. El blanco de las ERO son los componentes lipídicos ricos en ácidos poliinsaturados de las membranas celulares lo que se traduce en daño y desprendimiento de las células epiteliales (Comhair y Erzurum 2002; Barnes 2003). Debido a que se ha visto que la contracción el músculo liso de las vías aéreas aumenta cuando el epitelio es dañado o removido, se ha sugerido una estrecha relación entre el daño epitelial y la hiperreactividad de

las vías aéreas (Barnes 2003). Otro mecanismo de daño por ERO es mediante la activación del factor nuclear $\kappa\beta$ (NF $\kappa\beta$) en las células inflamatorias y el epitelio de las vías aéreas (Barnes 2000). La activación de este factor se produce en el asma y es clave para perpetuar la inflamación, pues entre otras acciones induce la expresión de moléculas pro-inflamatorias como las interleucinas (IL) -1 β , -2 y -6, el factor de necrosis tumoral α , el factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos, la eotaxina, la ciclooxigenasa-2, la sintasa inducible del óxido nítrico así como de moléculas de adhesión (Hoffman y col. 2002; Barnes 2003; Wood y col. 2003).

La producción de las ERO se produce en cascada y se inicia con el radical superóxido (O_2^-). Los radicales se caracterizan por poseer uno o más electrones no apareados. El O_2^- es un producto normal del metabolismo aeróbico donde se forma en pequeñas proporciones (1-2% del O_2 total consumido) a partir del O_2 utilizado en la respiración mitocondrial (Comhair y Erzurum 2002; Wood y col. 2003). La producción de éste radical durante la descarga respiratoria de fagocitos (vía de la hexosa monofosfato) forma parte del sistema de defensa del organismo contra bacterias y virus. Sin embargo, la inflamación persistente puede generar cantidades exacerbadas de O_2^- en mastocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos activados, y se ha demostrado que este radical puede incrementar directamente la reactividad de las vías aéreas (Barnes 2003).

Posteriormente, la superóxido dismutasa (SOD) citoplasmática cataliza la reacción de dos moléculas de O_2^- con protones para formar otra ERO, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2 ; Fig. 1). El H_2O_2 tiene gran importancia debido a que en presencia de los metales de transición Cu^+ o Fe^{2+} forma radicales hidroxilo (OH^\cdot). Este último radical es de los más tóxicos pues oxida proteínas y lípidos alterando sus funciones. Adicionalmente el H_2O_2 induce la liberación de mediadores que contraen potentemente al músculo liso de las vías aéreas como el 8-Isoprostano formado por oxidación no enzimática del ácido araquidónico (Barnes 2000).

3. El glutatión

Una forma de neutralizar al H_2O_2 puede ser mediante las catalasas que rompen la molécula para formar O_2 y H_2O . Otra vía es mediante la glutatión peroxidasa (GPOD), una enzima que elimina H_2O_2 por catálisis y oxidación del glutatión en su forma reducida (GSH; Fig. 1). La glutatión reductasa convierte al glutatión oxidado (GSSG) en GSH con intervención de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH). Esta última molécula es muy importante en el balance de oxido-reducción o redox del sistema GSH/GSSG, pues impide que se agoten las reservas de GSH (Comhair y Erzurum 2002; WHO 2003; Fig. 1). El GSH, además de ser un captor de H_2O_2 , como sustrato de la enzima glutatión peroxidasa, también ha demostrado ser captor de OH^\cdot (Dworski 2000).

Además de las ERO existen las especies reactivas de nitrógeno. El óxido nítrico (NO^\cdot), un importante mediador de la reactividad del músculo liso es también un radical libre altamente reactivo (Lowenstein y col. 1994; Dworski 2000; Comhair y Erzurum 2002). Se sabe que los pacientes con asma exhalan más NO^\cdot que los individuos sanos (Hatch 1995). En estos individuos, la activación de neutrófilos, por ejemplo, activa a la óxido nítrico sintetasa que, utilizando a las ERO, es capaz de combinarse con el NO^\cdot para producir sustancias mucho más tóxicas que el propio NO^\cdot tales como el ácido peroxinitroso y el radical peroxinitrito (Greene 1999; Comhair y Erzurum 2002; Wood y col. 2003). Este radical es también controlado por el GSH (Mallet y Sun 2003; Fig. 1).

4. El GSH y el sistema inmune

Además de preservar el balance redox intracelular, el GSH juega un papel importante detoxificando toxinas, remodelando la matriz extracelular y participando en la apoptosis y la respiración mitocondrial (Rahma y MacNee 2000; Ma y Ma 2002; Kidd 2003; Komatsu y col. 2003). Adicionalmente, se ha demostrado que el GSH tiene propiedades importantes en la regulación de la respuesta inmune (Peterson y col. 1998; Ma y Ma 2002; Kidd 2003).

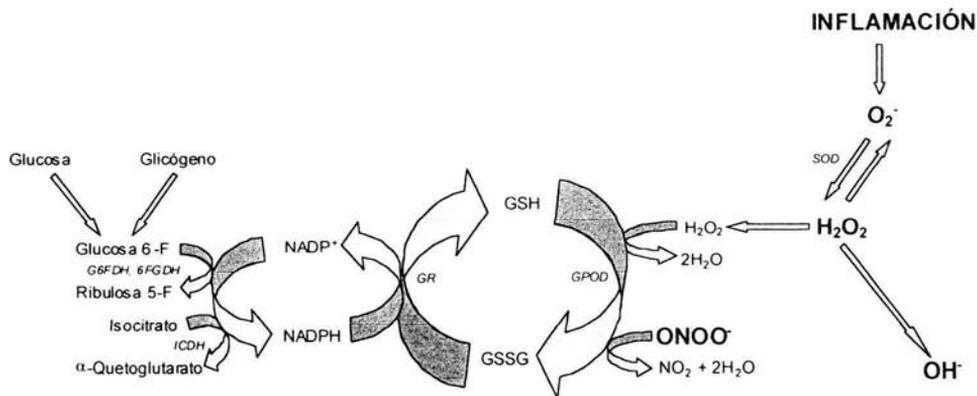


Figura 1. El glutatión es uno de los principales componentes de la defensa contra la oxidación. Durante la inflamación, la cascada de oxidantes se puede iniciar con la producción del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en macrófagos, eosinófilos y neutrófilos. El $O_2^{\cdot-}$ es convertido en peróxido de hidrogeno (H_2O_2) por la superóxido dismutasa (SOD). El H_2O_2 es precursor del radical hidroxilo (OH^{\cdot}). El glutatión (GSH) formado con ayuda de la glutatión reductasa (GR) a partir del glutatión oxidado (GSSG), elimina al H_2O_2 utilizando a la glutatión peroxidasa (GPOD). El GSH también puede controlar los niveles del radical peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). El potencial redox del GSH/GSSG es regulado por una molécula transportadora de electrones, la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH). A su vez el potencial redox del sistema $NADP^+/NADPH$ esta controlado por la oxidación de la glucosa 6-F (por vía de la hexosa monofosfato) o del isocitrato. Abreviaciones: glucosa 6-F deshidrogenasa (G6FDH), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6FGDH), isocitrato deshidrogenasa (ICDH). Tomado de Mallet y Sun 2003.

En 1986 Mosmann y colaboradores propusieron una teoría sobre la regulación del sistema inmune basada en la homeostasis de la actividad de los linfocitos Th1 y Th2. Esta hipótesis se derivó del descubrimiento sobre los diferentes patrones de citocinas que expresan las células Th (Mosmann y col. 1986). Por ejemplo, las células Th1 que expresan IL-12 e interferon γ (INF- γ), dirigen la "inmunidad celular" para combatir virus y otros patógenos intracelulares, así como para eliminar células cancerosas. Las células Th2, que expresan IL-4 y -10, dirigen la "inmunidad humoral" que regula la producción de anticuerpos para combatir organismos extracelulares (Wu y col. 2001; Ma y Ma 2002; Kidd 2003). Ambos tipos celulares maduran a partir de linfocitos Th0 que se desarrollan a Th1 si el linfocito fue estimulado por las células presentadoras de antígeno con INF- γ o IL-12, o a Th2 si fue estimulado con IL-4 o -10 (Ma y Ma 2002; Murata y col. 2002; Nishikubo y col. 2003). Una vez que estas células han madurado, las citocinas liberadas por los linfocitos Th1 inhiben la maduración de las Th2 y viceversa (Peterson y col. 1998; Ma y Ma 2002; Kidd 2003). En los organismos con predisposición a presentar alergias hay una polarización de las células Th0 al subtipo Th2, generando la cascada de eventos que llevan a la producción de moléculas pro-inflamatorias características del asma.

Experimentalmente se ha demostrado que la polarización a Th1 puede ser transformada a una dominancia de Th2 a través de la inhibición del GSH intracelular de las células presentadoras de antígeno y viceversa. Por ejemplo se sabe que uno de los efectos del mercurio, la ciclofosfamida, el dietil maleato, el etanol y las partículas de diesel es inhibir al GSH lo que polariza la dominancia en la población de linfocitos a Th2 (Peterson y col. 1998; Ma y Ma 2002; Kidd 2003). De manera inversa, el incremento de GSH disminuye la producción de IL-4 y aumenta la de IFN- γ . Esta disminución de la IL-4 no permite la maduración de linfocitos inmaduros a Th2, por lo que la vía se dirige a Th1. Este incremento de linfocitos Th1 reduce la expresión de citocinas Th2 pro-inflamatorias y también disminuye la producción de IgE (Peterson y col. 1998; Venarske y DeShazo 2003; Kidd 2003). Otro mecanismo que favorece la formación de linfocitos Th1 es por la

acumulación de GSSG que activa al NF- κ B induciendo la producción de IL-12 (Komatsu y col. 2003). El efecto polarizante para los linfocitos T que se ha observado en el caso del sistema GSH/GSSG, no lo producen otros antioxidantes que disminuyen el proceso inflamatorio como los ácidos grasos de cadena larga omega-3 (Kidd 2003).

5. El ácido cítrico

El ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanetricarboxílico ($\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{C}(\text{OH})(\text{CO}_2\text{H})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), o ácido cítrico, es un ácido tricarboxílico no tóxico con buena solubilidad en agua y que sólo se descompone a altas temperaturas. Su uso es muy amplio como aditivo en formulaciones que se utilizan desde la cocina, la cosmetología, hasta la industria de los detergentes (McNaughton y Cedaro 1992; Cox y Jenkins 1994). El ácido cítrico sólo, o en combinación con su forma en sal, el citrato de sodio, sirve para amortiguar el pH, como quelante para controlar la presencia de iones pesados en el agua, así como para ayudar a solubilizar algunas sustancias (McNaughton y Cedaro 1992; Sharma y col. 1993; Karafa y col. 2001; Keowmaneechai y McClements 2002). La mezcla de citrato de sodio con ácido cítrico, conocida como amortiguador de citratos, permite obtener una solución con un pH estable y mayor (2 a 7) que la de una solución sólo con ácido cítrico (Hauptfleisch y Payne 1996). Ambas sustancias son absorbidas, completa y rápidamente metabolizadas en el ciclo del ácido tricarboxílico, o ciclo del ácido cítrico en las mitocondrias donde precisamente la primera etapa en el ciclo es la transferencia del grupo acetilo desde la acetilcoenzima A al ácido oxalacético para formar ácido cítrico. Este ciclo es inhibido por ATP por tanto, una vez que se han formado reservas adecuadas de energía, el ciclo se interrumpe.

Se ha determinado que se pueden digerir grandes dosis de citrato de sodio (30 a 50 g/Kg diarios) para provocar diuresis alcalina, sin que se produzcan otros trastornos en el organismo. Así mismo se ha visto que la adición de ácido cítrico en una dieta constante no afecta el pH urinario aún si este es inyectado por vía

intravenosa pues es metabolizado rápidamente por lo que no se elimina en la orina (Sollman 1955).

El citrato de sodio se puede utilizar aún sin combinarse con ácido cítrico y su uso más frecuente es como anticoagulante debido a que se une reversiblemente al calcio formando compuestos solubles. Por eso es muy frecuente que el citrato de sodio se utilice en el almacenamiento de sangre, durante la hemodiálisis o en el manejo de la nefrolitiasis y, por sus propiedades amortiguadoras, también se usa como agente alcalinizante (Oster y col. 1988; Collart y col. 1993). La administración de cantidades excesivas de citrato (Mas de 50 g/Kg), como puede ocurrir cuando se transfunden grandes volúmenes de sangre, produce hipocalcemia (disminución en la concentración plasmática de calcio), derivando en tetania y depresión de las contracciones cardiacas (Bowman y Rand 1984).

Recientemente se ha descrito que el citrato derivado del ciclo del ácido cítrico puede abastecer el NADPH necesario para mantener el potencial redox de sistema GSH/GSSG mediante dos vías (Medvedeva y col. 2002; Mallet y Sun 2003; Fig. 2). En la primera, cuando el ciclo del ácido cítrico se satura y hay un exceso de citrato, se interrumpe la glicólisis debido a que el citrato es un poderoso inhibidor alostérico de la fosfofructocinasa (Parvez y col. 2001). Esta inhibición acumula y suministra el sustrato, la glucosa 6-F, para la vía de la hexosa monofosfato que genera importantes cantidades de NADPH (Fig. 2). En la segunda, es necesario que el citrato se transforme en isocitrato, a través de una aconitasa, para posteriormente formar NADPH cuando este isocitrato es convertido en α -quetoglutarato con la intervención de la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ (Fig. 2).

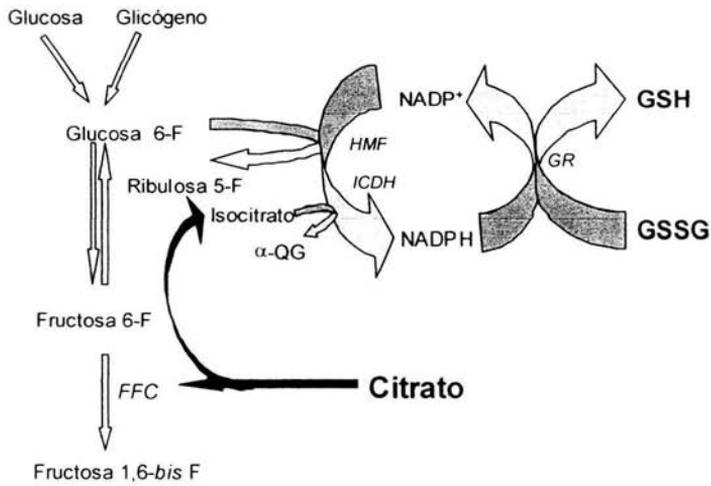


Figura 2. Mecanismos antioxidantes del citrato. El citrato incrementa la formación de NADPH por dos vías. En una mediante la supresión de la fosfofructocinasa (FFC) lo que acumula glucosa 6-F que se metaboliza por la vía de la hexosa monofosfato (HMF) produciendo NADPH. En la otra generando isocitrato que es un sustrato para la deshidrogenasa de isocitrato dependiente de NADP⁺ (ICDH). Tomado de Mallet y Sun 2003.

HIPÓTESIS

Con base a los antecedentes ya descritos, se planteo la siguiente hipótesis:

Si los citratos mantienen el balance redox del sistema GSH/GSSG, para desactivar radicales libres, y además favorecen la vía de maduración de Th1, disminuyendo la de Th2, entonces el tratamiento con el amortiguador de citratos podría disminuir la respuesta al reto antigénico de cobayos sensibilizados.

OBJETIVO GENERAL

Conocer el efecto del amortiguador de citratos en la respuesta al reto antigénico de cobayos sensibilizados y comprobar si el amortiguador de citratos modifica la reactividad de las vías aéreas *in vivo*, la inflamación así como la contracción del músculo liso de las vías aéreas *in vitro*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Diseñar un modelo de sensibilización con ovoalbúmina en cobayos.
2. Comprobar si el amortiguador de citratos modifica la broncoconstricción inducida por el reto antigénico y la reactividad de las vías aéreas a la histamina en cobayos sensibilizados con ovoalbúmina.
3. Evaluar si el amortiguador de citratos tiene un efecto directo sobre la contracción del músculo liso *in vitro* utilizando anillos traqueales de cobayos sensibilizados y no sensibilizados.
4. Conocer el efecto del amortiguador de citratos en el infiltrado inflamatorio de las vías aéreas del cobayo, mediante un lavado broncoalveolar.

METODOLOGÍA

Animales

Se utilizaron cobayos Hartley, machos, con pesos entre 350 a 400g criados en condiciones convencionales de bioterio con alimento y agua *Ad libitum*.

Experimentos *in vivo*

1. Procedimiento de sensibilización

En el día 1 se administró a los cobayos por vía subdérmica e intraperitoneal, una mezcla de 1 ml de ovoalbúmina (40 µg/ml) e hidróxido de aluminio (1 mg/ml, adyuvante), disuelta en solución salina fisiológica (SSF). Esta sensibilización se reforzó 8 días después con aerosoles de ovoalbúmina (3 mg/ml) disuelta en SSF durante 15 min. Los aerosoles se generaron a través de nebulizador US-Bennett (CA, USA) que produjo partículas de diámetro de 7-9 µm con un flujo de 2 ml/min.

2. Pletismografía

El día 15 se realizó otro refuerzo con aerosoles de ovoalbúmina (1 mg/ml en SSF) durante 1 min. Para comprobar la eficacia de este protocolo de sensibilización de las vías aéreas en este tiempo, se examinó por pletismografía barométrica el efecto del reto antigénico sobre la función pulmonar. Cada uno de los animales se colocó en un pletismógrafo de cámara única para animales en libre movimiento (Buxco Electronics, CT, EU) en el cual el animal recibe un flujo de aire continuo. Este sistema de pletismografía está basado en la medición directa de la fluctuación de presión que se presenta dentro de la cámara donde se encuentra el animal y compara esta presión con la de una cámara de referencia (Fig. 3). Dichas fluctuaciones fueron captadas por un transductor de presión diferencial (SenSym, modelo SX05, EUA), conectado a un preamplificador y digitalizador de señales, y analizadas por una computadora provista de un programa especial para el manejo automatizado de los datos (Buxco BioSystem XA v1.1, EUA; Fig. 3).

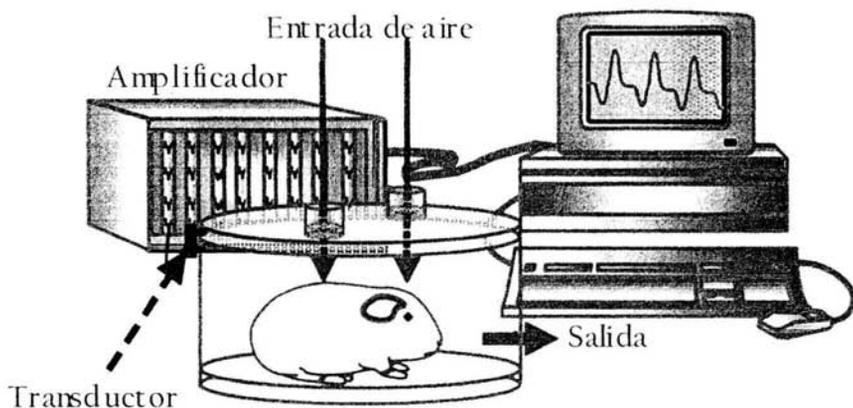


Figura 3. Esquema del equipo de plestismografía barométrica. La cámara de referencia se encuentra en la parte superior de la cámara de registro, donde se encuentra el cobayo, y el transductor de presión diferencial se encuentra conectado a ambas cámaras. Con ayuda de un amplificador, la computadora recibe la señal para ser procesada. Tomado de Chávez 1996.

El plestismógrafo barométrico cuantifica, entre otras cosas, el índice de broncoconstricción (iB), que refleja la obstrucción al flujo aéreo de las vías respiratorias (Hamelmann y col. 1997). Este iB se basa en lo siguiente: en la inspiración el aire que ingresa al tórax se expande más que el aire de la cámara debido al incremento en la temperatura y la humedad dentro del cuerpo del animal. Este fenómeno incrementa la presión de la cámara durante la inspiración. Sin embargo cuando el aire del tórax es eliminado, éste disminuye su expansión debido a que su temperatura y humedad bajan, disminuyendo la presión en la cámara (Drorbaugh y Fenn 1955; Epstein y Epstein 1978). La información obtenida es procesada con un programa computacional que calcula el valor del iB (Fig. 4). El valor del iB es obtenido con la siguiente fórmula:

Te = Tiempo espiratorio (s)

Tr = Tiempo de relajación (s)

PFE = Pico de flujo espiratorio (ml/s)

PFI = Pico de flujo inspiratorio (ml/s)

$$iB = \left(\frac{T_e}{T_r} - 1 \right) \left(\frac{PFE}{PFI} \right)$$

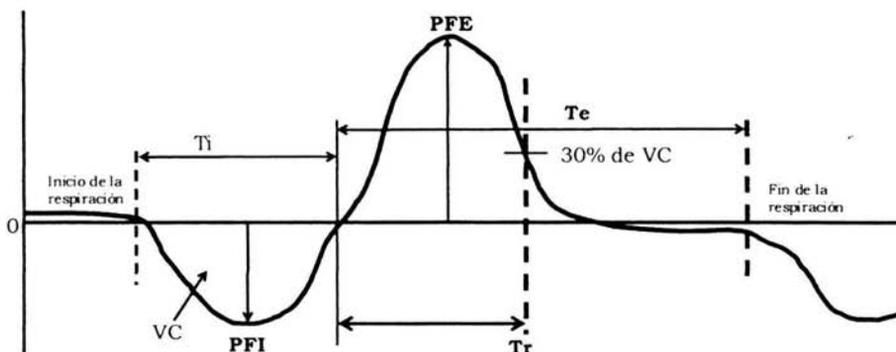


Figura 4. Ejemplo de un ciclo respiratorio obtenido mediante pletismografía barométrica en un animal en libre movimiento. El tiempo de relajación (T_r) es el intervalo de tiempo que transcurre entre el inicio de la espiración y el decremento en el 30% del volumen corriente. VC: volumen corriente, T_e : tiempo espiratorio, PFE: pico de flujo espiratorio y PFI: Pico de flujo inspiratorio.

Debido a que este índice es calculado por el programa en cada una de las respiraciones, los valores evaluados en este estudio se obtuvieron mediante el promedio de los últimos 5 min registrados en períodos de 10 min estudiados. Se incluyeron solamente las respiraciones con volumen corriente mínimo de 1 ml, tiempo mínimo inspiratorio de 0.15 s, tiempo máximo inspiratorio de 3 s y diferencia máxima entre volúmenes inspiratorio y espiratorio de 10%. Se rechazaron aproximadamente entre el 20 a 30% de las respiraciones por cada intervalo de tiempo, mismas que ocurrieron principalmente durante los movimientos voluntarios del animal.

Previamente se ha encontrado que el iB puede ser empleado para caracterizar las respuestas de obstrucción de flujo aéreo en las vías respiratorias ante un estímulo antigénico en cobayos inmunizados (Chand y col. 1993). Se ha visto que esta obstrucción provoca que la espiración sea más prolongada incrementando el valor del iB (Chand y col. 1993; Hamelmann y col. 1997).

En el día 25 se les administró un reto antigénico a los cobayos con aerosoles de 0.5 mg/ml de ovoalbúmina durante 1 min y se registró el íB máximo alcanzado durante 40 min. De acuerdo al plan de sensibilización, únicamente los animales que triplicaron el valor basal de su íB como respuesta al reto antigénico, fueron utilizados en este estudio, ya que hemos observado que existe una gran variabilidad biológica en los animales, y algunos que no responden los días 15 o 25 también dejan de responder en los días subsecuentes. Los animales seleccionados fueron divididos al azar en los siguientes grupos para ser retados con aerosoles de ovoalbúmina (0.5 mg/ml, 1 min) por cada 10 días hasta el día 85:

Grupo Control: Sensibilizado inyectado con SSF (0.6 ml) $n=5$

Grupos Experimentales: Los cobayos se dividieron en 3 grupos:

Grupo 1) 0.15 ml de amortiguador de citratos (0.1 M en total de citratos) $n=5$
(0.75 mg citrato de sodio + 2.25 mg ácido cítrico)

Grupo 2) 0.3 ml de amortiguador de citratos $n=7$
(1.5 mg citrato de sodio + 4.5 mg ácido cítrico)

Grupo 3) 0.6 ml de amortiguador de citratos $n=4$
(3 mg citrato de sodio + 9 mg ácido cítrico)

El amortiguador de citratos se administró vía intramuscular los días 25, 28, 31, 33 y 65. Los días 25 y 65 la administración fue dos horas después del reto con el alérgeno. La concentración del amortiguador de citratos fue de 0.075 M de ácido cítrico y 0.025 M de citrato de sodio (sal trisódica de ácido cítrico) produciendo una solución total de 0.1 M de citratos con un pH de 3.5. La adición de citrato de sodio tuvo como objetivo amortiguar el pH del ácido cítrico para obtener una solución menos ácida.

3. Reactividad a la histamina

En el día 95 los cobayos fueron introducidos nuevamente en el pletismógrafo para administrarles aerosoles de histamina durante 1 min con las siguientes dosis hasta que el íB fuera triplicado (mg/ml): 0.018, 0.032, 0.042, 0.056, 0.074, 0.1 y 0.133. Entre cada dosis se permitió que el íB regresara a su valor basal antes de administrar la siguiente. Una vez que el íB fue triplicado, se les dio un reto con ovoalbúmina (0.5 mg/ml) durante 1 min y se registró el íB máximo. Tres horas después se realizó nuevamente la curva de aerosoles de histamina hasta que se triplicara el íB de cada animal. Este último valor se comparó con el íB de la primera curva para determinar la reactividad de las vías aéreas del cobayo con los diferentes tratamientos.

4. Lavado broncoalveolar

Una vez terminado el registro pletismográfico del día 95, los cobayos se anestesiaron con una sobredosis de 35 mg/Kg de pentobarbital sódico. Posteriormente a través de la sonda endotraqueal se introdujeron 5 ml de SSF estéril a 37°C y al cabo de un minuto se aspiró suavemente hasta recuperar el mayor volumen posible. Esta maniobra se repitió una vez más. El líquido recuperado se centrifugó inmediatamente durante 10 min a 1500 rpm y a 4°C. El botón celular se resuspendió y homogenizó en 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos. Para realizar la cuenta celular total, 10 µl de la suspensión celular se pusieron en un tubo de ensaye que contenía 40 µl de azul de tripan y 10 µl de esta mezcla se colocaron en una cámara de Neubauer donde se contaron 4 cuadros. El número resultante se dividió entre cuatro y éste se multiplicó por 50,000 para obtener el número de células por ml, con lo que la muestra se pudo ajustar con PBS para tener 1×10^6 células/ml, y con estas realizar la cuenta celular diferencial. Para la cuenta diferencial de células, se tomaron 50 µl de la suspensión celular ajustada y se realizó un frotis con una citocentrífuga (Wescor Cytospin, USA) para finalmente teñir las células con la técnica de Romanowsky. Esta tinción se realizó utilizando una mezcla de violeta y azul de metileno con eosina como colorantes principales para dar las siguientes tonalidades: núcleo y plaquetas en púrpura,

eritrocitos en rosa, citoplasma de basófilos en azul, gránulos de basófilos en púrpura-negro, gránulos de neutrófilos en púrpura y gránulos de eosinófilos en rosa-naranja. El conteo diferencial se obtuvo contando 200 células en dos campos diferentes por laminilla. Un grupo de cobayos ($n=5$) no sensibilizados y no tratados con peso aproximado al de un animal sensibilizado día 95 (800-900g) fue utilizado como grupo comparativo en los conteos diferenciales de células.

Experimentos *in vitro*

1. Obtención del tejido traqueal

Algunos cobayos sensibilizados fueron anestesiados en el día 25 con 28 mg/Kg de pentobarbital sódico vía intraperitoneal y desangrados por punción del ventrículo izquierdo del corazón para obtener la traquea. De cada tráquea se obtuvieron preparaciones cilíndricas compuestas de cuatro anillos de las áreas cervical y torácica. Cada preparación traqueal se suspendió en un baño para órganos aislados con solución Krebs (5 ml), mantenida a 37°C y burbujeada con una mezcla de 5% de CO₂/95% O₂ con pH de 7.4. La tensión isométrica se registró a través de un polígrafo Beckman modelo R-612 (USA) vía un transductor de tensión FTO3C (Grass Instruments, USA). Los tejidos se colocaron bajo una tensión de 1 g durante 20 min y se lavaron con solución de Krebs fresca. La composición de la solución de Krebs fue la siguiente (mM): NaCl 120, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2 NaHCO₃ 25, CaCl₂ 2.5, glucosa 11. Para descartar la participación de los productos de la ciclooxigenasa, se añadió indometacina, obteniéndose una concentración final en el baño de 1x10⁻⁶ M. Para normalizar los tejidos se administró KCl 60 mM tres veces consecutivas permitiendo que el tejido se relajara antes de cada administración.

2. Reto antigénico

Una vez estabilizadas las preparaciones de anillos traqueales de los animales sensibilizados, se procedió a realizar un reto único durante 120 min administrando 3.74 µg/ml de ovoalbúmina en el baño de tejidos aislados (Toxqui, 2000). Algunas traqueas se preincubaron con el amortiguador de citratos (2.3 mM) durante 30

min. En otros anillos traqueales se dio un reto de ovoalbúmina (3.74 µg/ml) y una vez que llegaron a su respuesta máxima se realizó una curva acumulativa con diferentes concentraciones del amortiguador de citratos (mM): 0.30, 0.97, 1.72, 2.30. Se eligió como concentración máxima 2.3 mM debido a que en experimentos preliminares se determinó que dicha concentración no modificó el pH fisiológico pues se ha observado que cambios en el pH alteran la contracción del músculo (Naderali y col. 1997; Fabio y Riccardolo 2001).

3. Curvas concentración – respuesta a carbacol e histamina

Para la realización de las curvas acumulativas concentración-respuesta a carbacol se utilizaron tráqueas de animales no sensibilizados. Algunos tejidos fueron incubados previamente con el amortiguador de citratos (2.3 mM) durante 30 min y posteriormente se añadieron de manera acumulativa concentraciones de carbacol (1×10^{-8} – 1×10^{-3} M) o histamina (1×10^{-8} a 1×10^{-3} M). Los resultados se expresaron como porcentaje de la respuesta máxima producida por la tercera respuesta a KCl 60 mM.

Fármacos

Todos los fármacos, salvo los que se indican adelante, se obtuvieron de Sigma (Saint Louis, USA). La indometacina fue disuelta previamente en 1% de Na_2CO_3 (concentración final de Na_2CO_3 0.001%). El hidróxido de aluminio, el cloruro de potasio y el fosfato dibásico de potasio fueron administrados por J.T, Baker (NJ, USA), el pentobarbital sódico de Pfizer (Edo. de México, Mex), la solución salina fisiológica de Baxter (Mor., México), los colorantes para la tinción de Romanowsky de Wescor Cytospin (USA). El amortiguador de citratos esterilizado fue donado por Aspid (D.F., México).

Análisis de datos

Los resultados se evaluaron mediante análisis de varianza de una vía y la significancia estadística entre los grupos se obtuvo con pruebas de comparación múltiple de Dunnett según fuera el caso. Para otras comparaciones se utilizó la prueba t de Student para muestras pareadas y no pareadas según se requiriera. Los valores de $p < 0.05$ bimarjinal fueron considerados como estadísticamente significativos. Algunos datos en los estudio *in vivo* e *in vitro* se expresaron como porcentaje del valor basal del iB y de la respuesta máxima producida por la tercera respuesta a KCl 60 mM respectivamente. La reactividad a la histamina se expresó como dosis provocativa 200. Todos los resultados corresponden al promedio \pm el error estándar.

RESULTADOS

Experimentos *in vivo*

1. Efecto del amortiguador de citratos en el reto con ovoalbúmina

El *iB* máximo alcanzado el día 25 producido por el reto antigénico con ovoalbúmina en los cobayos sensibilizados del grupo control se incrementó $573.98 \pm 108.3\%$ en comparación a la basal obtenida antes del reto ($n=5$, Fig. 5). En los retos subsecuentes, esto es los de los días 35 al 85, las repuestas máximas al alérgeno de este grupo control no se modificaron significativamente en comparación a las del día 25 (Fig. 5). La administración del amortiguador de citratos disminuyó significativamente el *iB* en algunos grupos desde el día 35 ($p<0.01$, Fig. 5 y 6). De las distintas dosis del amortiguador de citratos las que presentaron mayor efecto en la disminución del *iB* durante el reto a la ovoalbúmina fueron las de 0.3 y 0.6 ml ($n=7$ y 4, respectivamente) y la dosis que menor efecto tuvo fue la de 0.15 ml ($p<0.05$, $n=5$, Fig. 5 y 6). En este último grupo se observó que el decremento inicial en el *iB* de los días 45 a 65 se pierde desde el día 75 (Fig. 5).

2. Efecto del amortiguador de citratos en la reactividad

de las vías aéreas a la histamina

Para evaluar la reactividad de las vías respiratorias *in vivo*, se administraron dosis acumulativas (0.018 a 0.133 mg/ml) de aerosoles de histamina para determinar la cantidad de agonista que indujera un aumento de dos veces el valor basal de la *iB* (Dosis provocativa 200%: DP_{200}). En el grupo control el valor basal del *iB* fue triplicado con la dosis de 0.045 ± 0.004 mg/ml, antes del reto con ovoalbúmina y con 0.015 ± 0.007 mg/ml después del reto lo cual indica hiperreactividad de las vías aéreas ($p<0.01$, $n=4$; Fig. 7). El grupo tratado con 0.6 ml de amortiguador de citratos triplicó su *iB* con la dosis de 0.034 ± 0.05 mg/ml antes del reto con ovoalbúmina, y con 0.018 ± 0.01 mg/ml después del reto ($n=4$). En este último grupo, tres cobayos mostraron hiperreactividad y solo uno fue hiporreactor (Fig. 7).

3. Cuentas celulares diferenciales

El tipo celular más frecuente en las vías aéreas de los cobayos del grupo control fueron macrófagos < eosinófilos < epiteliales < neutrófilos < linfocitos. Los animales sensibilizados mostraron un incremento significativo del número de neutrófilos ($p < 0.05$) en comparación con los animales no sensibilizados. El tratamiento con 0.6 ml del amortiguador de citratos no modificó esta neutrofilia (Fig. 8).

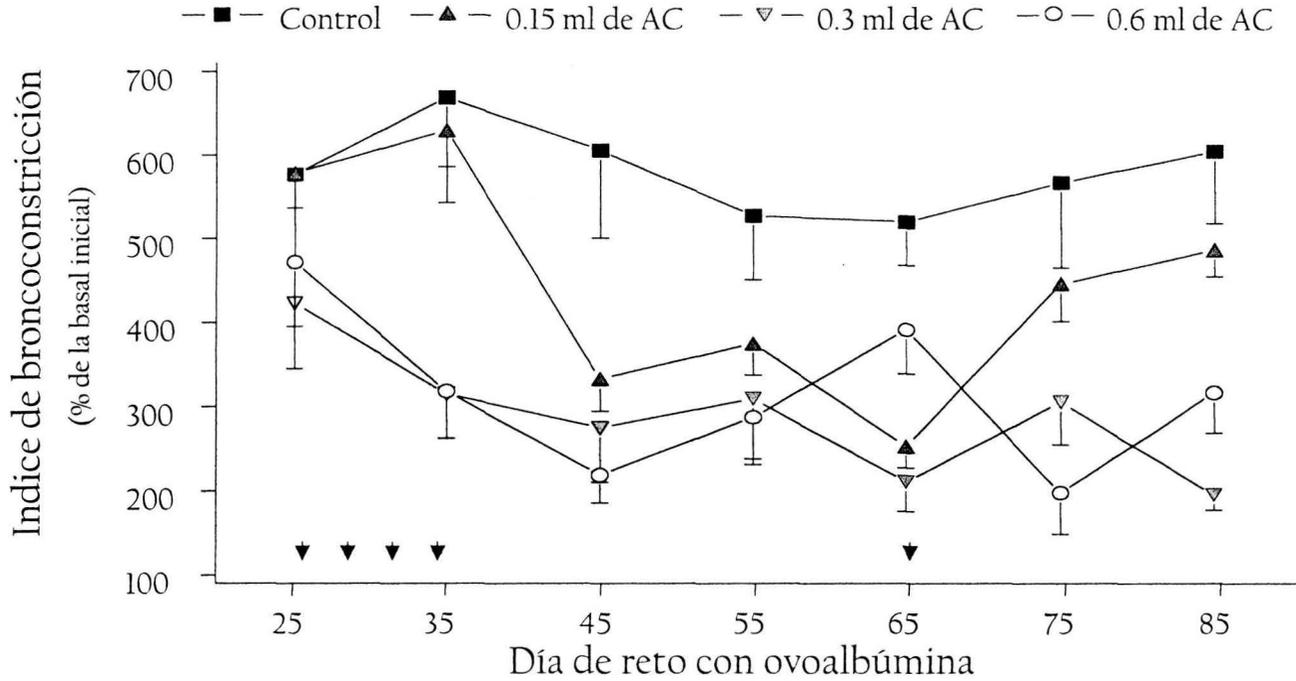


Figura 5. Curso temporal del efecto del amortiguador de citratos en la respuesta máxima del índice de broncoconstricción producido por el reto antigénico (aerosoles de ovoalbúmina, 0.5 mg/ml) en cobayos sensibilizados. Las distintas dosis del amortiguador de citratos se administraron entre los días 25, 28, 31, 33 y 65 como lo muestran las flechas. AC: amortiguador de citratos.

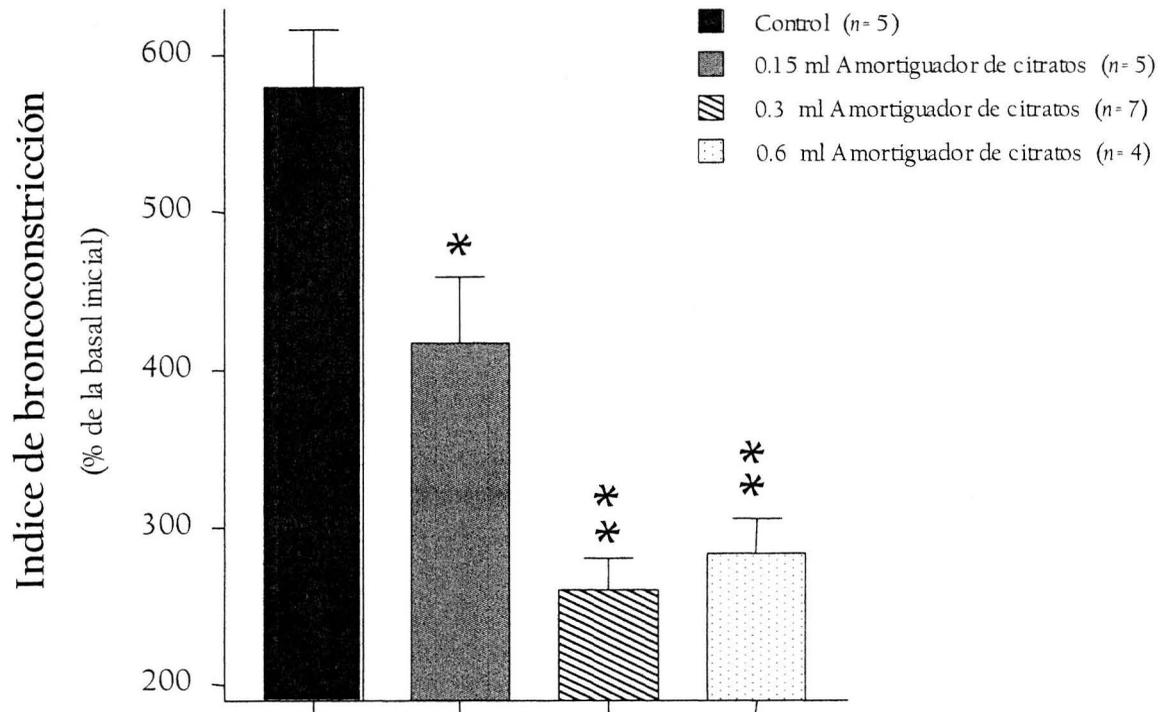


Figura 6. Efecto del amortiguador de citratos en las respuestas máximas producidas por el reto a ovoalbúmina *in vivo*. Las barras representan el promedio de las respuestas de los días 35 al 85 en cada grupo. *,** $p < 0.05$ y $p < 0.01$ en comparación al grupo control.

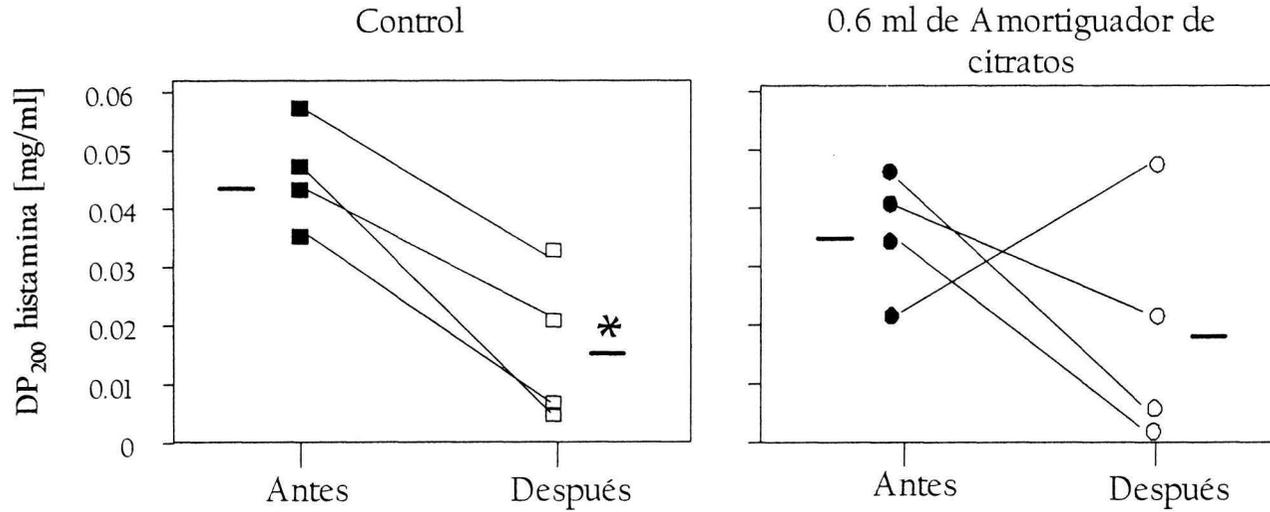


Figura 7. Efecto del amortiguador de citratos en la reactividad de las vías aéreas del cobayo. Antes y después se refieren a antes del reto con ovoalbúmina y después del reto. Las líneas en los extremos de la gráfica indican los promedios de la respuesta. DP₂₀₀: dosis provocativa 200%. *p<0.01.

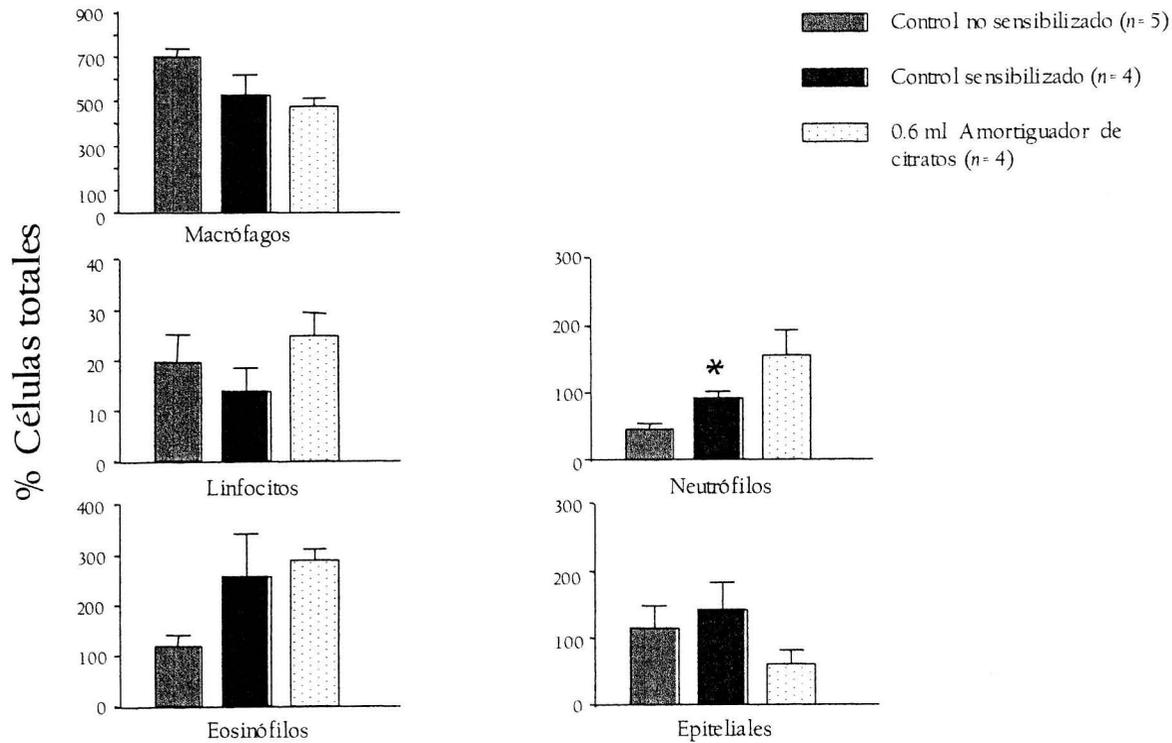


Figura 8. Efecto del amortiguador de citratos en el conteo celular diferencial de las células obtenidas en el lavado broncoalveolar del cobayo. * $p < 0.05$ con respecto al control no sensibilizado vs. control sensibilizado.

Experimentos *in vitro*

1. Reto antigénico

La respuesta máxima al reto con ovoalbúmina (3.74 $\mu\text{g/ml}$) en los anillos traqueales de animales sensibilizados se alcanzó a los 15 min y fue de $106.9 \pm 10.6\%$ de la respuesta máxima observada con KCl ($n=11$, Fig. 9a). Esta respuesta disminuyó en un $29.5 \pm 4.3\%$ a los 120 min (Fig. 9a). La pre-incubación con 2.3 mM del amortiguador de citratos no modificó el curso temporal de esta respuesta (Fig. 9a). En otros anillos traqueales, la adición de dosis acumulativas del amortiguador de citratos (0.30, 0.97, 1.72, 2.30 mM) sobre la respuesta máxima a ovoalbúmina tampoco modificó su curso temporal de la respuesta (Fig. 9b).

2. Curvas concentración-respuesta a carbacol e histamina

La respuesta máxima de la curva concentración-respuesta al carbacol (1×10^{-8} a 1×10^{-3} M) en los anillos traqueales de cobayo se obtuvo con la concentración de 3.2×10^{-6} M ($129.8 \pm 5.8\%$; $n=5$; Fig. 10a). En el caso de la histamina, esta se alcanzó con la concentración de 3.2×10^{-5} M ($128.9 \pm 9.2\%$; $n=4$; Fig. 10b). La pre-incubación con 2.3 mM del amortiguador de citratos no modificó las curvas concentración-respuesta a estos agonistas.

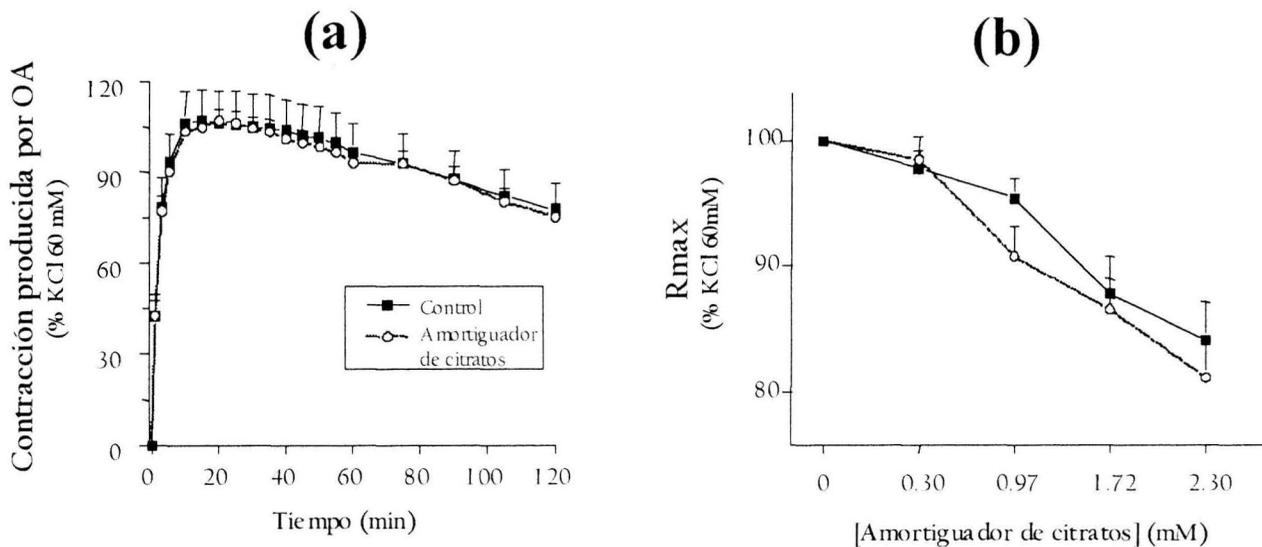


Figura 9. Efecto del amortiguador de citratos en la contracción producida por ovoalbúmina (OA) en el músculo liso de cobayos sensibilizados a esta proteína. (a) Curso temporal de la contracción inducida por OA después de la preincubación (30 minutos) con el amortiguador de citratos (2.3 mM). **(b)** Curva de dosis acumulativas del amortiguador de citratos sobre la respuesta máxima (Rmax) a OA.

Falta página

N° 30

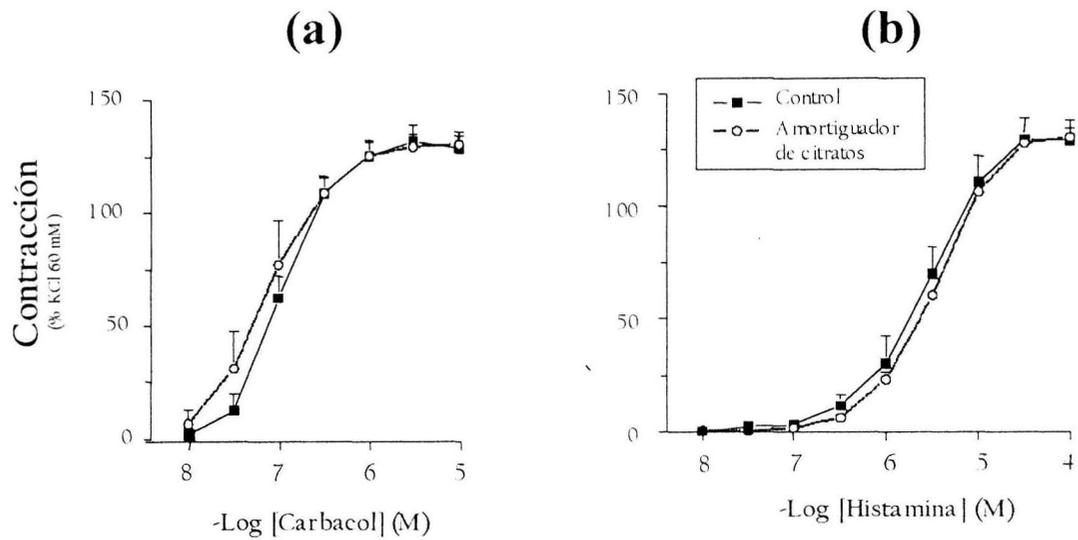


Figura 10. Efecto de la pre-incubación (30 min) del amortiguador de citratos (2.3 mM) sobre las curvas concentración-respuesta producidas por carbacol (a) e histamina (b) en los anillos traqueales de cobayo.

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó el efecto del amortiguador de citratos en la respuesta al reto antigénico de cobayos sensibilizados con ovoalbúmina y encontramos que este fármaco es capaz de disminuir la broncoconstricción, especialmente en las dosis de 0.3 y 0.6 ml (0.1 M). El amortiguador de citratos sólo se administró cuatro veces consecutivas durante una semana con un refuerzo a los 30 días.

La broncoconstricción es producida por la disminución o limitación de flujo aéreo, y después del reto con el alérgeno es resultado principalmente de la contracción del músculo liso, aunque el edema y la hipersecreción de moco entre otros factores también podrían contribuir a la limitación del flujo aéreo (Bousquet 2000; Jeffery 2001; Busse y Rosenwasser 2003).

Para evaluar si el amortiguador de citratos modifica la contracción del músculo liso en los cobayos, se realizaron algunos experimentos *in vitro*. En estos experimentos se observó que la contracción del músculo liso en anillos traqueales, producida por el reto con ovoalbúmina en animales sensibilizados no fue modificada por el amortiguador de citratos. Este fármaco tampoco modificó la respuesta de las curvas aditivas de histamina y carbacol, lo cual sugiere que el amortiguador de citratos no tiene una acción directa sobre la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas.

Se ha demostrado que los citratos pueden promover la producción de NADPH mediante dos vías: una bloqueando a la fosfofructocinasa y la otra acumulando isocitrato (Mallet y Sun 2003). Ambos mecanismos metabólicos podrían proveer el equivalente reductor NADPH para generar GSH (Mallet y Sun, 2003). Debido a que el GSH modula la diferenciación de los linfocitos Th0 hacia Th1 (Peterson y col. 1998; Kidd 2003; Komatzu y col. 2003), esta polarización podría reducir la liberación de moléculas, como la IgE y mediadores pro-inflamatorios de la vía Th2 (Peterson y col. 1998; Kidd 2003). En este trabajo, el tratamiento con el amortiguador de citratos en cobayos sensibilizados redujo la respuesta de

broncoconstricción producida por el reto antigénico. Es posible que esta reducción sea consecuencia del decremento de las células Th2 producido por la cascada de eventos generada por los citratos; sin embargo es necesario diseñar y realizar más experimentos para demostrar esta hipótesis.

La inducción de GSH por los citratos debería proteger al pulmón al eliminar radicales libres y otras ERO resultado de la inflamación inducida por los retos antigénicos. Una manera de evaluar esta posibilidad fue mediante la cuantificación de las células presentes en el LBA. El único tipo celular que se incrementó en los LBA de los animales sensibilizados con el alérgeno fueron los neutrófilos. Se sabe que un incremento transitorio en el número de neutrófilos se produce normalmente después del reto, pero su aumento persistente caracteriza al asma severa donde contribuye fuertemente con la remodelación (Chu y col. 2000; Hellings y 2003). Debido a que el LBA se hizo inmediatamente después del reto con histamina, no sabemos si esta neutrofilia se debió sólo al incremento transitorio observado después del reto, o si está relacionada la severidad del proceso inflamatorio de estos cobayos. Independientemente de este hallazgo, el tratamiento con el amortiguador de citratos no modificó la población de células en el LBA, pues la neutrofilia se mantuvo en los animales tratados.

Se ha determinado que la inflamación crónica así como el estrés oxidativo pudiesen producir cambios permanentes como consecuencia de procesos repetidos de daño y reparación en el tejido que "remodelan" la vía aérea (Wang y col. 2003). Se ha propuesto que esta remodelación es la responsable de que en las vías aéreas se presente hiperreactividad a diversos estímulos (Wang y col. 2003; O'Byrne e Inman 2003; Boulet 2003). En este estudio se observó que la hiperreactividad a la histamina en animales sensibilizados sólo se modificó en uno de los cuatro cobayos tratados con el amortiguador de citratos. Aunque la hiperreactividad no se presentó en todos los cobayos estudiados, estos resultados nos sugieren que el tratamiento con el amortiguador de citratos no tiene efectos

importantes en la reducción del estrés oxidativo, ni en el proceso inflamatorio de las vías aéreas.

De acuerdo a lo anterior, es probable que la disminución en la magnitud de la respuesta al alérgeno producida por el amortiguador de citratos no fue suficiente para evitar la liberación de mediadores que mantienen el proceso inflamatorio responsable de la hiperreactividad.

Con estos resultados concluimos que el amortiguador de citratos es capaz de disminuir la respuesta al reto antigénico de cobayos sensibilizados, no por un efecto directo del fármaco sobre el músculo liso. Adicionalmente, debido a que los citratos no modificaron la hiperreactividad a la histamina *in vivo*, es probable que el efecto del fármaco no se deba a la disminución del proceso inflamatorio en el pulmón. Los efectos del amortiguador de citratos en este modelo podrían explicarse por un decremento en los linfocitos Th2, sin embargo es necesario realizar y diseñar más experimentos para demostrar esta hipótesis.

CONCLUSIONES

El amortiguador de citratos:

- Disminuye la broncoconstricción inducida por el reto antigénico.
- No tiene efectos directos en la contracción del músculo liso de las vías aéreas.
- No modifica el proceso inflamatorio ni la hiperreactividad *in vivo*.

GLOSARIO

Activación: proceso mediante el cual una célula o proteína funcionalmente en reposo es inducida a expresar una o más propiedades biológicas latentes.

Ad libitum: comida a disposición del animal. El animal puede tomar la comida que el desee y a la hora que el quiera.

Adyuvante: cualquier sustancia exógena que al ser introducida a un huésped junto con un alérgeno aumenta la respuesta inmunitaria contra ese alérgeno.

Agonista: sustancia que mimetiza los efectos celulares de un compuesto natural (como una hormona o un neurotransmisor) al unirse al mismo receptor celular y activarlo.

Alérgeno, Antígeno: sustancia que reacciona con anticuerpos o receptores de célula T, desencadenando una respuesta inmunitaria específica.

Alergia: enfermedad o reacción provocada por una respuesta inmunitaria a uno o más antígenos ambientales, que provoca inflamación local y disfunción de un órgano.

Antagonista: sustancia que contrarresta los efectos celulares de un compuesto natural (hormona o neurotransmisor) al unirse al receptor celular del compuesto y bloquear su acción.

Anticuerpo, Inmunoglobulina (Ig): grupo muy diverso de proteínas producidas sólo por células linfoides B que se unen específicamente a determinados antígenos,

Asma: enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas en la que participan muchas células y elementos celulares, en particular células cebadas, eosinófilos, linfocitos T, macrófagos, neutrófilos y células epiteliales. En personas susceptibles, esta inflamación causa obstrucción e hiperreactividad en las vías aéreas, eventos que suelen ser reversibles.

Atopia: estado de hiperreactividad a alérgenos ambientales comunes que está determinado genéticamente y es mediado por anticuerpos IgE.

Broncoconstricción: disminución o limitación del flujo aéreo. Esta limitación de flujo aéreo puede ser el resultado de hipertrofia, hiperplasia, edema e hipersecreción de moco, así como por liberación de mediadores que permiten la contracción del músculo liso de las vías aéreas.

Célula cebada, Mastocito: célula residente de los tejidos de origen hematopoyético que tiene receptores de alta afinidad para IgE; es la célula efectora primaria de las reacciones de hiperreactividad inmediata.

Citocina: cualquiera de un grupo de mediadores polipeptídicos solubles que regulan el crecimiento o la función celular.

Degranulación: proceso mediante el cual se fusionan los gránulos almacenados del citoplasma con la membrana de la superficie celular, descargando de esta manera su contenido y desapareciendo del citoplasma.

Edema: inflamación tisular ocasionada por escape de líquido vascular a celular.

Estallido respiratorio: aumento transitorio en el metabolismo oxidante, que se presenta en células fagocíticas, como los macrófagos después de la fagocitosis.

Fagocitosis: tipo de endocitosis en la cual una célula engloba material en partículas.

Hiperplasia: agrandamiento de células.

Hiperreactividad: respuesta exagerada a estímulos.

Hipersecreción de moco: una respuesta inflamatoria del tejido secretor, contribuyendo a la formación del tapón viscoso que ocluye las vías aéreas.

Hipertrofia: incremento del número de células

Histamina: mediador orgánico secretado por mastocitos que puede producir contracción del músculo liso de las vías aéreas e inflamación.

IgE: clase de inmunoglobulina que constituye el mediador predominante en las regiones de hiperreactividad inmediata.

Índice de broncoconstricción (iB): es el tiempo espiratorio (T_e) dividido entre el tiempo de relajación (T_r), menos la unidad. Multiplicado por el pico de flujo espiratorio (PFE), que divide al pico de flujo inspiratorio (PFI).

$$iB = \left(\frac{T_e}{T_r} - 1 \right) \left(\frac{PFE}{PFI} \right)$$

Inflamación: respuesta que defiende al organismo de infecciones, toxinas o lesiones, ordinariamente abarca una respuesta neutrofílica o inmunitaria junto con cualquier fenómeno defensivo relacionado. Las reacciones neutrofílicas primarias se denominan inflamación aguda; las reacciones principalmente linfoides, de macrófagos, o de ambos tipos, se llaman inflamación crónica.

Inmunización, Sensibilización: inducción natural o artificial de una respuesta inmunitaria, en particular cuando hace que el huésped se proteja de la enfermedad.

Interleucina: cualquier integrante de una familia diversa de citocinas polipépticas, la mayoría de las cuales actúa regulando el crecimiento y las funciones de las células hematopoyéticas.

Leucotrieno: cualquier integrante de un tipo de mediadores orgánicos pequeños de la inflamación, producidos por medio de la vía de la lipooxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico.

Linfocito T: célula linfocítica madura que pertenece a la línea celular dependiente del timo.

Linfocitos B: células linfocíticas maduras que expresan inmunoglobulinas superficiales.

Pletismógrafo barométrico: equipo que realiza una medición directa de la fluctuación de presión que se presenta dentro una cámara donde se encuentra un individuo y se compara con la de una cámara de referencia.

Presentación de antígeno: exhibición del antígeno transformado como un complejo de superficie celular, de modo que puede ser reconocido por los linfocitos T.

Proinflamatorio: que tiende a favorecer la inflamación.

Prostaglandina: cualquier integrante de un tipo de mediadores orgánicos pequeños de la inflamación, producidos por medio de la vía de la ciclooxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico.

Radicales libres: productos normales del metabolismo aeróbico y de la respuesta inflamatoria, están caracterizados por la posesión de uno o más electrones no apareados.

REFERENCIAS

- Abbas A. Cellular and molecular immunology. 4th edition W. B. Saunders, EU 2000.
- Barnes PJ. Pathophysiology of asthma. *Eur Respir Mon* 23: 84-113, 2003.
- Barnes PJ. Reactive Oxygen species in asthma. *Eur Respir Rev* 10: 240-3, 2000.
- Boulet LP. Physiopathology of airway hyperresponsiveness. *Curr Allergy Asthma Rep* 3: 166-71, 2003.
- Bousquet J. Relating inflammatory changes in asthma to clinical status. *Respir Med* 94 (Suppl F): S32-3, 2000.
- Bowman WC, Rand MJ. Farmacología, bases bioquímicas y patológicas: Aplicaciones clínicas. Ed. Interamericana, México D.F., 1984, 20 pp.
- Brinke A, Van Dissel JT, Sterk PJ. Persistent airflow limitation in adult-onset nonatopic asthma is associated with serologic evidence of *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Allergy Clin Immunol* 107: 449-54, 2001.
- Busse WW, Rosenwasser LJ. Mechanisms of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 111(Suppl 3): S799-804, 2003.
- Chand N, Nolan K, Pillas J, Lomask M, Diamatis W, Sofia RD. Aeroallergen induced dyspnea in freely moving guinea pigs: quantitative measurement by bias flow ventilated whole body plethysmography. *Allergy* 48: 230-35, 1993.
- Chávez AJ. Modificación de la función respiratoria inducida por paratiión y su relación con la permeabilidad vascular pulmonar en cobayos. Tesis Licenciatura (Biólogo)-UNAM, Facultad de Ciencias. México, 1996. 52 pp.

Chu HW, Trudeau JB, Balzar SW, Wenzel SE. Pheriferal blood and airways tissue expresión of transforming growth factor β by neutrophil in asthmtic subjets and control subjects. *J Allergy Clin Immunol* 106: 1115-23, 2000.

Chung KF, O'Byrne PM. Pharmacological agents used to treatment of asthma. *Eur Respir Mon* 23: 339-75, 2003.

Collart F, Wens R, Dratwa M. Regional anticoagulation with sodium citrate: chronic utilization in the hemodialysis patient. *Nephrologie* 14: 151-4, 1993.

Comhair SA, Erzurum SC. Antioxidant responses to oxidant-mediated lug diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L246-55, 2002.

Cox G, Jenkins DG. The physiological and ventilatory responses to repeated 60 s sprints following sodium citrate ingestion. *J Sports Sci* 12: 469-75, 1994.

De Boer J, Pouw FM, Zaagsma J, Meurs H. Effects of endogenous superoxide anion and nitric oxide on cholinergic constriction of normal and hyperreactive guinea pig airways. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 1784-9, 1998.

Drorbaugh JE, Fenn WO. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics* 16: 81-7, 1955.

Dworski R. Oxidant stress in asthma *Thorax* 55 (Suppl 2): S51-3, 2000.

Epstein MA, Epstein RA. A theorcal analysis of the barometric meted for measurement of tidal volume. *Respir Physiol* 32: 105-20, 1978.

Expert panel report 2. Guidelines for the diagnosis and management of asthma. National institutes of health national heart, lung and blood institute. Nih publication No. 97-4051 july 1997.

Fabio LM, Ricciardolo MD. Mechanisms of citric acid-induced bronchoconstriction. *Am J Med* 111(Suppl 8A): S18-24, 2001.

Greene LS. Asthma, oxidant stress, and diet. *Nutrition* 15: 899-907, 1999.

Grimble RF. Modification of inflammatory aspects of immune function by nutrients. *Nutr Research* 18: 1297-317, 1998.

Hamelmann EH, Schwarze J, Takeda K. Noninvasive measurement of airways responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 35: 766-75, 1997.

Hatch GE. Asthma, inhaled oxidants, and dietary antioxidants. *Am J Clin Nutr* (Suppl 61): S625-30, 1995.

Hauptfleisch JJ, Payne KA. An oral sodium citrate-citric acid non-particulate buffer in humans. *Br J Anaesth* 77: 642-4, 1996.

Hellings PW, Kasran A, Liu Z, Vandekerckhove P, Wuyts A, Overbergh L, Mathieu C, Ceuppens JL. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 42-50, 2003.

Henderson WR, Chi EY, Teo J, Nguyen C, Kahn M. A small molecule inhibitor of redox-regulated NF- κ B and activator protein-1 transcription blocks allergic airway inflammation in a mouse asthma model. *J Immunology* 169: 524-9, 2002.

Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 72: 847-55, 2002.

Humbert M, Menz G, Ying S, Corrigan CJ, Robinson DS, Durham SR, Kay AB. The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. *Immunol Today*. 20: 528-33, 1999.

Jeffery P. Inflammation and remodeling in the adult and child with asthma. *Pediatr Pulmonol* 21 (Suppl): S3-16, 2001.

Karata K, Verma CS, Wilkinson AJ, Ogura T. Probing the mechanism of ATP hydrolysis and substrate translocation in the AAA protease FtsH by modelling and mutagenesis. *Mol Microbiol* 39: 890-903, 2001.

Keowmaneechai E, McClements DJ. Influence of EDTA and citrate on physicochemical properties of whey protein-stabilized oil-in-water emulsions containing CaCl₂. *J Agric Food Chem* 50: 7145-53, 2002.

Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 8: 223-46, 2003.

Kips J.C. Cytokines in asthma. *Eur Respir J*. 18(Suppl): S24-33. 2001

Komatsu H, Hoshino A, Funayama M, Kawahara K, Obata F. oxidative modulation of the glutathione-redox couple enhances lipopolysaccharide-induced interleukin 12 P40 production by a mouse macrophage cell line, J774A.1. *Free Radic Res* 37: 293-9, 2003.

Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 120: 227-37, 1994.

Ma JY, Ma JK. The dual effect of the particulate and organic components of diesel exhaust particles on the alteration of pulmonary immune/inflammatory responses and metabolic enzymes. *J Environ Sci Health Part C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 20: 117-47, 2002.

Mallet RT, Sun J. Antioxidant properties of miocardial fuel. *Mol Cell Biochem*. 253: 103-11, 2003.

Mannaioni PF, Giannella E, Palmerani B. Free radicals as endogenous histamine releasers. *Agents Actions* 23: 129, 1988.

McNaughton L, Cedaro R. Sodium citrate ingestion and its effects on maximal anaerobic exercise of different durations. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 64: 36-41, 1992.

Medvedeva LV, Popova TN, Artyukhov VG, Matasova LV, Akatova RV. Oxidative status and distribution of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase and aconitate hydratase in rat cardiomyocytes under normal conditions and during ischemia. *Bull Exp Biol Med* 134: 130-4, 2002.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136: 2348-57, 1986.

Murata Y, Shimamura T, Hamuro J. Properties of chlorogenic acid quinone: relationship between browning and the formation of hydrogen peroxide from a quinone solution. *Biosci Biotechnol Biochem* 66: 2525-30, 2002.

Naderali EK, Buttell N, Taggart MJ, Bullock A J, Eisner DA, Wra S. The role of the sarcolemmal Ca^{2+} -ATPase in the pH transients associated with contraction in rats smooth muscle. *J Physiol* 2: 329-36, 1997.

Nishikubo K, Murata Y, Tamaki S, Sugama K, Imanaka-Yoshida K, Yuda N, Kai M, Takamura S, Sebald W, Adachi Y, Yasutomi Y. A single administration of interleukin-4 antagonistic mutant DNA inhibits allergic airway inflammation in a mouse model of asthma. *Gene Ther* 10: 2119-25, 2003.

O'Byrne PM, Inman MD. Airway hyperresponsiveness. *Chest* 123 (Suppl 3): S411-6, 2003.

Oster JR, Stemmer CL, Perez GO, Vaamonde CA. Comparison of the effects of sodium bicarbonate versus sodium citrate on renal acid excretion. *Miner Electrolyte Metab* 14: 97-102, 1988.

Parvez S, Shahid R, Ahmed MN, Rajoka MI. Chapter 10: Influence of Ammonium Concentration on Citric Acid and Biomass Production from Sugarcane-molasses by 2-Deoxy-D-glucose-Resistant Mutant Strain of *Aspergillus niger*. Ed. Industrial and Environmental Biotechnology Horizon Scientific Press Centre for Molecular Genetics, University of Karachi, Karachi-75270, Pakistan September 2001.

Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh. Glutathione levels in antigen-presenting cell modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Natl Acad Sci* 95: 3071-6, 1998.

Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J* 16: 534-54, 2000.

Seaton A, Godden DJ, Russell G. Diet. *Eur Respir Mon* 15: 412-28, 2000.

Sharma AM, Cetto C, Schorr U, Spies KP, Distler A. Renal acid-base excretion in normotensive salt-sensitive humans. *Hypertension* 1993 22: 884-90, 1993.

Sollmann T. Farmacología y sus aplicaciones a la terapéutica y a la toxicología. Ed. Salvat editores, Barcelona España, 1955, 216-1219 p.

Toxqui TE. Efecto de *Galphimia glauca* en las vías aéreas del cobayo: propiedades antialérgicas. Tesis de Licenciatura (Biólogo)- UNAM, Facultad de Ciencias. México, 2000. 62pp.

Venarske D, DeShazo RD. Molecular mechanisms of allergic disease. *South Med J* 96: 1049-54, 2003.

Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, Bonsignore G. Airway remodeling in asthma. *Chest* 123 (Suppl 3): S417-22, 2003.

Wang L, McParlant B, Paré P. The functional consequences of structural changes in the airways. *Chest* 123(Suppl): S356-62, 2003

Wood LG, Gibson PG, Garg ML. Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma. *Eur Respir J* 21: 177-86, 2003.

World Health Organization (WHO). Bronchial Asthma. Fact Sheet N° 206 Revised January 2000.

Wu Z, Turner DR, Oliveira DB. IL-4 gene expression up-regulated by mercury in rat mast cells: a role of oxidant stress in IL-4 transcription. *Int Immunol* 13: 297-304, 2001.

Yáñez R, Ceballos G. Inflamación en la reacción alérgica. En "Asthma Bronchial concepto moderno", editado por José Luis Cortés Cortés. Instituto Politécnico Nacional y Fondo de Cultura Económica, 2000.