



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"EFECTO DE LA COLAGENA POLIMERIZADA EN UN
MODELO DE SENSIBILIZACION CRONICA EN LAS
VIAS AEREAS DE 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 :

MORENO ALVAREZ PAOLA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. BLANCA MARGARITA VAZAN PERKINS



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

MEXICO, D. F.

2004



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**





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: Paola Moreno Alvarez

FECHA: 25 - 03 - 2004

FIRMA: Paola Moreno Alvarez

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 de la colágena polimerizada en un modelo de sensibilización crónica en las vías aéreas de cobayo".

realizado por Moreno Alvarez Paola

con número de cuenta 09958069-0, 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. Laila Gutiérrez Kobeh

Suplente

M. en C. Enrique Moreno Saézn

Suplente

Dr. Fernando Edgar Kröttsch Gómez

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

Juan Manuel Rodríguez Chávez
 M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



Agradecimientos

Principalmente a mis padres, Rocío y Salvador, así como a mis hermanos Abigail y César.

A Ericka y Lupita del Departamento de Morfología del INER por su ayuda con el procesamiento de los tejidos.

A Diana, Brenda y César del Laboratorio de Enfermedades Crónico Degenerativas del INER por su apoyo con la técnica de inmunohistoquímica.

A la Dra. Blanca y Edgar S. por su ayuda, no solo con este proyecto.

A todas las personas que laboran en el Laboratorio de Investigación en Asma: a Vero, José Luis, Edgar, Toñita, Eduardo, Paty S., Paty C. y Betina.

A la Dra. Gutiérrez, al M. en C. Moreno, al M. en C. Arreola y al Dr. Kröttsch por su consejos.

A mis amigos: Felipe, Alfonso, Nancy, Edgar, Daniel y Yoatzin.

Y a toda la familia Alvarez Barrón

Dedicó mi esfuerzo y mi trabajo a la memoria de la persona que siempre iluminó mi camino, mi abuelita Bito.

Índice

Resumen.....	1
Introducción.....	2
La Inflamación.....	2
La Inflamación de las vías aéreas durante el asma.....	5
Proceso de sensibilización al alérgeno en las vías aéreas.....	7
Respuesta inflamatoria aguda en las vías aéreas.....	10
Respuesta inflamatoria crónica en las vías aéreas.....	11
El tratamiento farmacológico en el asma.....	14
La colágena polivinilpirrolidona.....	14
Planteamiento del problema.....	16
Hipótesis.....	16
Objetivo General.....	16
Objetivos Particulares.....	16
Material y métodos.....	17
Animales.....	17
Esquema de sensibilización.....	17
Análisis de la función respiratoria.....	17
Administración de C-PVP.....	20
Lavado bronquioalveolar y conteo celular.....	20
Inmunohistoquímica.....	21
Fármacos.....	22
Análisis de datos.....	22
Resultados.....	23
Análisis de la broncoconstricción.....	23
Conteo celular total y diferencial.....	25
Expresión de TNF- α	30
Discusión.....	33
Referencias.....	38

Abreviaturas

AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
APC	Célula presentadora de antígeno
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
COX ₂	Ciclooxigenasa inducible
C-PVP	Colágena polivinilpirrolidona
ECP	Proteína cationica de eosinófilos
EDN	Neurotoxina derivada de eosinófilos
EPO	Peroxidasa de eosinófilos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IgE	Inmunoglobulina E
IL-	Interleucina-
INF- γ	Interferón gamma
iNOS	Oxido nítrico sintetasa inducible
LBA	Lavado bronquioalveolar
LFA-1	Antígeno asociado a la función del leucocito-1
LT	Leucotrienos
MBP	Proteína básica principal
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1
MHCII	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II
MIP-1 β	Proteína inflamatoria de macrófagos-1 β
NF κ B	Factor nuclear kappa B
OA	Ovoalbúmina
PAF	Factor activador de plaquetas
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGD ₂	Prostaglandina D2
RANTES	Quimiocina regulada en la activación, expresada y secretada por células T
ROs	Radicales libres del oxígeno
SSI	Solución salina isotónica
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
Th	Células T cooperadoras
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TX-A ₂	Tromboxano A2
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular-1
VLA-4	Antígeno de activación muy tardía-4
WHO	World Health Organization

Resumen

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta a las vías aéreas. Los factores que contribuyen a esta inflamación son múltiples e involucran una variedad de células inflamatorias, entre las cuales se encuentran eosinófilos, linfocitos T, mastocitos, macrófagos y neutrófilos. Adicionalmente, los numerosos mediadores pro-inflamatorios liberados durante las crisis de asma ocasionan daños severos en las vías aéreas que llegan a ser irreversibles si la inflamación es persistente. Es por esto que uno de los principales tratamientos utilizados para controlar al asma sea el uso de agentes antiinflamatorios.

Recientemente se ha demostrado que la colágena polivinilpirrolidona, o colágena polimerizada, tiene propiedades inmunomoduladoras en procesos inflamatorios crónicos como la artritis reumatoide, la escleroderma y las cicatrices hipertróficas. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la colágena polimerizada en la inflamación crónica de las vías aéreas de cobayos, previamente sensibilizados a ovoalbúmina (OA), ocasionada por el reto antigénico. La broncoconstricción durante los retos con OA fue registrada utilizando un pletismógrafo barométrico para animales en libre movimiento y este reto se realizó los días 25, 35, 45, 55 y 65 después de que la sensibilización fue iniciada. Algunos cobayos fueron nebulizados durante 2 min con aerosoles conteniendo 0 (grupo control), 1.4, 2.8, 5.6 mg/ml de colágena polimerizada ($n=5$, respectivamente) o con el vehículo del fármaco (amortiguador de citratos 0.01 M, $n=5$), cada 5 días desde el día 25 hasta el 60. En el día 65, los cobayos se anestesiaron profundamente para realizar el lavado bronquioalveolar y obtener el lóbulo pulmonar caudal izquierdo.

Observamos que ninguno de los tratamientos con la colágena polimerizada, o el vehículo, modificó la respuesta máxima de broncoconstricción durante los retos con OA. Las células del lavado bronquioalveolar de los controles mostraron cambios significativos, con respecto a un grupo adicional de cobayos no sensibilizados y no tratados ($n=5$), como el incremento en el número de eosinófilos ($p<0.01$) y la disminución del número de macrófagos ($p<0.01$). Ambos cambios fueron revertidos por el tratamiento con 5.6 mg/ml de colágena polimerizada. El análisis de los cortes histológicos de los animales control mostraron, en comparación con el grupo de animales no sensibilizados y no tratados, una alta expresión del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α ; determinada por ensayo inmunohistoquímico) en células epiteliales, macrófagos y granulocitos. El tratamiento con 5.6 mg/ml de colágena polimerizada redujo la expresión del TNF- α en macrófagos y granulocitos ($p<0.05$) pero no en las células epiteliales. En conclusión, se necesitan más estudios en un futuro para determinar el efecto general de la colágena polimerizada en la inflamación crónica de las vías aéreas y su posibilidad de su uso como unidad terapéutica en el asma.

Introducción

La Inflamación

La inflamación es la respuesta biológica del sistema inmunológico que se produce como defensa hacia algún daño o infección en los tejidos. Consiste principalmente en la incorporación de leucocitos (neutrófilos, monocitos, basófilos, eosinófilos y linfocitos) dentro del sitio de infección o daño y de su activación para la eliminación del agente infeccioso. Asimismo, el proceso inflamatorio es iniciado, regulado y eliminado por las acciones de numerosos mediadores pro-inflamatorios liberados por las células inflamatorias: citocinas, quimiocinas y mediadores lipídicos (Rosenberg et al., 1998; Abbas et al., 2000; Yáñez et al., 2000). Las citocinas son pequeñas proteínas secretadas normalmente después de un estímulo activador que inducen respuestas mediante la unión a receptores específicos. Las quimiocinas constituyen una clase de citocinas que poseen propiedades quimiotácticas, al inducir la migración de células con el receptor apropiado hacia la fuente de la quimiocina. Los mediadores lipídicos como los leucotrienos (LT), los tromboxanos y las prostaglandinas son producidos por la oxidación enzimática del ácido araquidónico (Janeway et al., 2003).

La inflamación como tal puede dividirse en dos respuestas principales: la inflamación aguda y la inflamación crónica. La inflamación aguda es la respuesta inmediata, corta y relativamente uniforme a un daño caracterizada por la formación de edema, el aumento en la concentración de proteínas plasmáticas y la liberación de citocinas de fase aguda como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina (IL)-1 β y otros factores quimiotácticos (Rosenberg et al., 1998; Abbas et al., 2000; Kips, 2001; Goldsby et al., 2003). En cambio, la inflamación crónica es la respuesta hacia el daño persistente con consecuencias perjudiciales hacia el organismo. Es identificada por la persistencia del daño celular y por el proceso de reparación constante donde aumentan los mediadores pro-inflamatorios, las células en el sitio proliferan y producen una matriz que aporta un soporte estructural y nutritivo a la lesión.

Las características principales de una respuesta inflamatoria son calor, dolor, tumor y enrojecimiento debido a los mediadores pro-inflamatorios liberados al actuar sobre los

vasos sanguíneos locales. Estos mediadores provocan el aumento en el diámetro de los vasos, conocido como vasodilatación y un incremento en la permeabilidad vascular. Esto resulta en un aumento en el flujo sanguíneo, que permite la acumulación de líquido plasmático en el tejido y la migración de leucocitos al sitio del daño (Janeway et al., 2003).

La incorporación de las células inflamatorias involucra una serie de cambios en los leucocitos y en las células endoteliales que están mediados por las interacciones entre moléculas de adhesión del endotelio y sus receptores específicos en los leucocitos. Cuando ocurre el daño, se liberan al medio extracelular varias citocinas y otros mediadores (TNF- α , IL-1 β , IL-8, histamina, etc.) que actúan en los vasos sanguíneos activando a las células endoteliales e induciendo la expresión de las moléculas de adhesión.

Los leucocitos circulantes llegan a ser ligeramente adherentes al endotelio activado mediante interacciones de baja afinidad entre un grupo de glicoproteínas que se unen a grupos carbohidratos específicos denominadas selectinas. Ésta familia de glicoproteínas incluye tres tipos de moléculas: las L-selectinas, encontradas en la mayoría de los leucocitos y las E- y P-selectinas que se encuentran en células endoteliales. Las primeras en expresarse son las E- y P-selectinas que reconocen e interaccionan con las L-selectinas y con carbohidratos específicos (como el sialil Lewis^x) del leucocito. Esta interacción, junto con los cambios en el flujo sanguíneo inducidos por la contracción y la dilatación de los vasos sanguíneos, hace que los leucocitos comiencen a rodar por la superficie endotelial (Abbas et al., 2000, Janeway et al., 2003). Mientras los leucocitos se van deslizando, llegan a unirse firmemente a éste por medio de las moléculas de adhesión intercelular (ICAMs) pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, entre las que se encuentran la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1). Estas ICAMs son el sitio de unión de las integrinas en los leucocitos. Las integrinas son proteínas heterodiméricas que facilitan la adherencia de los leucocitos al endotelio y a otras interacciones intercelulares (por ejemplo el antígeno asociado a la función del leucocito-1 (LFA-1) y el antígeno de activación muy tardía-4 (VLA-4)). La adhesión estable por medio de las integrinas es ayudada por quimiocinas

unidas al endotelio que ocasionan cambios conformacionales en las integrinas, aumentando sus propiedades adhesivas.

Finalmente, el leucocito recibe señales que permiten su migración a través de las uniones intercelulares del endotelio por medio de integrinas y moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas. La migración o diapédesis se da por interacciones entre selectinas y carbohidratos e integrinas y moléculas de matriz extracelular para extenderse a lo largo del andamiaje de la matriz extracelular. Esta migración ocurre preferentemente hacia gradientes de quimiocinas y otros factores quimiotácticos ubicados en el medio (Abbas et al., 2000; Janeway et al., 2003; Goldsby et al., 2003; Fig. 1). Entre los principales leucocitos que participan en este proceso durante la inflamación están los neutrófilos, los macrófagos, los eosinófilos, los mastocitos, así como los linfocitos.

Los neutrófilos son granulocitos que pueden fagocitar partículas extrañas y que igualmente contienen gránulos citoplasmáticos que incluyen diversos mediadores pro-inflamatorios, entre los que se encuentran una gran variedad de enzimas (mieloperoxidasas, gelatinasas, colagenasas, lisozimas, elastasa, fosfatasa alcalina, etc.), LT como el LTB₄ y el LTC₄, el factor activador de plaquetas (PAF), el tromboxano (TX)-A₂, y diversas citocinas como TNF- α , IL-1 β y quimiocinas como IL-8, además de radicales libres del oxígeno y del nitrógeno (Rosenberg et al., 1998).

Los macrófagos son fagocitos mononucleares que migran a los tejidos participando en la inflamación y la reparación del tejido. Son capaces de fagocitar y liberar mediadores pro-inflamatorios y proteínas antimicrobianas. Modulan la inflamación a través de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12), LT, PAF, quimiocinas (proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 β , proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1, IL-8), etc. También están involucrados en la regulación de la reparación del tejido dañado mediante la liberación de enzimas, citocinas como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) o el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Rosenberg et al., 1998; Abbas et al., 2000).

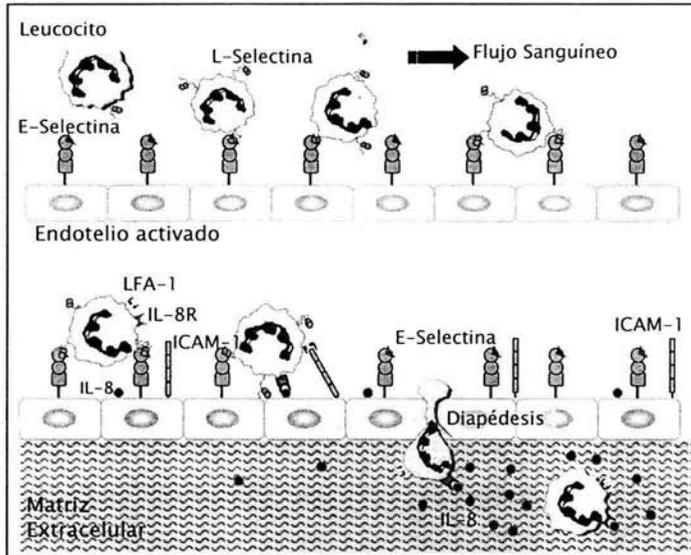


Figura 1. La migración de los leucocitos al sitio de daño esta mediado por factores quimiotácticos y moléculas de adhesión. IL-8R: receptor de interleucina 8. Tomado de Janeway et al., 2003.

Los eosinófilos, son granulocitos reclutados en los sitios de inflamación aguda y se encuentran principalmente en respuesta a alérgenos dermatológicos, gastrointestinales, respiratorios o en una infección generalizada con parásitos helmintos (Rosenberg et al., 1998). Secretan varias proteínas y mediadores lipídicos incluyendo LTC_4 , $-D_4$, y $-E_4$, PAF y varias proteínas básicas como la proteína básica principal (MBP), neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN), proteína catiónica de eosinófilos (ECP) y peroxidasa de eosinófilos (EPO), citocinas como $TNF-\alpha$, IL-4, IL-5, IL-6, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y quimiocina regulada en la activación, expresada y secretada por células T (RANTES), (Humbert et al., 2003; Barnes, 2003).

La Inflamación de las vías aéreas durante el asma

Las vías aéreas son los conductos que dirigen el aire hacia las regiones de intercambio gaseoso. Estas vías están compuestas de tubos ramificados que se vuelven cada vez más estrechos, más cortos y más numerosos a medida que penetran profundamente en el

pulmón (West, 2002). En el humano, y en general en los mamíferos, las vías aéreas se pueden dividir en superiores e inferiores. Las vías aéreas superiores están formadas por la boca, faringe, laringe y tráquea. Las inferiores constan principalmente de bronquios y bronquiolos. Posteriormente los bronquiolos terminan en sacos aéreos donde se encuentran los racimos de alvéolos en los cuales se realiza el intercambio de gases con la sangre. De manera general, las vías aéreas constan de una capa interna epitelial, una capa externa de tejido conectivo y una capa media donde se pueden encontrar los anillos cartilagosos de la traquea y bronquios, y las fibras musculares lisas (Ville, 1996).

Las vías aéreas son susceptibles a varias infecciones y enfermedades entre las que se encuentra el asma. Basada en su fisiopatología, el asma se define como una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas en la cual participan principalmente mastocitos, eosinófilos y linfocitos T. En individuos susceptibles, esta inflamación causa episodios recurrentes de dificultad en la respiración, presión torácica, sibilancias y tos principalmente en la noche y por la mañana. Estos síntomas están usualmente asociados a una obstrucción variable del flujo de aire, llamada broncoconstricción, que puede ser parcialmente reversible ya sea espontáneamente o con tratamiento.

La Organización Mundial de la Salud reconoce al asma como una enfermedad de primordial importancia en la salud pública. En el mundo, entre 100 a 150 millones de personas padecen de asma y llegan a fallecer anualmente 180,000 personas por casos severos. Además estas cifras están en aumento (WHO Fact Sheet, 2000). En México no se dispone de datos exactos, sin embargo se calcula existe una población de entre 5 y 10 millones de asmáticos en el país. En el 2002, el 32.5% de los casos ingresados al servicio de urgencias del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) fueron causados por asma (Informe de labores INER, 2002).

Existen varias clasificaciones sobre el tipo de asma que puede presentar un individuo dependiendo de sus síntomas y la frecuencia de éstos, pero de manera general se puede dividir al asma en extrínseca e intrínseca. El asma extrínseca puede estar relacionada con una predisposición genética para una respuesta de hipersensibilidad inmediata o respuesta de tipo I ante una extensa gama de estímulos ambientales como el frío, polen,

polvo, etc. En esta forma atópica se producen inmunoglobulinas E (IgE) principalmente, para más de un antígeno o alérgeno (Humbert et al., 1999), antes de que esto ocurra, existen una serie de procesos denominados de *sensibilización* al alérgeno en las vías aéreas, que ocasionan los síntomas del asma alérgica (Holt et al., 1999).

El asma intrínseca, no atópica o no alérgica, ocurre en personas sin evidencias de atopia y en algunos casos está asociada a una activación anormal de linfocitos T, lo que genera una reacción de hipersensibilidad tardía y con características de enfermedad autoinmune. En el asma no atópica al parecer no hay sensibilización a un alérgeno en específico y la inflamación es ocasionada por estímulos ambientales muy variados como la inhalación de químicos, infecciones virales, factores genéticos, etc. (Humbert et al., 1999).

Proceso de sensibilización al alérgeno en las vías aéreas

El desarrollo de una enfermedad alérgica como el asma depende de la interacción entre los genes y los factores ambientales que desencadenan la enfermedad (Holloway et al., 2003). En la condición alérgica, el primer contacto con el alérgeno se da por medio de células presentadoras de antígeno, principalmente por las células dendríticas inmaduras que se encuentran a lo largo del árbol traqueobronquial. Estas células se encargan de fagocitar el antígeno y degradarlo en su interior para presentarlo por medio del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHCII, por sus siglas en inglés) en su superficie. Cuando una célula dendrítica captura un antígeno extraño, madura y se convierte en una célula presentadora de antígeno profesional (APC) capacitada para activar a los linfocitos. Las APC migran hacia los nódulos linfáticos donde entran en contacto con linfocitos tipo T *naïve* o vírgenes a través de receptores B7 y MHCII por parte de las APC y los receptores CD28, CD4 y el receptor de la célula T en los linfocitos con el propósito de activarlos (Fig. 2). Estas células T proliferan creando una clona específica para el antígeno y posteriormente comienzan un proceso de diferenciación donde pueden convertirse en células de memoria o en células efectoras (Abbas et al., 2000; Janeway et al., 2003).

Las células T efectoras forman dos subpoblaciones importantes en la respuesta inmune. Estas células se forman dependiendo de las concentraciones de citocinas liberadas en el medio ya sea por las APC o por las propias células T y se distinguen principalmente por el

patrón de mediadores que producen. Cuando esta presente la IL-4 se forman las células cooperadoras (helper) tipo 2 (Th2) que liberan IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10; y cuando hay IL-12 se forman las células cooperadoras tipo 1 (Th1) que producen IL-2, INF- γ y TNF- β (Germain, 1998; Abbas et al., 2000; Fig. 2). Las altas concentraciones de IL-4 en individuos susceptibles hacia una respuesta atopica ocasionan que el desarrollo de las células T activadas se dirija en su mayoría hacia el subtipo Th2, ocasionando el desbalance entre éstas dos subpoblaciones (Janeway et al., 2003).

El grupo de células Th2 también estimula la activación de las células B a través de dos señales principales: una por la interacción de receptores CD40L en células T y CD40 en células B y la otra por la secreción de las IL-4 e IL-13, induciendo la producción de IgE cuando las células B se transforman en células plasmáticas (Broide, 2001; Frew, 2003; Fig. 2). Las IgE producidas se unen a sus receptores de alta (Fc ϵ RI) y baja (Fc ϵ RII) afinidad encontrados en mastocitos, eosinófilos, monocitos y macrófagos de las vías aéreas (Yáñez et al., 2000; Busse et al., 2001). Estos receptores cuando son activados por la unión del antígeno a la IgE inducen señales de degranulación en las células que los presentan, produciendo la liberación del contenido de los gránulos o vesículas citoplasmáticas en los cuales se almacenan mediadores (citocinas, LT, quimiocinas, etc.) responsables de producir varios efectos, a corto o a largo plazo. Entre estos efectos están la modulación de la permeabilidad vascular, la estimulación de secreción de moco, los cambios en el tono del músculo liso de vías aéreas, la activación de terminales nerviosas y la inducción de cambios estructurales en las vías aéreas, entre otros (Horwitz et al., 1995; Busse et al., 2002; Goldsby et al., 2003).

A pesar de mostrar características clínicas diferentes, tanto el asma no atopica como la atopica comparten mecanismos inmunopatológicos comunes. En la condición no atopica existe evidencia de la expresión de receptores de alta afinidad a IgE, a IL-4 e IL-13 en las células presentes en las vías aéreas (Humbert et al., 1999). En ambos casos las células T dirigen la inflamación crónica (Humbert et al., 1996) por la liberación de citocinas tipo Th2 (Kips et al., 2000; Yáñez et al., 2000; Broide, 2001; Barnes, 2003), como las IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 y GM-CSF, entre otras (Benoist et al., 1998; Kips et al.,

2000), controlando la producción, la activación y la incorporación de los leucocitos a las vías aéreas.

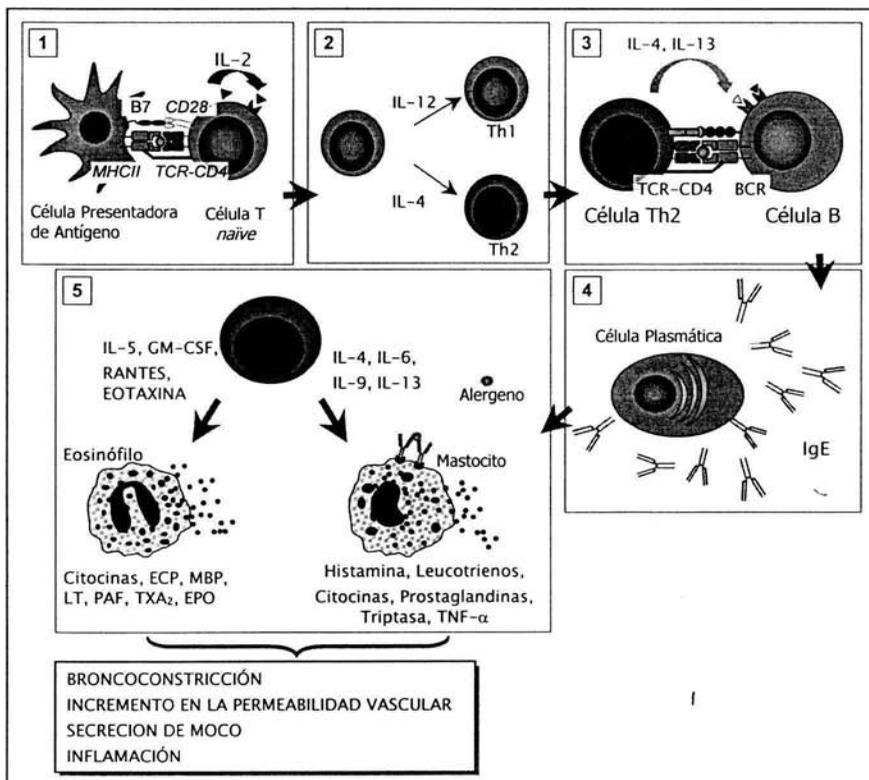


Figura 2. Fase de sensibilización al alérgeno en las vías aéreas de individuos susceptibles. El desarrollo de las células Th2 en el asma involucra la presentación del alérgeno por parte de las células presentadoras de antígeno en los nódulos linfáticos a las células T *naive* (1). El desarrollo de estas se divide en dos subtipos Th1 y Th2 (2). La predominancia de Th2 en el asma ocasiona la activación de células B y la producción de IgE por las células plasmáticas (3,4). Además, la liberación de citocinas de tipo Th2 induce la incorporación, la activación, la sobrevivencia y la degranulación de los leucocitos que ocasionan los síntomas del asma (5). TCR: receptor de la célula T, BCR: receptor de la célula B. Tomado de Marone (1998) y Holgate (1999).

Respuesta inflamatoria aguda en las vías aéreas

La respuesta aguda en el asma alérgica es ocasionada por la degranulación de las células inflamatorias (mastocitos, neutrófilos y eosinófilos) originada por la unión del alérgeno con la IgE (Horwitz et al., 1995; Broide, 2001), provocando la broncoconstricción y la incorporación de células inflamatorias.

Los mastocitos son los iniciadores de la respuesta aguda alérgica al provocar la broncoconstricción por la liberación de histamina, la prostaglandina (PG)-D₂ y los LT almacenados en sus gránulos intracelulares (Holgate, 1999; Holt et al., 1999; Yáñez et al., 2000; Hart, 2000; Barnes, 2003; Humbert et al., 2003). Adicionalmente, los mastocitos liberan triptasa, una enzima pro-inflamatoria que potencializa la broncoconstricción inducida por la histamina y mediadores como el TNF- α , que regula la expresión de moléculas de adhesión y facilita la incorporación de células inflamatorias, las IL-4 e IL-13 que regulan las citocinas Th2 y la IL-5 que es un factor implicado en la producción, maduración y activación de eosinófilos (Hart, 2000; Kips, 2001). En suma, una importante consecuencia de la degranulación de los mastocitos es la dificultad de respirar debido a la contracción del músculo liso, la secreción de moco, la inflamación de las mucosas respiratorias, la exudación y la acumulación de plasma en el lumen de las vías aéreas (Yáñez et al., 2000).

La etapa siguiente en el asma es conocida como respuesta de fase tardía y ocurre horas después de la reacción aguda (Murphy et al., 1997; Holgate, 1999; Humbert et al., 2003). Ésta se caracteriza por la atracción y activación de células inflamatorias como eosinófilos y neutrófilos principalmente, la producción de citocinas Th2 y el desarrollo de una reacción inflamatoria dentro de las vías aéreas (Horwitz et al., 1995; Kips, 2001; Humbert et al., 2003).

Los eosinófilos activados en el asma inducen la mayoría de los trastornos en las vías aéreas características de esta enfermedad. Su incorporación y su activación selectiva son características principales de esta condición, ya sea alérgica o no alérgica (Holgate, 1999). Los eosinófilos se han visto involucrados en la contracción del músculo liso, la hipersecreción de moco, la hiperreactividad, la permeabilidad vascular y el desprendimiento epitelial (Humbert et al., 2003) por la liberación de IL-5, RANTES, LTC₄,

LTD₄, y LTE₄, el PAF y varias proteínas básicas (Humbert et al., 2003; Barnes, 2003). Los neutrófilos, se encuentran involucrados en el asma por ser las primeras células en llegar a las vías aéreas y por liberar mediadores que participan en la contracción del músculo liso bronquial como el LTB₄, el PAF, el tromboxano (TX)-A₂, en la hiperreactividad (TNF- α , LTB₄, PAF), en el incremento en la adherencia endotelial, la quimiotaxis y la activación de leucocitos (TNF- α , IL-1 β , PAF, LT) (Rosenberg et al., 1998; Barnes, 2003; Humbert, 2003).

Respuesta inflamatoria crónica en las vías aéreas

La fase crónica de la inflamación incluye la acumulación de macrófagos y linfocitos, además del crecimiento de fibroblastos y del tejido vascular. Muchos de estos cambios representan componentes del proceso de reparación, que pueden causar anomalías en las vías aéreas (Rosenberg et al., 1998; Abbas et al., 2000; Yáñez et al., 2000; Fig.3).

En el proceso crónico, los macrófagos pueden estar involucrados en la obstrucción de las vías aéreas y la regulación de la inflamación a través de la liberación de numerosos mediadores (citocinas, LT, PAF, etc.), además contribuyen extensamente en la reparación del tejido dañado e igualmente en la formación de la fibrosis (Rosenberg et al., 1998; Abbas et al., 2000; Kips, 2000; Barnes, 2003; Humbert et al., 2003). En esta fase crónica el aumento de células y mediadores induce la remodelación de la pared de la vía aérea, resultando en varias alteraciones estructurales (Kips, 2000; Barnes, 2003), como la hipertrofia e hiperplasia del músculo liso bronquial, aumento de las glándulas mucosas, engrosamiento de la membrana basal por el depósito de colágeno, incremento de la membrana basal y del número de células secretoras de moco (caliciformes) y la remodelación del tejido conectivo (Saetta et al., 2001; Fig. 3). Este proceso inflamatorio es redundante por la gran cantidad de mediadores que actúan en varios tipos celulares y por tanto en su habilidad de alterar la fisiología y arquitectura de las vías aéreas (Murphy et al., 1997).

Bajo condiciones normales, la reactividad de las vías aéreas, esto es la habilidad para alterar reversiblemente el diámetro de las vías aéreas en respuesta a estímulos, es un componente esencial de la homeostasis. Cuando esta respuesta es excesiva, se refiere

como una hiperreactividad o hiperrespuesta de las vías aéreas (Blease, et al., 2000; O'Byrne, 2003). La hiperreactividad de las vías aéreas es una característica del asma persistente crónica y se cree es debido, en parte, al engrosamiento de las vías aéreas debido a la remodelación, la fibrosis y otros procesos de reparación (Humbert et al., 2003). Otros factores críticos en el proceso de la hiperreactividad, es el incremento en la contractilidad del músculo liso bronquial, el mal funcionamiento de la regulación neural, la permeabilidad alterada de la mucosa bronquial, los mediadores pro-inflamatorios celulares y humorales, tales como GM-CSF, TNF- α , los LT's entre otros (Amrani 2000; Blease et al., 2000).

La fase crónica en el asma parece ser mas compleja por la adición de los episodios inflamatorios agudos que corresponden a las exacerbaciones en la enfermedad. Al mismo tiempo, todas las células de las vías aéreas, incluyendo las células inflamatorias incorporadas y células residentes como las epiteliales, fibroblastos y del músculo liso bronquial, llegan a estar activadas liberando mediadores pro-inflamatorios y factores de crecimiento que estimulan los cambios estructurales en las vías aéreas (Barnes, 2003), en donde los eosinófilos siguen jugando el papel principal en esta fase de la enfermedad (Sampson, 2000; Humbert et al., 2003).

La activación de las células de las vías aéreas y de otras células inflamatorias en el asma por mediadores inflamatorios estimula la inducción de la transcripción de genes pro-inflamatorios (Barnes et al., 1998). Entre los principales factores involucrados en ésta se encuentra el factor nuclear kappa B (NF κ B), que regula la expresión de un amplio rango de genes involucrados en la respuesta inflamatoria (IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α) activando y perpetuando la producción de mediadores inflamatorios en el asma (Hart et al., 1998; Tak et al., 2001; Gagliardo et al., 2003).

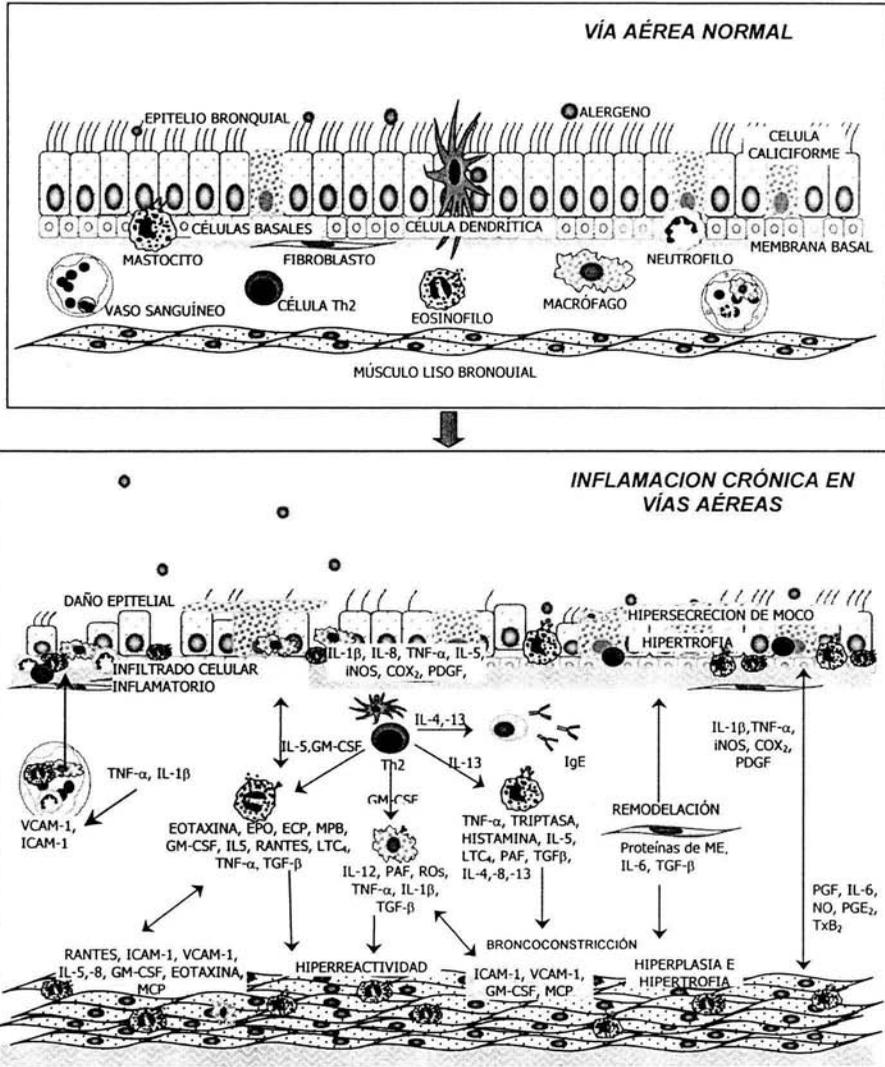


Figura 3. Participación de células y mediadores en la inflamación en las vías aéreas. Los linfocitos Th2 orquestan la respuesta inflamatoria de las vías aéreas liberando citocinas que incorporan y activan células inflamatorias. La degranulación de estas células ocasiona daño al tejido y la activación de células residentes como el epitelio bronquial, fibroblastos y células del músculo liso bronquial, que son fuentes de citocinas y factores de crecimiento. La interacción de todos estos componentes produce cambios en las vías aéreas lo que origina el deterioro de la función respiratoria. iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducible; COX₂: Ciclooxygenasa inducible; ROs: Radicales libres del oxígeno; ME: Matriz extracelular. (Referencias: Kips, 2000; Yáñez, 2000; Barnes 2003; Humbert et al., 2003).

El tratamiento farmacológico en el asma

El tratamiento farmacológico en el asma se basa principalmente en la administración de broncodilatadores y antiinflamatorios. Debido a que la inflamación es una característica temprana del asma se ha propuesto que los tratamientos antiinflamatorios podrían empezar tan pronto como la enfermedad sea diagnosticada (Murphy et al., 1997). Las exacerbaciones agudas en el asma son tratadas principalmente con broncodilatadores. Los agonistas de los adrenoreceptores- β_2 son utilizados comúnmente ya que actúan directamente en el músculo liso de vías aéreas, permitiendo la relajación por la activación de la adenilato ciclasa lo cual aumenta los niveles del monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) que inhibe la señalización de calcio generando la relajación del músculo (Barnes, 1998; Chung, 2003). De reciente utilización se encuentran los anti-leucotrienos. Estos actúan específicamente en el receptor cys-LT₁, evitando la unión del LT con su receptor y la subsecuente obstrucción de las vías aéreas o inhibiendo la síntesis de LT bloqueando a la 5-lipooxigenasa (5-LO), lo que previene la unión del ácido araquidónico con la proteína que activa a la enzima y genera estos mediadores (Chung, 2003).

Los corticosteroides son los principales antiinflamatorios usados en el asma y actúan disminuyendo la inflamación por vías intracelulares hasta modular la transcripción de factores o mediadores pro-inflamatorios y antiinflamatorios. También reducen la expresión de citocinas involucradas en la incorporación y la supervivencia de células inflamatorias incluyendo eosinófilos, basófilos y linfocitos (Barnes, 1998; Chung, 2003). La teofilina, del grupo de las metilxantinas, es usada en las exacerbaciones agudas en asma. Además de tener efectos antiinflamatorios, ya que inhibe la expresión y liberación de TNF- α e IL-1 β , tiene una acción débil como broncodilatador por la inhibición de fosfodiesterasas, que llevan al incremento del AMPc en el músculo.

La colágena polivinilpirrolidona

La colágena polivinilpirrolidona (C-PVP) o colágena polimerizada es una biofármaco que con propiedades antiinflamatorias que ha sido utilizado en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas como las cicatrices hipertróficas y algunas enfermedades

reumáticas como la escleroderma y la artritis reumatoide (Krötzsch-Gómez et al., 1998; Barile et al., 1998; Furuzawa-Carballeda et al., 2003). La C-PVP es una mezcla de colágena porcina tipo I peptinizada y PVP que tras ser irradiada con rayos γ presenta propiedades farmacológicas y estructurales diferentes a las de sus constituyentes por separado (Chimal-Monroy et al., 1998). Hasta ahora, el uso de la C-PVP no produce ningún efecto adverso y es bien tolerado. Adicionalmente, no estimula la linfoproliferación, ni el daño al ADN, ni genera anticuerpos antiporcino o anti-C-PVP en el humano, ni disfunciones metabólicas renales o hepáticas (Furuzawa-Carballeda et al., 2003a).

De la misma forma, la utilización de la C-PVP en cicatrices hipertróficas y la escleroderma disminuye la expresión de moléculas de adhesión (E-selectina y VCAM-1). Asimismo, los resultados de los estudios clínicos de remodelación en fibrosis dérmica sugieren la C-PVP modula cambios en la matriz extracelular, principalmente la colágena, debido a la disminución en los niveles de IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1 y PDGF (Krötzsch-Gómez et al., 1998). Por otro lado, la adición de C-PVP en cultivos de sinovias de pacientes con artritis induce la modulación de la expresión de IL-1 β , TNF- α , IL-8, ICAM-1, VCAM-1, así como también de la ciclooxigenasa-1 (Furuzawa-Carballeda et al., 2002). Debido a la relevancia de la E-selectina, la VCAM-1, las IL-1 β , -8, el TNF- α , el TGF- β 1 y PDGF en la fisiopatología del asma sería interesante determinar el efecto de C-PVP en la inflamación crónica ocasionada por el reto antigénico en cobayos sensibilizados a la ovoalbúmina.

Planteamiento del problema

Como se mencionó anteriormente el asma es una enfermedad de importancia en la salud pública cuya prevalencia va en aumento. El hallazgo de que el proceso inflamatorio crónico presente en las vías aéreas de pacientes con asma contribuye a la obstrucción, la hiperreactividad y la remodelación de las vías aéreas ha llevado al incremento en el uso de agentes antiinflamatorios como tratamiento de primera línea en la enfermedad.

En este trabajo se plantea evaluar el efecto de un biofármaco que ha mostrado propiedades moduladoras de la inflamación en procesos crónicos, la C-PVP, en un modelo de inflamación crónica de las vías aéreas del cobayo.

Hipótesis

Si el tratamiento de la C-PVP modula la expresión de citocinas pro-inflamatorias, entonces la administración de este biofármaco reducirá la inflamación crónica de las vías aéreas provocada por retos antigénicos repetitivos en cobayos sensibilizados a la ovoalbúmina.

Objetivo general

- Determinar el efecto de la C-PVP sobre la inflamación crónica de vías aéreas.

Objetivos particulares

- Desarrollar un modelo de inflamación crónica generada por retos antigénicos con aerosoles de ovoalbúmina en cobayo sensibilizados para promover la inflamación en vías aéreas.
- Observar el efecto de la administración *in situ* de C-PVP en el infiltrado celular inflamatorio y en la expresión de TNF- α en las vías aéreas de estos cobayos.

Material y Métodos

Animales

Se utilizaron cobayos macho raza Hartley con peso aproximado de 350 a 400 g que se mantuvieron en condiciones convencionales de humedad, temperatura y alimentación en el bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Esquema de sensibilización

En el día uno, los cobayos fueron inyectados por vía intradérmica e intraperitoneal con 1 ml, respectivamente, de solución salina isotónica (SSI) conteniendo 40 µg de ovoalbúmina (OA) y 1 mg de hidróxido de aluminio como adyuvante (Hargreave et al., 1986). En el día 8 se reforzó la sensibilización de los cobayos administrándoles OA en aerosol (3 mg/ml disuelto en SSI durante 15 min). Los aerosoles se generaron con un nebulizador (US-Bennet CA, EU) que produce partículas de diámetro de hasta 9 µm (flujo de 2 ml/min). En el día 15 los cobayos sensibilizados se colocaron en un pletismógrafo barométrico (Buxco Electronics Inc., NY, EU), en donde se les administró otro refuerzo con aerosoles de OA (1 mg/ml) durante 1min (Desquand et al., 1990) y se registraron los cambios en su función respiratoria durante 50 min.

Análisis de la función respiratoria

Los registros funcionales se obtuvieron colocando a los cobayos en un pletismógrafo barométrico de cámara única para animales en libre movimiento. Este sistema de pletismografía está basado en la medición directa de las fluctuaciones de presión que se presentan dentro de la cámara y las compara con una cámara de referencia (Fig. 4). Dichas fluctuaciones fueron captadas por un transductor de presión diferencial (SCXL004DN SenSym, Milpitas, CA, EU), conectado a un preamplificador y éste a su vez enlazado a una computadora. Los resultados se almacenaron utilizando un programa especial para el manejo automatizado de los datos (Buxco BioSystem XA, versión 0.9.3, NY, EU).

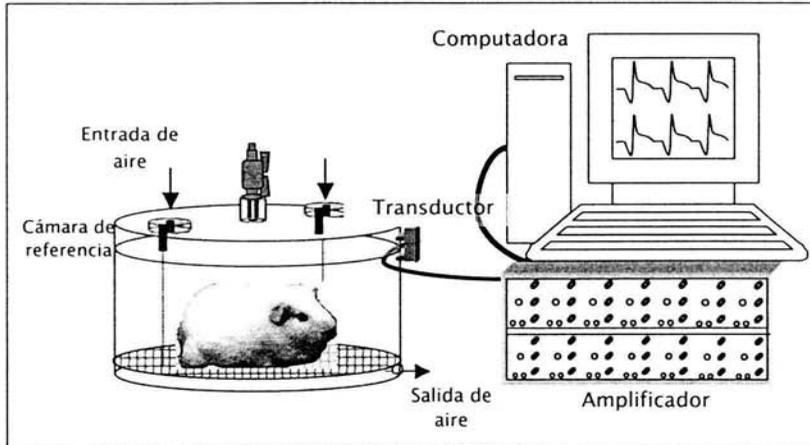


Figura 4. Equipo de pletoresografía barométrica para animales en libre movimiento. En la figura se muestra a un cobayo dentro de una cámara de pletoresografía barométrica. Para medir los cambios de presión en esta cámara, se usa de referencia otra que no tiene entradas ni salidas de aire salvo el orificio donde entra un transductor de presión diferencial que conecta ambas cámaras. La señal es transferida al amplificador que la conduce amplificada hacia la computadora para su procesamiento.

El pletoresógrafo barométrico cuantifica, entre otras cosas, el índice de broncoconstricción, que refleja el grado de obstrucción de las vías aéreas (Hamelmann et al., 1997; Chávez, 1996). Este índice se basa teóricamente en lo siguiente: en la inspiración, el aire que ingresa al tórax del cobayo aumenta su temperatura y humedad provocando su expansión por aumento en el volumen. Este fenómeno incrementa la presión de la cámara durante la inspiración. Sin embargo, cuando el aire del tórax es eliminado, este 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). Esta información es procesada por un programa computacional que proporciona el valor del índice de broncoconstricción (Fig. 5), que es obtenido con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de broncoconstricción} = \left[\frac{T_e}{T_r} - 1 \right] \left[\frac{PFE}{PFI} \right]$$

Donde:

T_e = Tiempo espiratorio (s)

T_r = Tiempo de relajación (s)

PFE = Pico de flujo espiratorio (ml/s; presión positiva máxima)

PFI = Pico de flujo inspiratorio (ml/s; presión negativa máxima)

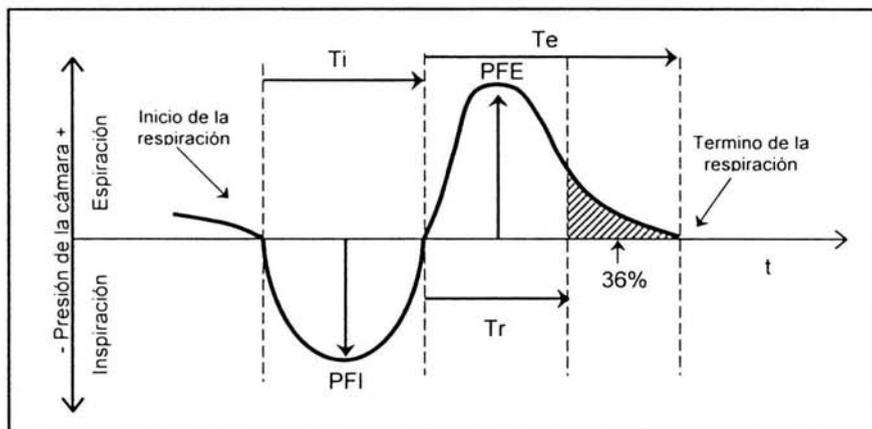


Figura 5. Esquema de una onda de presión dentro de la cámara durante la inspiración y la espiración en un ciclo respiratorio obtenido mediante pletismografía barométrica en un animal en libre movimiento. El tiempo inspiratorio (T_i), es el intervalo de tiempo ocurrido desde el inicio de la inspiración hasta el final de ésta. El T_e comprende el siguiente intervalo que inicia desde el final de la inspiración hasta el inicio de la siguiente. El T_r es el tiempo que transcurre entre el inicio de la espiración hasta que el volumen corriente caiga al 36% durante la espiración. El PFE y el PFI se obtienen midiendo la presión positiva y negativa máximas registradas en un ciclo respiratorio. T: tiempo (s). Tomado de Hamelmann et al., 1997.

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 periodos de 10 min estudiados. El índice de broncoconstricción es un parámetro empírico que ha sido empleado para caracterizar las respuestas obstructivas de las vías aéreas ante un estímulo antigénico en cobayos inmunizados (Chand et al., 1993). En estos estudios se ha visto que cuando existe obstrucción de las vías aéreas, la espiración es más prolongada incrementando el valor del índice de broncoconstricción (Chand et al., 1993; Hamelmann et al., 1997).

En el día 25 los animales sensibilizados fueron colocados nuevamente en el pletismógrafo, donde después de un periodo de habituación de 5 min, se inició el registro tomando un índice de broncoconstricción basal de cada animal. Posteriormente se le dio un reto con OA en aerosol (0.5 mg/ml) por 1 min y se registró el índice de broncoconstricción máximo alcanzado durante 50 min. Este esquema de sensibilización se siguió los días 35, 45, 55 y 65. De acuerdo al plan de sensibilización, la inhalación de OA debió inducir que se triplicara el índice de broncoconstricción basal de los cobayos desde el día 15, por lo tanto

en el día 25 sólo los animales que siguieron triplicando sus valores basales fueron requeridos para entrar al protocolo.

Administración de la C-PVP

Los cobayos que presentaron broncoconstricción después del reto en el día 25 se dividieron al azar en los siguientes grupos:

Un grupo control sensibilizado al que se le administraron aerosoles de SSI ($n= 5$).

Tres grupos experimentales que recibieron las siguientes dosis de C-PVP diluidas en 10 ml de SSI:

1.4 mg de C-PVP/ml ($n= 4$)

2.8 mg de C-PVP/ml ($n= 5$)

5.6 mg de C-PVP/ml ($n= 5$).

Un grupo tratado con el vehículo de la C-PVP, el amortiguador de citratos (0.1 mM, $n= 5$) también diluido en SSI.

Un grupo adicional de cobayos ($n= 5$) no sensibilizados y no tratados con peso aproximado al de un animal sensibilizado día 65 (650-700 g) utilizado como grupo comparativo.

Los fármacos se administraron en forma de aerosol durante 3 min cada 5 días a partir del día 25 y hasta el día 60. En los días en que coincidía el reto con la OA y la administración del fármaco, éste último se administró después de concluido el registro pletismográfico.

Lavado bronquioalveolar (LBA) y conteo celular.

Una vez terminado el registro del día 65, los animales fueron anestesiados profundamente con una sobredosis de pentobarbital sódico (28 mg/kg). A continuación se introdujeron 5 ml de SSI estéril a 37°C a través de un tubo endotraqueal y fueron recobrados lentamente 1 min después. Esta acción se repitió nuevamente y el lavado recobrado se mezcló con el primero. El LBA total fue centrifugado inmediatamente (1500 rpm por 10 min a 4°C) en una centrifuga (Hettich-Zentrifuge, Tuttlingen, Alemania) y el botón celular obtenido fue resuspendido en 1 ml de SSI.

Para establecer el número total de células en el LBA, se tomaron 10 μ l de la suspensión celular y se colocaron en 40 μ l de azul de tripan al 0.4%. Se obtuvieron 10 μ l de esta

mezcla y se depositaron en una cámara de Neubauer para realizar el conteo directo de las células en 25 cuadros. El valor obtenido se multiplicó por el factor de dilución (5) y después por el factor de la cámara (10,000), obteniendo así el número de células por mililitro de LBA. Posteriormente, el número de células contadas se ajustó a 1×10^6 células por mililitro adicionando SSI.

El conteo diferencial celular se realizó mediante preparaciones del LBA en laminillas. Inicialmente se colocaron 50 μ l del LBA, ya ajustado a un millón de células por mililitro, en una citrocentrífuga (Wescor Cytospin, EU) para realizar un frotis celular. Después se tiñeron las células utilizando la técnica de Romanowsky. Esta tinción se realizó en la misma citocentrífuga utilizando una mezcla de violeta y azul de metileno con eosina (como colorantes principales) para dar las siguientes tonalidades: núcleo en púrpura, eritrocitos en rosa, gránulos de neutrófilos en púrpura y gránulos de eosinófilos en rosa-naranja (Romanowsky, 1981, 1981a). Se contaron un mínimo de 200 células, sin incluir eritrocitos, con un microscopio de luz a 100x.

Inmunohistoquímica

Después del LBA, se obtuvo el bloque cardiopulmonar de todos los cobayos y se perfundió con formol al 10% en amortiguador de fosfatos. Se conservó el pulmón izquierdo para incluirse en parafina y del cual se realizaron cortes histológicos para observar los cambios en la expresión de TNF- α utilizando la técnica de inmunohistoquímica. Para esto, los cortes de tejido de 3 μ m de grosor, se colocaron en laminillas o portaobjetos con silano. Se desparafinaron a 60°C durante 20 min y se pasaron por xilol, etanol absoluto, etanol 96% y agua destilada por 5 min respectivamente para su rehidratación. Se realizó la recuperación antigénica con solución amortiguadora por 20 min y se colocaron a temperatura ambiente. Se bloqueó la peroxidasa endógena preincubando los cortes con una solución de H₂O₂ al 3% en metanol y en una cámara húmeda por 20 min, protegidos de la luz y a temperatura ambiente. Los tejidos fueron bloqueados con suero de cerdo al 2% en solución de HEPES, calcio y sodio (HCN: HEPES 0.1 M, NaCl 0.15 M, CaCl₂ 0.0026 M) por 30 min para cubrir los sitios inespecíficos. Se añadió el anticuerpo policlonal de ratón anti-TNF- α diluido en 1:400 con solución de HCN y se incubó por 2.5 h. A continuación, se lavó 3 veces con solución HCN-tween al 0.05%. Se añadió un segundo

anticuerpo IgG anti-conejo biotinilado, diluido en 1:200, y se incubó por otra hora. Se detuvo la reacción lavando 3 veces con solución HCN-Tween (0.05%), y se incubó con el complejo AB/HRP diluido en 1:150 durante 30 min. Para revelar se utilizó una solución de diaminobencidina (DAB) en HCN con H₂O₂ al 0.04% (0.004 g DAB, 10 ml HCN, 4 µl H₂O₂) por 30 min. Finalmente, los cortes fueron contrateñidos con hematoxilina.

El análisis de la expresión de TNF- α se obtuvo contando en 6 campos al azar a 100x, el número total de macrófagos, granulocitos (neutrófilos y eosinófilos) y células epiteliales. De estas células, se evaluaron las células con marca de la peroxidasa, obteniendo así el porcentaje de células inmunoreactivas que expresaban TNF- α . Para este análisis, se decidió comparar solo al grupo donde se observó mas efecto de la C-PVP en las cuentas celulares (5.6 mg/ml) con los grupos control de animales sensibilizados y no sensibilizados y el grupo del vehículo.

Fármacos

Todos los reactivos y fármacos, salvo los que se indican adelante, se obtuvieron de Sigma (Saint Louis, EU). El hidróxido de aluminio fue adquirido a J.T. Baker (NJ, EU), el pentobarbital sódico a Pfizer (Edo. de México, México), la solución salina isotónica a Baxter (Mor., México), los colorantes para la tinción de Romanowsky a Wescor Cytospin (CA, EU), los anticuerpos a Santa Cruz Biotechnology (CA, EU), el complejo AB/HRP y la solución amortiguadora a Dako (CA, EU) y el metacril-oxipropil-trimetoxisilano (silano) a ICN (CA, EU). El amortiguador de citratos y la C-PVP (Fibroquel^{MR}) fueron donados por Aspid S.A. de C.V., División Pharma (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. Para otras comparaciones se utilizó la prueba t de Student para muestras no pareadas según se requiriera. Los valores de p<0.05 bimarginal fueron considerados como estadísticamente significativos. Los resultados que aparecen en el texto y en tablas corresponden al promedio \pm el error estándar.

Resultados

Análisis de la broncoconstricción

Todos los animales sensibilizados con OA presentaron broncoconstricción cada vez que se les administró el reto antigénico. En el grupo control, el índice de broncoconstricción máximo observado después del reto del día 25 se incrementó en alrededor de 6 veces en comparación al valor basal obtenido antes del reto ($n=5$, Fig. 6). En los retos subsecuentes, esto es los de los días 35 al 65, las repuestas al alergeno de este grupo no fueron significativamente diferentes a las del día 25 (Fig. 6). Ninguna dosis de C-PVP ni el vehículo modificaron la respuesta al alergeno en comparación al grupo control en todo el estudio (Fig. 6, tabla I).

Grupo	Días en el esquema de sensibilización				
	25	35	45	55	65
Control $n=5$	794.5 ± 234.7	886.1 ± 275.8	503.4 ± 75.7	557.0 ± 98.1	441.1 ± 126.3
1.4 mg/ml C-PVP $n=4$	433.6 ± 78.2	793.9 ± 270.4	496.6 ± 72.5	445.0 ± 54.2	408.9 ± 57.9
2.8 mg/ml C-PVP $n=5$	590.6 ± 217.4	594.3 ± 108.6	213.1 ± 48.1	607.4 ± 18.9	364.2 ± 57.5
5.6 mg/ml C-PVP $n=5$	402.4 ± 91.2	518.9 ± 117.9	314.9 ± 79.1	553.5 ± 173.6	428.4 ± 27.2
Vehículo $n=5$	543.3 ± 185.2	678.1 ± 17.2	378.2 ± 94.9	491.1 ± 203.4	499.3 ± 113.7

Tabla I. Porcentaje del índice de broncoconstricción máximo alcanzado después de la administración del reto a OA en diferentes grupos de animales sensibilizados.

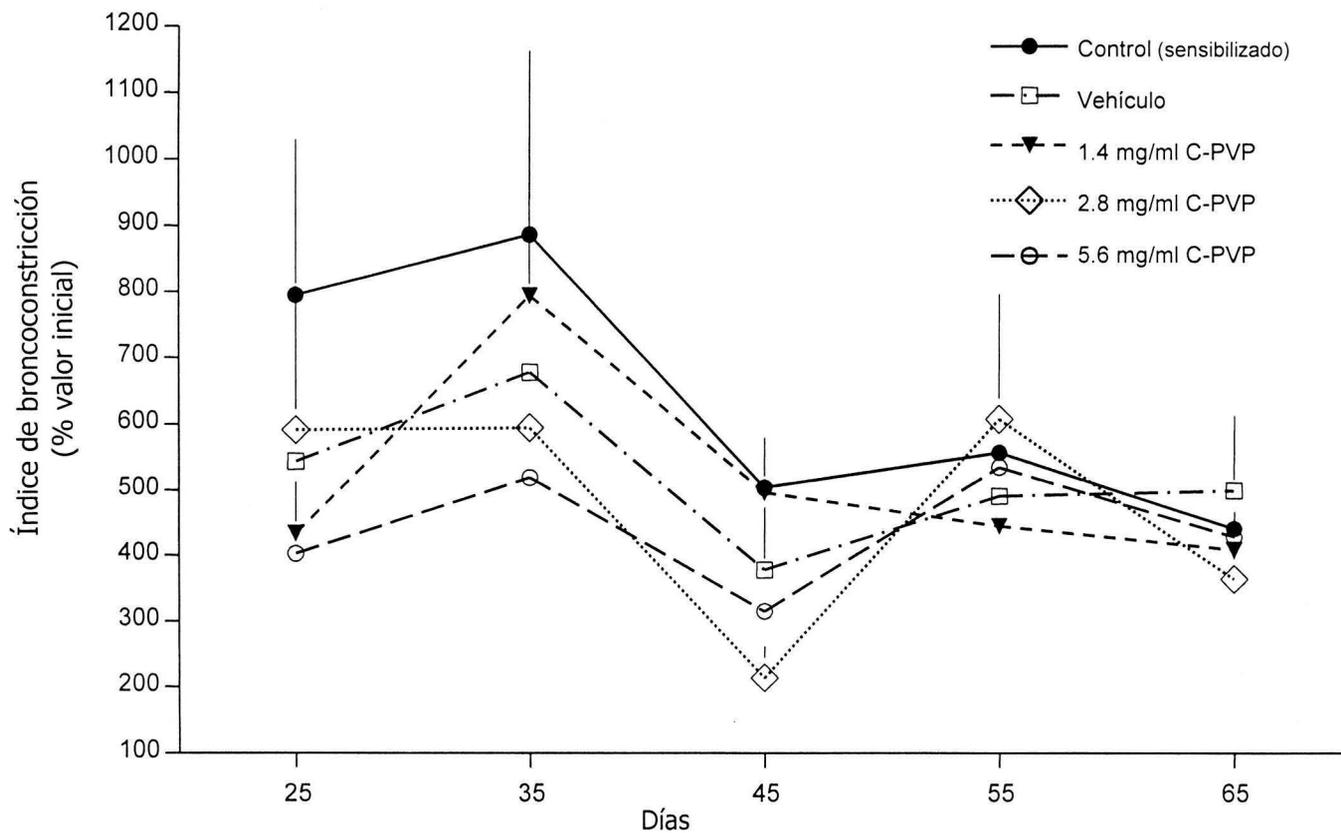


Figura 6. Efecto de la C-PVP en el índice de broncoconstricción máximo producido después del reto con OA en animales sensibilizados.

Conteo celular total y diferencial

En el conteo celular total del LBA se observó que el número células por mililitro fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en animales control sensibilizados con OA ($4.19 \pm 0.643 \times 10^6$, $n=5$) que en los animales no sensibilizados y no tratados ($2.08 \pm 0.33 \times 10^6$; $n=4$; Fig 7). En los animales tratados con la C-PVP y con el vehículo se aprecia una disminución no significativa del número total de células por mililitro en comparación al grupo control sensibilizado: 1.4 mg/ml: $3.07 \pm 0.54 \times 10^6$ ($n=4$), 2.8 mg/ml: $3.37 \pm 0.38 \times 10^6$ ($n=5$) y 5.6 mg/ml de C-PVP: $3.25 \pm 0.5 \times 10^6$ ($n=5$), y vehículo: $3.77 \times 10^6 \pm 629622$ ($n=5$).

La comparación de los conteos diferenciales mostró que el tipo celular más abundante en el LBA de un cobayo no sensibilizado fueron los macrófagos > eosinófilos > linfocitos > neutrófilos. Los macrófagos del LBA de animales sensibilizados, aunque siguieron siendo el tipo celular más frecuente, disminuyeron de manera significativa con respecto a los cobayos no sensibilizados ($p < 0.01$). En este grupo, los eosinófilos se incrementaron también de manera significativa ($p < 0.01$). En conclusión, los conteos diferenciales de los animales sensibilizados se distribuyeron de la siguiente manera: macrófagos > eosinófilos > neutrófilos > linfocitos (Fig. 8, tabla II).

Grupo	Macrófagos $\times 10^4$	Eosinófilos $\times 10^4$ (células/ml)	Neutrófilos $\times 10^4$	Linfocitos $\times 10^4$
No sensibilizados	70.3 ± 2.6	9.6 ± 2.5	7.6 ± 0.7	7.9 ± 2.6
Sensibilizados	$40.0 \pm 2.6^{**}$	$29.9 \pm 4.2^{**}$	11.6 ± 2.0	10.5 ± 1.4
1.4 mg/ml C-PVP	51.9 ± 1.07	25.1 ± 2.2	10.2 ± 3	8.7 ± 0.7
2.8 mg/ml C-PVP	51.5 ± 6.8	23.8 ± 5.4	8.8 ± 2.1	9.1 ± 1.1
5.6 mg/ml C-PVP	$61.7 \pm 2.9^{§§}$	$16.2 \pm 2.5^§$	6.9 ± 1.1	10.3 ± 0.9
Vehículo	45.8 ± 0.5	28.9 ± 2.3	10.5 ± 0.5	9.8 ± 1.6

Tabla II. Conteo diferencial del número de células en el LBA en los diferentes grupos estudiados. $^{**}p < 0.01$ con respecto al grupo no sensibilizado. $^§p < 0.05$, $^{§§}p < 0.01$ con respecto al grupo control sensibilizado.

Con respecto a las cuentas diferenciales de los animales tratados con C-PVP, en el grupo de 5.6 mg/ml, las cuentas diferenciales mostraron un aumento significativo en el

número de macrófagos ($p < 0.01$; Fig. 9; tabla II) y una disminución significativa del número de eosinófilos ($p < 0.05$), ambos con respecto al grupo control de animales sensibilizados. En el grupo tratado con el vehículo no se observó ningún cambio significativo en los conteos diferenciales.

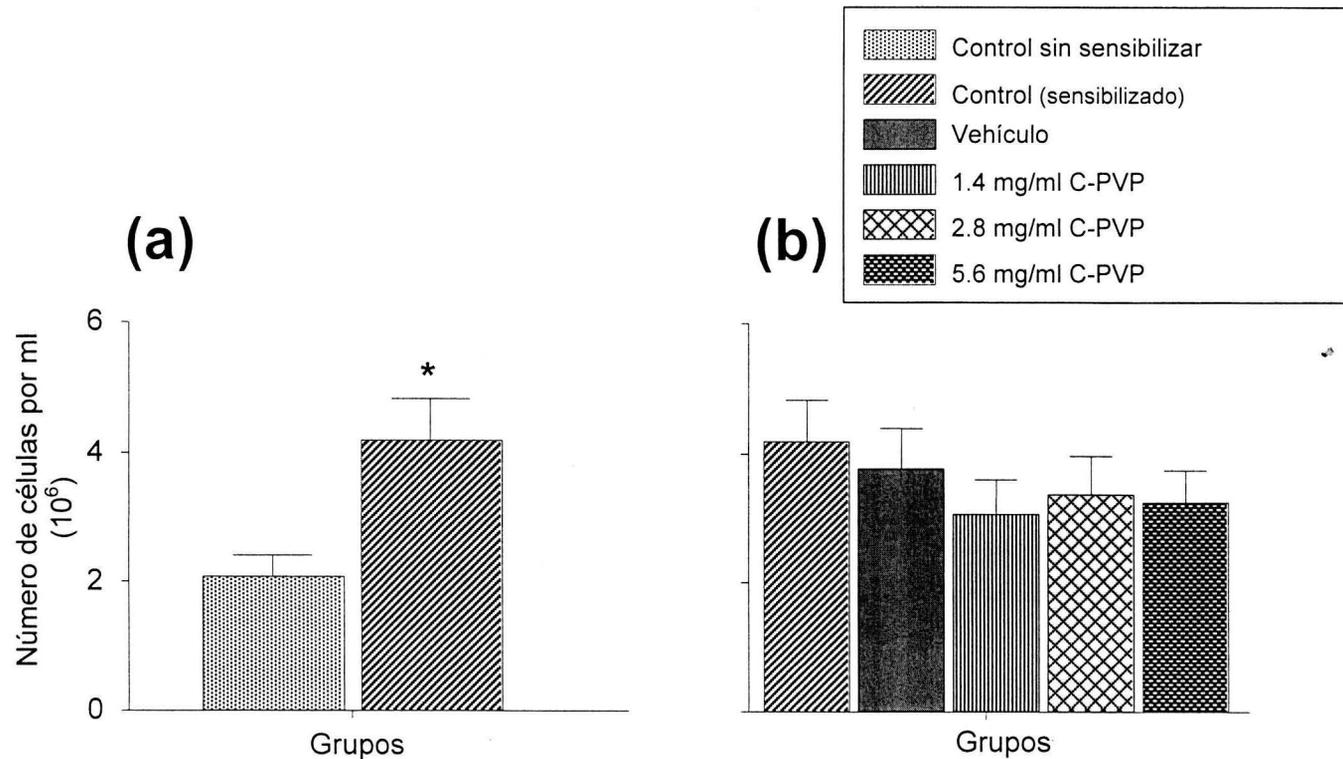


Figura 7. Conteo celular total en el lavado bronquioalveolar. (a) Comparación entre el grupo control de animales no sensibilizados y el grupo sensibilizado a la OA, (b) Comparación entre los grupos de animales sensibilizados y tratados con C-PVP o con el vehículo. * $p < 0.05$.

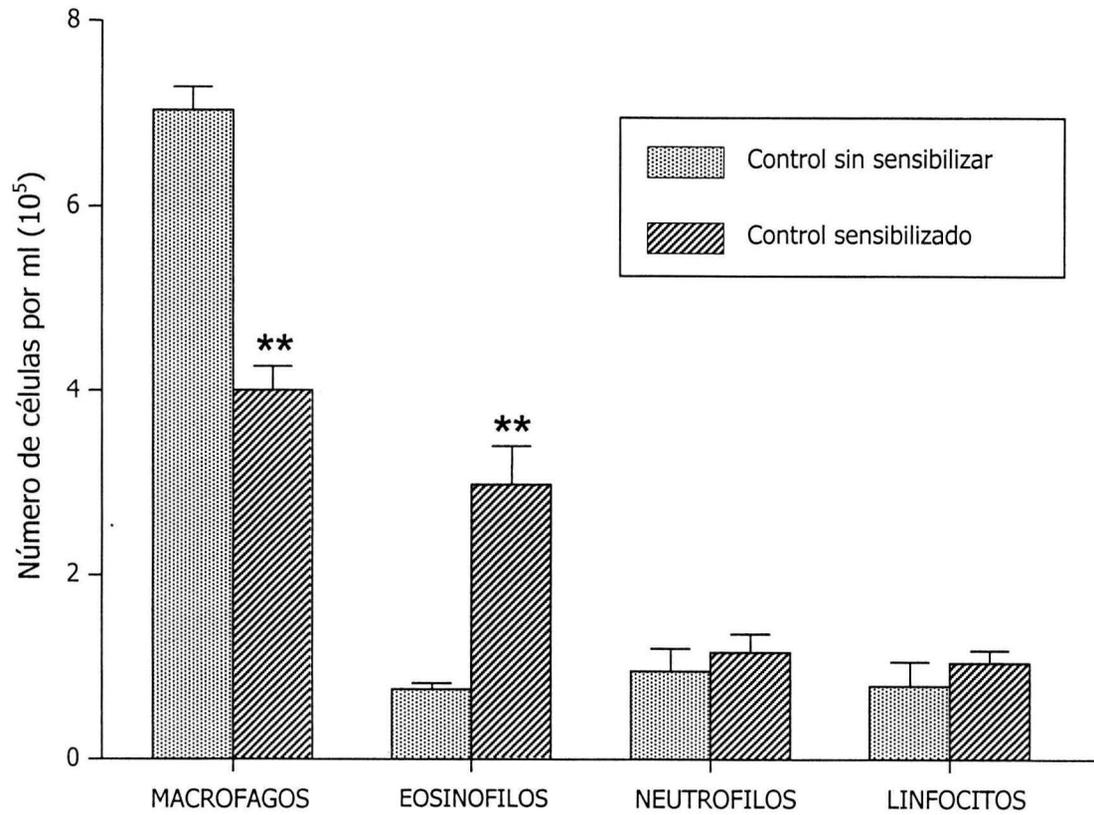


Figura 8. Conteo diferencial de las células del lavado bronquioalveolar en animales sensibilizados y no sensibilizados. **p<0.01.

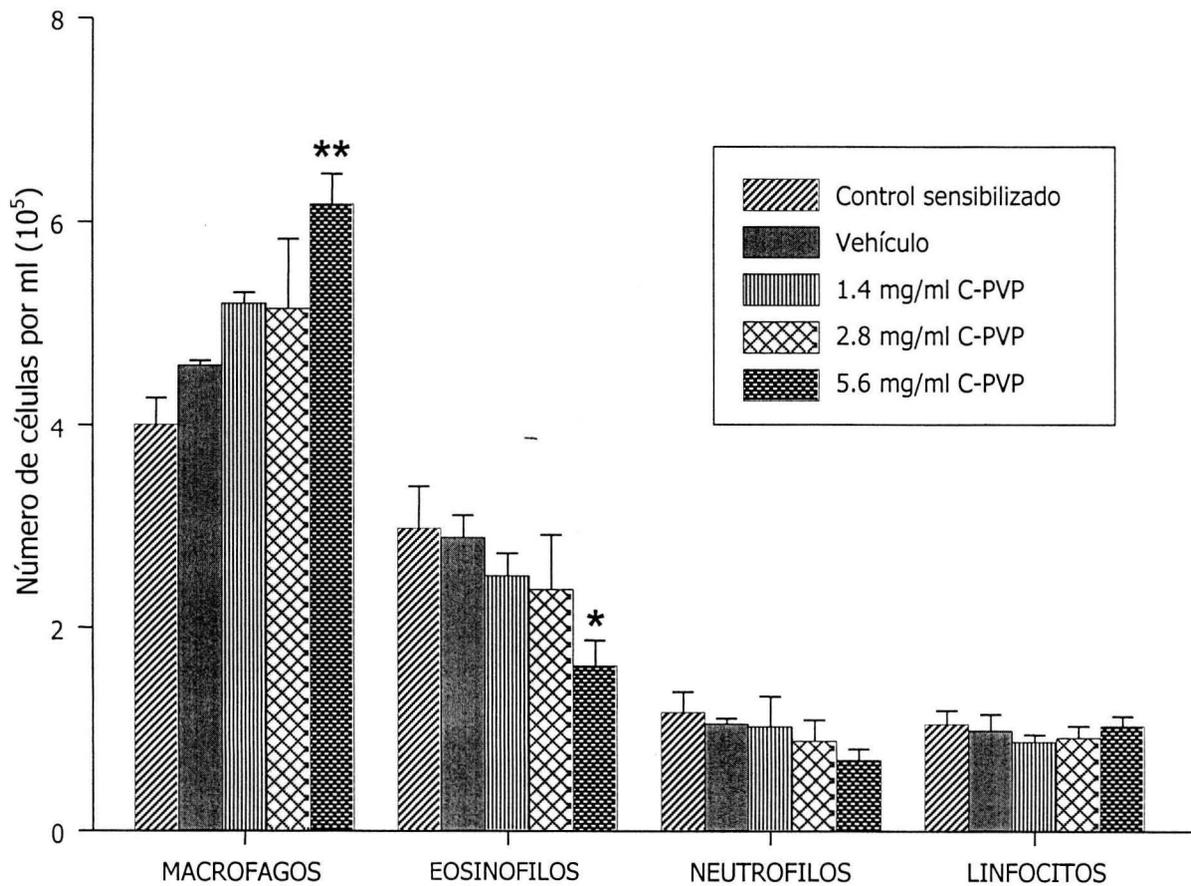


Figura 9. Conteo diferencial de células del lavado bronquioalveolar en animales tratados con la C-PVP y el vehículo. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

Expresión de TNF- α

La sensibilización de los cobayos a la OA durante 65 días incrementó significativamente la expresión de TNF- α en macrófagos, granulocitos y células epiteliales de las vías aéreas en comparación a los animales no sensibilizados ($p < 0.01$; Fig. 10). El tratamiento con la C-PVP (5.6 mg/ml) redujo significativamente la expresión del TNF- α en granulocitos y macrófagos ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente) en comparación a los animales control sensibilizados y al vehículo ($p < 0.05$; Tabla III y Fig. 11). Sin embargo, en el epitelio no se observa disminución en la expresión de TNF- α en este mismo grupo. En los animales tratados con el vehículo no se observó ningún cambio significativo.

Grupo	Macrófagos (%)	Granulocitos (%)	Células epiteliales (%)
No sensibilizado	30.7 \pm 7.6	27.4 \pm 9.3	21.4 \pm 5.2
Sensibilizado	70.8 \pm 6.1 [§]	66.9 \pm 5.7 [§]	82.4 \pm 5.9 [§]
5.6 mg/ml C-PVP	31.7 \pm 4.3*	33.4 \pm 6.2 ^{**†}	59.7 \pm 11.7
Vehículo	55.6 \pm 10.7	61.9 \pm 5	73.1 \pm 16.8

Tabla III. Efecto de la C-PVP en la expresión de TNF- α . [§] $p < 0.01$, con respecto al control no sensibilizado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ con respecto al control sensibilizado y [†] $p < 0.05$ al vehículo.

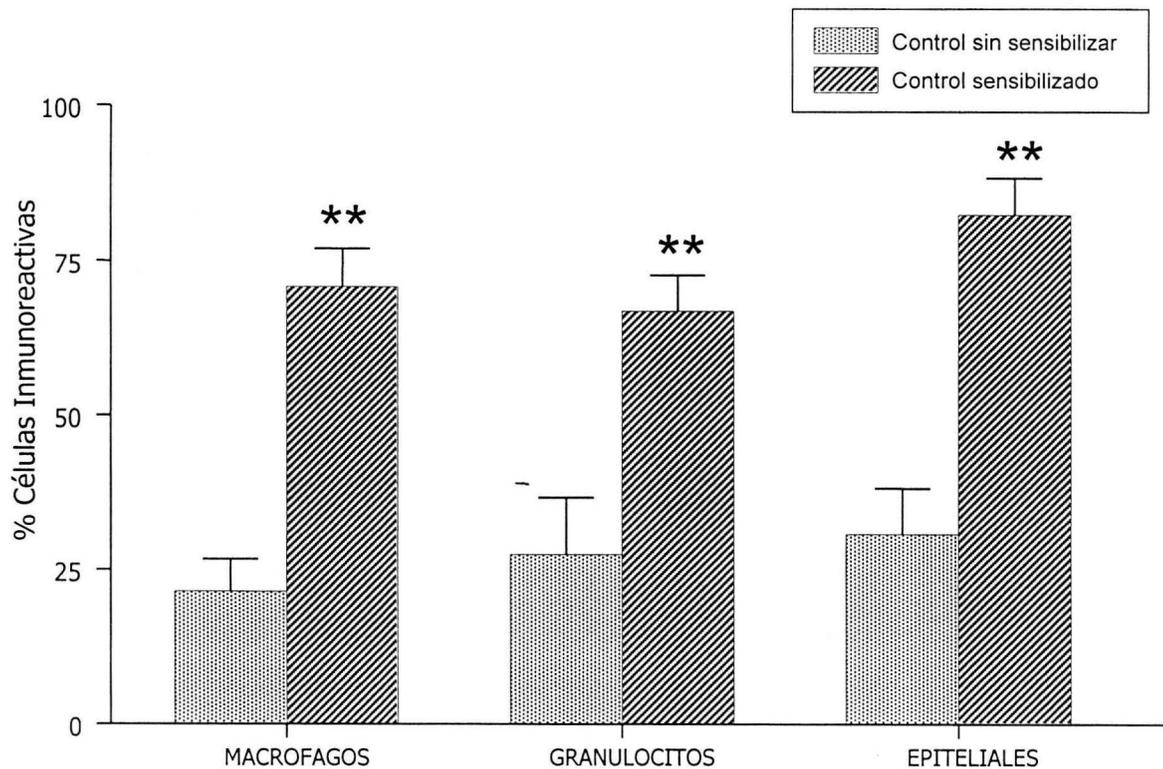


Figura 10. Porcentaje de células inmunoreactivas a TNF- α en cortes histológicos de pulmón de cobayos sensibilizados y no sensibilizados a OA. **p<0.01 con respecto al grupo control no sensibilizado.

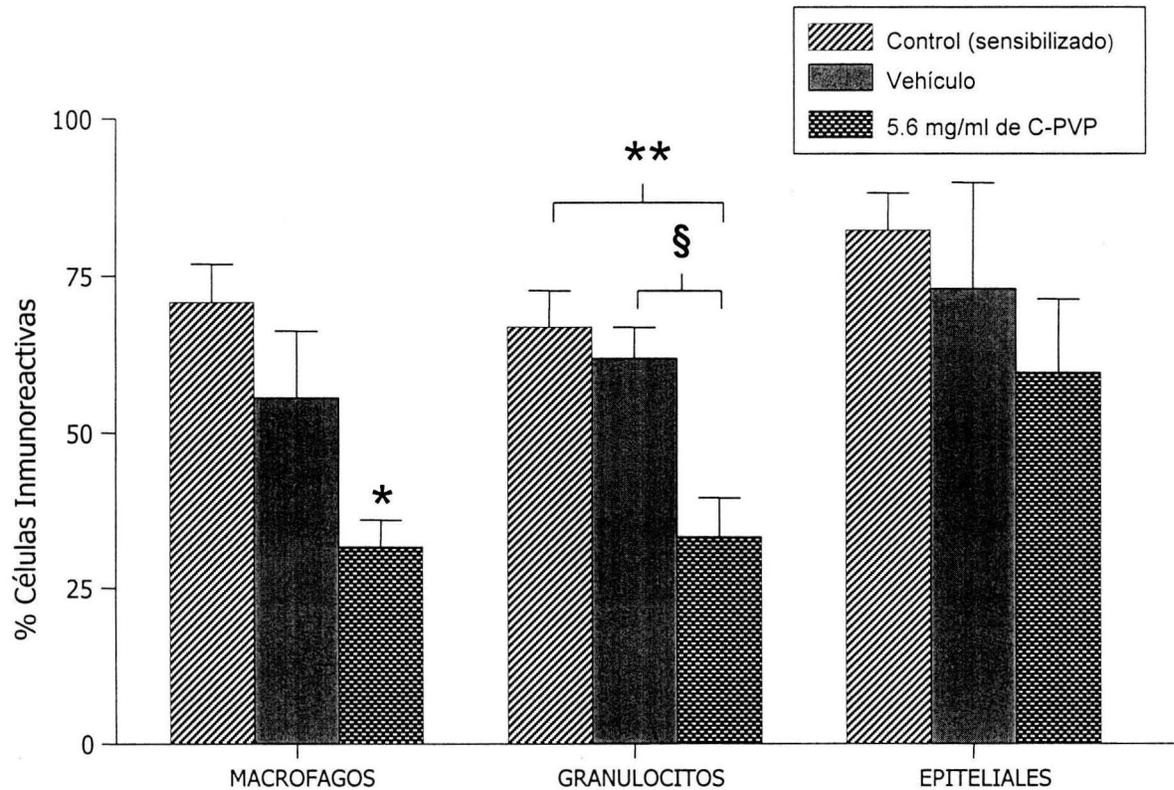


Figura 11. Porcentaje de células inmunoreactivas a TNF- α en cortes histológicos de pulmón de cobayos sensibilizados a OA y tratados con C-PVP. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ con respecto al grupo control sensibilizado y § $p < 0.05$ con respecto al vehículo.

Discusión

El reto con aerosoles de OA provocó broncoconstricción en los cobayos sensibilizados a partir del día 25 y en los retos subsecuentes; además, al final del estudio se observó un incremento en el infiltrado celular total de las vías aéreas del cobayo, especialmente de eosinófilos.

En otros estudios en cobayos el infiltrado celular inflamatorio (macrófagos, eosinófilos, neutrófilos), se ha visto aumentado desde las primeras horas después del reto antigénico (Hoshino et al., 1989; Walls et al., 1991; Adachi et al., 1993; Santing et al., 1994; Takeda et al., 1997) y en el caso de los eosinófilos, se inicia a los 30 min y puede observarse 96 h después (Hoshino et al., 1989). En pacientes con asma, se ha propuesto que el incremento en el número de eosinófilos en el LBA y la sangre se correlaciona con daño epitelial y con cambios estructurales de las vías aéreas que ocurren cuando la enfermedad es crónica, debido a la secreción de varios mediadores pro-inflamatorios (Yáñez et al., 2000; Bousquet et al., 2000; Humbert et al., 2003; Barnes, 2003).

Los eosinófilos se consideran perjudiciales en el asma por la liberación de productos altamente tóxicos: la MBP, la EDN, la ECP, la EPO y los radicales libres del oxígeno (Marone, 1998; Barnes, 2003). Además de éstos, los eosinófilos liberan otros mediadores inflamatorios como los LT, citocinas Th2 y algunos factores de crecimiento. Estos productos contraen el músculo liso de las vías aéreas, incrementan la permeabilidad vascular e inducen la hiperreactividad (Barnes, 2003; Humbert et al., 2003). Debido a su capacidad para amplificar las respuestas inflamatorias y dañar al tejido, la inhibición de la eosinofilia podría ser una alternativa terapéutica para controlar el asma. En este estudio se observó que el tratamiento con la dosis más alta (5.6 mg/ml) de C-PVP revirtió el incremento en el número de eosinófilos en el LBA generado por los retos repetitivos con aerosoles de OA en animales sensibilizados.

Recientemente se ha visto que la inhibición de la eosinofilia y de la IL-5, la principal citocina involucrada en la producción, diferenciación, maduración y activación de eosinófilos, no afecta la respuesta hacia el alérgeno (Corry et al., 1996; Leckie et al.,

2000; Barnes, 2003; Virrey et al., 2003); lo cual coincide con nuestro resultado donde observamos que pesar de la disminución de eosinófilos los cobayos siguen respondiendo al reto antigénico.

En el conteo celular diferencial del LBA, la sensibilización con OA disminuyó el número de macrófagos en comparación a los animales no sensibilizados. Normalmente la población de macrófagos es la más abundante dentro del infiltrado celular existente, ya que se encargan principalmente de fagocitar y eliminar elementos extraños, y se pueden encontrar incrementados o disminuidos de acuerdo con el estímulo (Barnes, 2003). También se sabe que los macrófagos participan en la producción, movilización, activación y regulación de todas las células efectoras inmunes (Rosenberg et al., 1998). La contribución de los macrófagos en el asma es amplia pues liberan una extensa diversidad de mediadores que no solo participan en la inflamación, sino también en el restablecimiento y reparación de los tejidos. Después del reto con el alérgeno, los macrófagos suelen aumentar lentamente su número dentro de la primera hora (Toward et al., 2004), hasta incrementarse aún más en las 24 h siguientes al reto. En otro trabajo en cobayos con un esquema similar de retos antigénicos (Sánchez, 2004) y donde los lavados se realizaron hasta 24 h después del último reto, la población de macrófagos no se modificó en comparación al del grupo de cobayos no sensibilizados. En este trabajo, la realización de los lavados fue entre 2 a 3 h después del último reto. La disminución de macrófagos que observamos posiblemente se deba a la incorporación inicial de eosinófilos, siendo los más abundantes dentro del infiltrado celular inflamatorio; probablemente los macrófagos aumentarían lentamente su número dentro de las horas subsiguientes.

En los animales no sensibilizados, observamos un infiltrado celular compuesto principalmente por macrófagos, seguido de eosinófilos en menor cantidad (7:1), linfocitos y neutrófilos. En este trabajo, el tratamiento con la C-PVP elevó el número de macrófagos a un nivel similar al observado en los animales no sensibilizados. Los macrófagos pueden aumentar o disminuir la inflamación dependiendo del estímulo al que son sometidos (Abbas et al., 2000; Humbert et al., 2003). Una manera de conocer si los

macrófagos actúan a favor o en contra del proceso inflamatorio, es evaluando el tipo de citocinas que expresan.

El TNF- α es una citocina que estimula la incorporación y la activación de leucocitos a través de la inducción de la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular y la síntesis de quimiocinas y citocinas (Abbas et al., 2000; Kips, 2001). La concentración de este factor aumenta al iniciar el reto con el alérgeno y es liberado principalmente por macrófagos, entre otras células (Taube et al., 2003a). En estudios con ratones deficientes al receptor de TNF- α , cuando se les retaba con el alérgeno, disminuía la incorporación de eosinófilos en el LBA en comparación con los animales normales (Taube et al., 2003). En pacientes con asma se han detectado altos niveles de TNF- α en agregados mucosos, LBA y biopsias, y se le relacionaba principalmente con las crisis agudas (Kips, 2001). En el músculo liso de las vías aéreas, la estimulación con TNF- α ocasiona cambios en su fenotipo, haciendo que éste se active y secrete varios tipos de citocinas y quimiocinas, así como la expresión de moléculas de adhesión en su superficie (Amrani et al., 1999, 2000). Además, en este tipo de células el TNF- α ocasiona cambios en la expresión de receptores y de señales intracelulares de la contracción, lo que puede ocasionar la hiperreactividad (Amrani et al., 2000; Adner et al., 2002).

Una característica importante del TNF- α es que amplifica la respuesta inflamatoria a través de la activación del factor nuclear kappa B (NF κ B), la proteína activadora-1 (AP-1) y otros factores de transcripción (Barnes, 2001). Entre estos factores, el NF- κ B es claramente uno de los más importantes reguladores de la expresión de genes pro-inflamatorios pues promueve la síntesis y la liberación de citocinas, como por ejemplo el TNF- α , y las IL-1 β , IL-5, IL-6 e IL-8 (Holgate, 2000; Tak et al., 2001) así como la expresión de enzimas pro-inflamatorias del tipo de la COX₂ y la iNOS (Barnes, 2003; Tak et al., 2001). La activación del NF κ B incrementa la expresión de moléculas como E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1, permitiendo la adhesión y la migración de leucocitos; además también inhibe la apoptosis de células debido a que regula la expresión de genes anti-apoptóticos lo que genera la persistencia de la inflamación (Tak et al., 2001). Se ha señalado que la activación del NF- κ B esta incrementada en células epiteliales y en

macrófagos en las vías aéreas de individuos con asma, lo que permite que se perpetúe inflamación (Barnes et al., 1998; Hart et al., 1998).

En este estudio se observó que en animales sin sensibilizar, la expresión de TNF- α en las células estudiadas es de ~ 25 %, y que la sensibilización causó un importante incremento en la expresión de este factor en epitelio, macrófagos y granulocitos. Los animales tratados con 5.6 mg/ml de C-PVP presentaron una disminución importante en la expresión de TNF- α en granulocitos y macrófagos, no así en epitelio. Este hallazgo concuerda con la modulación de este factor por la C-PVP observada en otras enfermedades crónicas (Krötzsch-Gómez et al., 1998; Furuzawa-Carballeda et al., 2002). Los agentes que bloquean citocinas tales como TNF- α e IL-1 β , también limitan la activación del NF- κ B e inhiben la cascada inflamatoria (Tak et al., 2001), situación que podría darse en el caso de los animales tratados con C-PVP donde se podría especular como en el caso de otras enfermedades crónicas, que la C-PVP modula la expresión de factores pro-inflamatorios a nivel del NF- κ B (Furuzawa-Carballeda et al., 2002).

El aumento obtenido en el número de macrófagos del LBA por el tratamiento con la C-PVP podría ser perjudicial, pero debido a que la mayoría de los macrófagos de los animales tratados con C-PVP no expresan cantidades importantes del TNF- α , en los cortes histológicos de las vías aéreas, esto nos pudiese indicar que estos macrófagos no tienen actividad pro-inflamatoria.

En el caso de las células epiteliales de las vías aéreas, éstas mostraron una alta expresión del TNF- α debido a la sensibilización crónica. En este sentido, se ha establecido que el epitelio activado puede crear un microambiente que lleva a los ciclos crónicos de inflamación y daño impidiendo el restablecimiento de las vías aéreas, participando activamente en la respuesta inflamatoria en asma (Davies et al., 2002; Cromwell et al., 1992; Bousquet et al., 2000; Barnes, 2003). La realización del LBA después del reto, podría ocasionar la liberación del TNF- α de forma aguda por parte de las células epiteliales. El tratamiento con C-PVP no disminuyó este efecto en los animales sensibilizados.

En resumen, la C-PVP tiende a disminuir la incorporación de eosinófilos y regular la expresión de TNF- α en las vías aéreas después del reto. Los eosinófilos, principales células involucradas en la fisiopatología en asma, se observaron notablemente disminuidos en el LBA, lo que probablemente podría estar reduciendo el daño a las vías aéreas que provocan los productos tóxicos de estas células. La expresión del TNF- α , en macrófagos y granulocitos de las vías aéreas parece estar regulada por la C-PVP y esto podría ser la causa de la disminución en la incorporación de eosinófilos. En conclusión, se necesitan más estudios en un futuro para determinar el efecto general de la C-PVP en la inflamación crónica de las vías aéreas y su posibilidad de su uso como unidad terapéutica en el asma.

Referencias

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology 4th ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company. 2000. 553 p
- Adachi M, Konno S, Gonokami Y, Kobayashi H. Studies on biphasic animal model of asthma--lymphocytes and eosinophils. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 31 Suppl:185-90, 1993.
- Adner M, Rose AC, Zhang Y, SAwård K, Benson M, Uddman R, Shankley NP, Cardell L. An assay to evaluate the long-term effects of inflammatory mediators on murine airway smooth muscle: evidence that TNF α up-regulates 5HT $_{2A}$ -mediated contraction. *British Journal of Pharmacology* 137:971-982, 2002.
- Amrani Y, Lazaar AL, Panettieri RA. Up-Regulation of ICAM-I by cytokines in human tracheal smooth muscle cells involves an NF-kB-dependent signaling pathway that is only partially sensitive to dexamethasone. *The Journal of Immunology* 163: 2128-2134, 1999.
- Amrani Y, Chen H, Panettieri RA. Activation of tumor necrosis factor receptor 1 in airway smooth muscle: a potential pathway that modulates bronchial hyper-responsiveness in asthma? *Respiratory Research* 1:49-53, 2000.
- Barile L, Furuzawa-Carballeda J, Kröttsch-Gomez FE, Espinosa-Morales R, Alcalá M, Díaz de León L. Comparative study of collagen-polyvinylpyrrolidone vs triamcinolone acetate in systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 16:370, 1998.
- Barnes PJ, Lim S. Inhibitory cytokines in asthma. *Mol Med Today* Oct;4(10):452-8, 1998.
- Barnes J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical Science* 94, 557-572, 1998.
- Barnes PJ. Cytokines modulators as novel therapies for airway disease. *European Respiratory Journal*; 18(Suppl. 34):67s-77s, 2001
- Barnes PJ. Pathophysiology of asthma. En: Fabbri L, Chung KF, eds. Asthma. European Respiratory Monograph; 23: 84-113, 2003.
- Benoist C., Mathis D. T-Lymphocyte Differentiation and Biology. En: Paul W. ed. Fundamental immunology 4^a edit. EU, Lippincott Williams & Wilkins, 1998. pp: 1589
- Blease K, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. Chemokines and their role in airway hyper-reactivity. *Respiratory Research* 1: 54-61, 2000.
- Bousquet J, Jeffrey PK, Busse WW, Jonson M, Vignola AM. Asthma, from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1720-1745, 2000.
- Broide DH. Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 108(2):s65-s71, 2001.
- Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. *N Engl J Med* 344:350-62, 2001.
- Chand N, Nolan K, Pillar J, Lomask M, Diamantis W, Sofia RD. Aeroallergen-induced dyspnea in freely moving guinea pigs: quantitative measurement by bias flow ventilated whole body plethysmography. *Allergy* May;48(4):230-5, 1993.

Chávez Alderete, J. Modificación de la función respiratoria inducida por paratión y su relación con la permeabilidad vascular pulmonar en cobayos. Tesis Licenciatura (Biólogo)-UNAM, Facultad de Ciencias. México, 1996. pp: 52

Chimal-Monroy J, Bravo-Ruiz T, Furuzawa-Carballeda GJ, Lira JM, de la Cruz JC, Almazan A, Krotzsch-Gomez FE, Arrellin G, Diaz de Leon L. Collagen-PVP accelerates new bone formation of experimentally induced bone defects in rat skull and promotes the expression of osteopontin and SPARC during bone repair of rat femora fractures. *Ann N Y Acad Sci Oct 23;857:232-6*, 1998.

Chung KF. Pharmacological agents used to treat asthma. En: Fabbri L, Chung KF, eds. *Asthma. European Respiratory Monograph*; 23: 339-375, 2003.

Corry DB, Folkesson HG, Warnock ML, Erle DJ, Matthay MA, Wiener-Kronish JP, Locksley RM. Interleukin 4, but not Interleukin 5 or Eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. *J Exp Med* 183: 109-117, 1996.

Cromwell O, Hamid Q, Corrigan CJ, Barkans J, Meng Q, Collins PD, Kay AB. Expression and generation of interleukin-8, IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by bronchial epithelial cells and enhancement by IL-1 beta and tumour necrosis factor-alpha. *Immunology* 77: 330-337, 1992.

Davies DE, Holgate ST. Asthma: the importance of epithelial mesenchymal communication in pathogenesis. Inflammation and the airway epithelium in asthma. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*; 34: 1520-1526, 2002.

Desquand S, Lefort J, Dumarey C, Vargaftig BB. The booster injection of antigen during active sensitization of guinea-pig modifies the anti-anaphylactic activity of the PAF antagonist WEB 2086. *Br J Pharmacol* 100(2): 217-222, 1990.

Drorbaugh JE, Fenn W. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics* Jul;16(1):81-7, 1955.

Epstein MA, Epstein RA. A theoretical analysis of the barometric method for measurement of tidal volume. *Respiratory Physiology* 32: 105-120, 1978.

Frew AJ. 2003. Allergic basis of asthma. En: Fabbri L, Chung KF, eds. *Asthma. European Respiratory Monograph*; 23: 84-113, 2003.

Furuzawa-Carballeda J, Rodríguez-Calderón R, Díaz de León L, Alcocer-Varela J. Mediators of inflammation are down-regulated while apoptosis is up-regulated in rheumatoid arthritis synovial tissue by polymerized collagen. *Clin Exp Immunol* 130:140-149, 2002.

Furuzawa-Carballeda J, Cabral AR, Zapata-Zuniga M, Alcocer-Varela J. Subcutaneous administration of polymerized-type I collagen for the treatment of patients with rheumatoid arthritis. An open-label pilot trial. *J Rheumatol Feb;30(2):256-9*, 2003.

Furuzawa-Carballeda J, Rojas E, Valverde M, Castillo I, Díaz de León L, Krötzsch E. Cellular and humoral responses to collagen-polyvinylpyrrolidone administered during short and long periods in humans. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 81: 1029-1035, 2003a.

Gagliardo R, Chanez P, Mathieu M, Bruno A, Costanzo G, Gougat C. Persistent Activation of Nuclear Factor B Signaling Pathway in Severe Uncontrolled Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 1190-1198, 2003.

Germain RN. Antigen processing and presentation. En: Paul W. ed. *Fundamental immunology* 4th edit., EU, Lippincott Williams & Wilkins, 1998. 1589p.

Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. Immunology 5th ed. New York, NY., W. H. Freeman and Company. 2003. 551pp

Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, Gelfand EW. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 156:766-775, 1997.

Hargreave FE, Dolovich J, O'Byrne PM, Ramsdale EH, Daniel EE. The origin of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 78(5 Pt 1): 825-32, 1986.

Hart LA, Krishnan VL, Adcock IM, Barnes PJ, Chung KF. Activation and Localization of transcription factor, nuclear factor- κ B, in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 1585-1592, 1998.

Hart PH. Regulation of the inflammatory response in asthma by mast cell products. *Immunology and Cell Biology* 79: 149-153, 2000.

Holgate ST. The role of mast cells and basophils in inflammation. *Clinical and Experimental Allergy* 30(1):28-32, 2000.

Holgate. The epidemic of allergy and asthma. *Nature* 402: B2-B5, 1999.

Holloway JW, Jongepier H, Beghé B, Koppelman GH, Holgate ST, Pöstrma DS. The genetics of asthma. En: Fabbri L, Chung KF, eds. Asthma. European Respiratory Monograph; 23:26-56, 2003.

Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD. The role of allergy in the development of asthma. *Nature* 402:B12-B17, 1999.

Horwitz RJ, Busse WW. Inflammation and asthma. *Clin Chest Med* 16: 583-602, 1995.

Hoshino H, Kobayashi H, Konno S, Okazawa A, Okada Y, Sugauma T, Maruyama S, Adachi M, Takahashi T. Allergen-induced late bronchoconstriction and airway hyperresponsiveness in guinea pigs. *Aerugi* 38(4):314-25, 1989.

Humbert M, Durham SR, Ying S, Kimmitt P, Barkans J, Assoufi B, Pfister R, Menz G, Robinson DS, Kay AB and Corrigan CJ. IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against "intrinsic" asthma being a distinct immunopathologic entity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, Vol 154, No. 5, 11, 1497-1504, 1996.

Humbert M, Kay AB. Chronic inflammation in asthma. En: Fabbri L, Chung KF, eds. Asthma. European Respiratory Monograph; 23, 84-113, 2003.

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: 528-533, 1999.

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Informe de Labores 2002.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Inmunobiología 2ª ed. Masson, España 2003. pp

Jeffery PK, Turato G, Saetta M. Pathology of asthma. En: Fabbri L, Chung KF, eds. Asthma. European Respiratory Monograph; 23: 114-125, 2003.

Kips JC. Cytokines in asthma. *European Respiratory Journal* 18: suppl 34, 24s-33s, 2001.

Kröttsch-Gómez FE, Furuzawa-Carballeda J, Reyes-Marquez R, Quiroz-Hernandez E, Diaz de Leon L. Cytokine expression is downregulated by collagen-polyvinylpyrrolidone in hypertrophic scars. *The Journal of Investigate Dermatology* 11(5):828-834, 1998.

Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, Mathur AK, Cowley HC, Chung KF, Djukanovic R, Hansel TT, Holgate ST, Sterk PJ, Barnes PJ. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 356: 2144-2148, 2000.

Marone G. Asthma recent advances. *Trends Immunology today* 19(1):5-9, 1998.

Murphy S, ed. Expert Panel Report 2. Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. National Institutes of Health (NIH) & National Heart, Lung, and Blood Institute. NIH Publication No. 97-4051 July 1997.

O'Byrne PM. Airway hyperresponsiveness. *CHEST* 123:411S-416S, 2003.

Romanowsky D. Zur frage der parisitologie und therapie der malaria. *St Petersb Med Wschr* 16: 297-302, 1981.

Romanowsky D. Zur frage der parisitologie und therapie der malaria. *St Petersb Med Wschr* 16: 307-315, 1981a.

Rosenberg HF., Gallin JJ. Inflammation. En: Paul W. ed. *Fundamental immunology* 4^a edit., EU, Lippincott Williams & Wilkins. 1998. 1589p.

Sampson AP. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clinical and Experimental Allergy* 30: 22-27, 2000.

Sánchez Fuentes N. Efecto del amortiguador de citratos en la respuesta de broncoconstricción e hiperreactividad de las vías aéreas del cobayo. Tesis Licenciatura (Bióloga)-UNAM, Facultad de Ciencias. México, 2004. pp: 46.

Santing RE, Olymulder CG, Zaagsma J, Meurs H. Relationships among allergen-induced early and late phase airway obstructions, bronchial hyperreactivity, and inflammation in conscious, unrestrained guinea pigs. *J Allergy Clin Immunol* 93(6):1021-30, 1994.

Tak PP, Firestein GS. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *The Journal of Clinical Investigation* 107(1):7-11, 2001.

Takeda H, Kogame A, Tanaka H, Nagai H. Time course study for airway inflammation and responsiveness by repeated provocation of aeroantigen in guinea pigs. *Prostaglandins* 54(5):805-20, 1997.

Taube C, Dakhama A, Takeda K, Nick JA, Gelfand EW. Allergen-Specific Early Neutrophil Infiltration After Allergen Challenge in a Murine Model. *CHEST* 123: 410S-411S, 2003.

Taube C, Dakhama A, Rha Y, Takeda K, Joetham A, Park J, Balhorn A, Takai T, Poch KR, Nick JA, Gelfand EW. Transient neutrophil infiltration after allergen challenge is dependent on specific antibodies and Fc γ III receptors. *The Journal of Immunology* 170:4301-4309, 2003a.

Toward TJ, Broadley KJ. Early and late bronchoconstrictions, airway hyper-reactivity, leucocyte influx and lung histamine and nitric oxide after inhaled antigen: effects of dexamethasone and rolipram. *Clin Exp Allergy* 34(1):91-102, 2004.

Ville CA. *Biología* 8^a edición. McGraw-Hill Interamericana editores, México 1996, 943pp

Virrey MA, Battram CH, Woodman P, McCluskie K, Belvisi MG. Dissociation by steroids of eosinophilic inflammation from airway hyperresponsiveness in murine airways. *Respiratory Research* 4(1):3-9, 2003.

Walls AF, Rhee YK, Gould DJ, Walters C, Robinson C, Church MK, Holgate ST. Inflammatory mediators and cellular infiltration of the lungs in a guinea pig model of the late asthmatic reaction. *Lung* 169(4):227-40, 1991.

West, JB. Fisiología respiratoria, 6ª edición. Editorial Medica Panamericana, Argentina 2002. pp: 192.

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

Yañez R, Ceballos G. Inflamación en la reacción alérgica. En: Cortés JL., ed. Asma Bronquial: concepto moderno. México, D.F., Instituto Politécnico Nacional y Fondo de Cultura Económica, 2000. 302p