



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CAMBIOS ESPONTÁNEOS DE
LOS PATRONES RESPIRATORIOS DEL COBAYO
DURANTE LA PLETISMOGRAFIA BAROMÉTRICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

EDGAR SÁNCHEZ GUERRERO

TUTORA
DRA. BLANCA MARGARITA BAZAN PERKINS



2007



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.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Generalidades del Aparato Respiratorio	2
Mecánica respiratoria	4
La resistencia de las vías aéreas	6
La pletismografía barométrica	7
Control del tono de la vía aérea	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO	14
MATERIAL Y MÉTODOS	15
Animales	15
Diseño experimental	15
Pletismografía	15
Análisis estadístico	17
RESULTADOS.....	18
DISCUSIÓN	19
CONCLUSIÓN	26
REFERENCIAS	27

RESUMEN

El estudio de las funciones pulmonares en animales de laboratorio es esencial en la investigación de las enfermedades del aparato respiratorio. Sin embargo, los métodos más precisos para la determinación de las funciones pulmonares requieren que el animal esté anestesiado, traqueotomizado y muscularmente paralizado. Una alternativa no invasiva para medir la función pulmonar en animales conscientes es la pletismografía barométrica para animales en libre movimiento. No obstante, debido a que el animal está consciente, no se sabe si es necesario habituarlo a las condiciones de registro pletismográfico, antes de empezar a tomar en cuenta los datos obtenidos. En este trabajo se registró la frecuencia respiratoria (fR) y el índice de broncoobstrucción (íB) utilizando la técnica de pletismografía barométrica en cobayos conscientes en libre movimiento durante 8 h. En comparación con los valores basales, durante la primera hora de registro se observó un incremento progresivo del íB (~25-50%) y un decremento en espejo de la fR. Los valores alcanzados al final de la primera hora no se modificaron en las siguientes siete horas de registro y éste fenómeno es más evidente si se repiten las sesiones de pletismografía en días consecutivos. El tratamiento con propranolol (1.3 mg/Kg, i.m.) y L-NAME (0.5 mg/ml, i.m.) 30 min antes de la pletismografía provocó que el íB basal fuera similar al que se alcanza a la hora de registro en los animales control. La administración de atropina (1 mg/Kg, i.p.), salbutamol (30 µg/Kg, i.p.) y budesonida (0.25 mg/ml, aerosoles) no modificó el incremento progresivo del íB. Adicionalmente, ningún tratamiento modificó la fR. Estos resultados sugieren que la adrenalina y el óxido nítrico son liberados cuando los cobayos son introducidos en la cámara de registro pletismográfico probablemente como una consecuencia del estrés generado por la manipulación de los animales. Es posible que esta liberación desaparezca gradualmente debido a la habituación del cobayo a la cámara, provocando un incremento progresivo en el íB hasta que se estabiliza aproximadamente a la hora. Estos cambios espontáneos en el íB y la fR deben de ser tomados en cuenta durante la pletismografía barométrica de animales conscientes con el fin de evitar una mala interpretación de los resultados.

INTRODUCCIÓN

Durante la respiración celular, las mitocondrias de los seres vivos continuamente consumen O_2 y liberan CO_2 . El aparato respiratorio es la ruta por la cual los animales suministran el O_2 ambiental necesario para la respiración celular, y en contrasentido, se encarga también de eliminar el CO_2 tisular. Este proceso fisiológico, conocido como respiración, engloba los siguientes mecanismos (Weibel, 1985):

1. Ventilación: Mecanismo que regula la renovación de gases en el pulmón.
2. Difusión: Paso de O_2 del alveolo a la sangre y del CO_2 de la sangre al aire alveolar.
3. Perfusión: Sistema distribución sistémica de los gases a los tejidos.

Generalidades del aparato respiratorio

El aparato respiratorio consta de las vías aéreas y los pulmones. 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 en el pulmón (Fig. 1; West, 2002). Las vías aéreas se pueden dividir en superiores e inferiores.

Las vías aéreas superiores, o centrales, están formadas por las narinas, boca, faringe, laringe y tráquea. Las inferiores, están dentro de los pulmones y constan principalmente de bronquios y bronquiolos. A las vías aéreas de conducción se les conoce también como espacio muerto anatómico pues no tienen función de intercambio gaseoso.

Estructuralmente las vías aéreas están constituidas por una capa interna epitelial, una capa externa de tejido conectivo y una capa media cartilaginosa en forma de anillos en la tráquea y de placas en los bronquios, así como fibras musculares lisas (Ville, 1996). El epitelio de las vías aéreas se caracteriza por ser mucociliar y funciona calentando el aire y filtrando partículas extrañas.

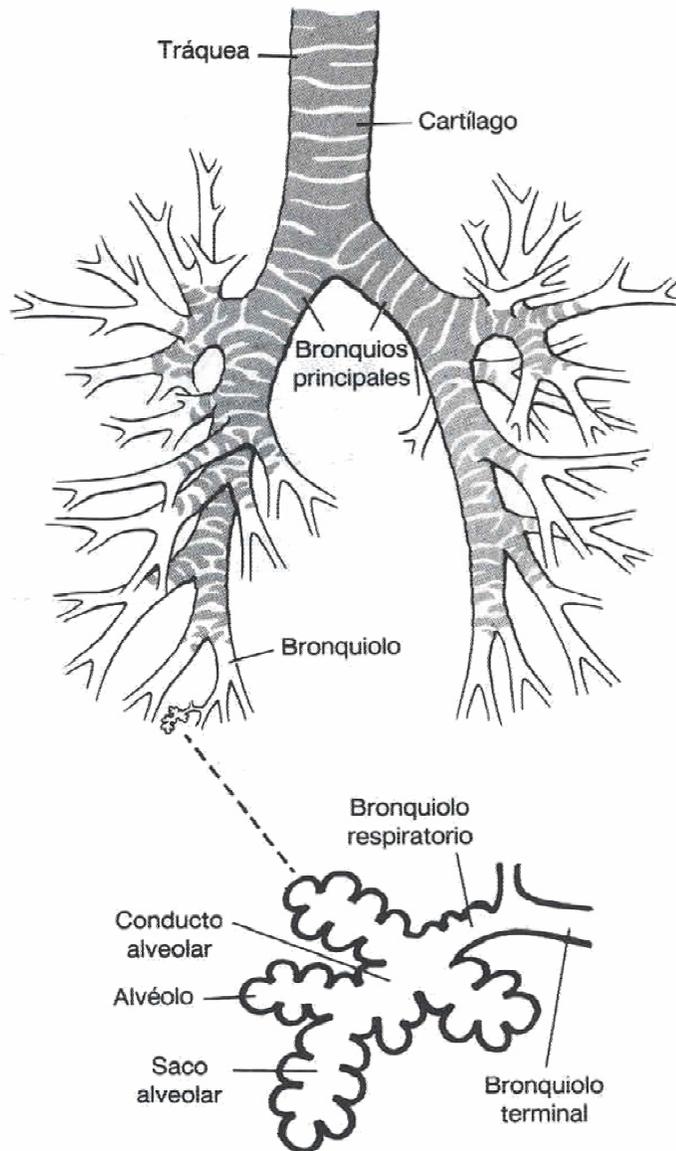


Figura 1. Estructura de las vías aéreas de mamífero. Tomado de Eckert y Randall, 1991.

Los pulmones son dos órganos cónicos recubiertos de dos capas membranosas llamadas pleura visceral y parietal. En la parte interna de los pulmones se encuentran, además de los bronquios y bronquiolos terminales y respiratorios, $\sim 3 \times 10^8$ alvéolos organizados en sacos interconectados y cerrados por un extremo. El diámetro de un alveolo es de ~ 0.33 mm, lo que genera en su conjunto una superficie total equivalente a 85 m^2 y un volumen de 2.5 a 3 L. Esta superficie representa la porción respiratoria pulmonar, ya que en ellos se da el intercambio de gases a nivel del acino, estructura formada por el bronquiolo respiratorio y sacos alveolares (Weibel, 1985; West, 2002).

Mecánica Respiratoria

La respiración es un evento cinético y cíclico, dado básicamente por la contracción del diafragma asistida por los músculos intercostales. El resultado es un aumento del volumen de la caja torácica lo que crea una presión alveolar inferior a la atmosférica que se va compensando con la entrada de aire a los pulmones (flujo inspiratorio). La relajación de estos músculos inspiratorios y las propiedades elásticas del parénquima pulmonar (tejido blando formado por los alvéolos) provocan el restablecimiento pasivo de la posición inicial y la salida del aire de los pulmones (flujo espiratorio). La cantidad total de aire impulsado fuera o dentro de los pulmones en cada ciclo respiratorio se denomina *volumen corriente* (VC; Fig. 2). Si un animal realiza una inspiración máxima seguida por una espiración máxima, el volumen

exhalado representaría a la *capacidad vital* (CV). Existe una cantidad de aire remanente tanto en alvéolos, como en otras estructuras de la vía aérea que no puede ser intercambiado produciendo un espacio fisiológico denominado muerto (~150 ml en humanos). Este volumen de aire que permanece atrapado en los pulmones es el *volumen residual* (VR). Así la suma de todos estos volúmenes constituye la *capacidad pulmonar total* (CPT) que representa la cantidad total de aire contenida en los pulmones cuando se hallan totalmente distendidos. El volumen pulmonar al final de una espiración normal, cuando los músculos de la respiración están completamente relajados se llama capacidad residual funcional (CRF). La frecuencia respiratoria (fR) es el número de respiraciones por minuto. El producto del VC por la fR equivale al *volumen minuto*. La fuerza de contracción de los músculos inspiratorios y la *duración de la inspiración* controlan el VC. La espiración normalmente es pasiva durante el tiempo disponible. Todos estos parámetros respiratorios varían dependiendo de la especie, la raza, la edad, la talla, el peso o el sexo de los animales (Weibel, 1985; West, 2002; Ville, 1996).

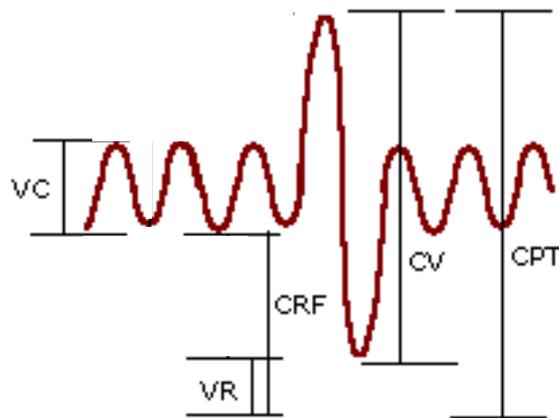


Figura 2. Volúmenes pulmonares durante varios ciclos respiratorios.

La resistencia de las vías aéreas

La circulación de aire por un tubo (como la traquea) depende de la diferencia de presión entre los extremos del tubo (Fig. 3). Esta diferencia de presión puede cambiar de acuerdo a la velocidad y a la viscosidad del fluido. Cuando la circulación del aire es lenta, el flujo es laminar debido a que la corriente que se forma es paralela a las paredes del tubo (Fig. 3). Las turbulencias en la corriente se presentan si la velocidad del flujo se incrementa en tubos ramificados, de diámetro variable y con irregularidades en sus paredes como los bronquios.

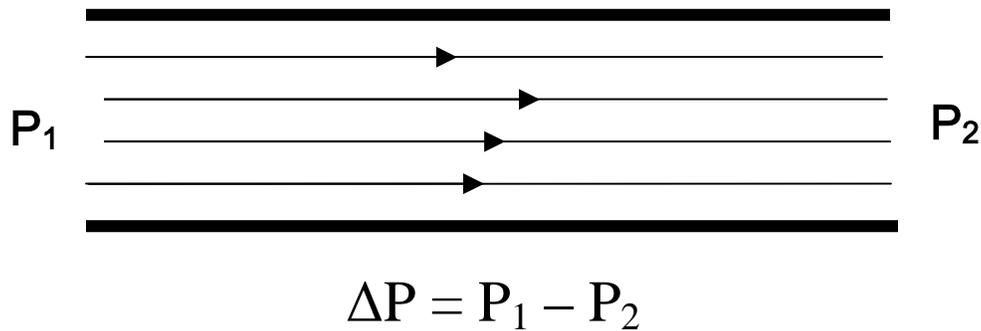


Figura 3. Flujo aéreo laminar. La resistencia es $R = P / \text{velocidad del flujo}$.

Gracias a que el sistema de tubos del árbol bronquial presenta una disminución progresiva del calibre, las turbulencias generadas corriente arriba por las múltiples ramificaciones y las superficies irregulares, se propagan muy poco corriente abajo y tienden a desaparecer. Debido a este fenómeno, en las vías aéreas inferiores el flujo de aire es netamente laminar. De hecho las verdaderas turbulencias solo son frecuentes en la traquea, principalmente durante el ejercicio (West, 2002).

La resistencia (R) al flujo de aire en el pulmón, que depende en gran forma de las diferencias de presión (Fig. 3), es un importante indicador de alteraciones en la fisiopatología respiratoria. La resistencia pulmonar total (RL) engloba a la resistencia de la pared torácica o intrapleural, a la resistencia de las vías aéreas (Raw) y a la resistencia viscosa (producida por los fluidos alveolares) del tejido pulmonar (RT). De estas el ~80% de la RL corresponde a la Raw.

La Raw se puede obtener restando la presión alveolar a la de la boca y dividiéndola por la velocidad del flujo del aire. Un manómetro nos puede permitir determinar la presión de la boca cómodamente, sin embargo para determinar la presión alveolar es necesario contar con equipos mas complejos como el de pletismografía barométrica (West, 2002). El pletismógrafo barométrico (Fig. 4) consiste de una cámara con un flujo controlado y constante de aire donde se introduce al individuo en estudio y en el que se pueden medir entre otros parámetros, cambios de volumen y de presión durante la respiración.

La pletismografía barométrica

La pletismografía barométrica es una valiosa herramienta para el estudio de las funciones pulmonares (Chávez y col., 1996; Chong y col., 1998; Hamelmann y col., 1997; Lomask 2006) de animales en libre movimiento (Fig. 4), cuantifica, entre otras cosas, el índice de broncoobstrucción (íB) o Penh, por sus siglas en ingles (enhanced pause) el cual se ha correlacionado con la RL en ratones *wild-type* BALB/c (Adler y col., 2004). Otros autores han sugerido que el íB es un indicador valido de la Raw específica (obtenida mediante

traqueotomía) en cobayos anestesiados y mecánicamente ventilados (Bergren, 2001; Chong y col., 1998; DeLorme y Moss, 2002). Adicionalmente Bergren (2001) observó que existe una correlación entre el incremento de íB con la, la disnea y la cianosis. Actualmente se le conoce como un indicador de broncocontracción en varias especies (Lomask, 2006).

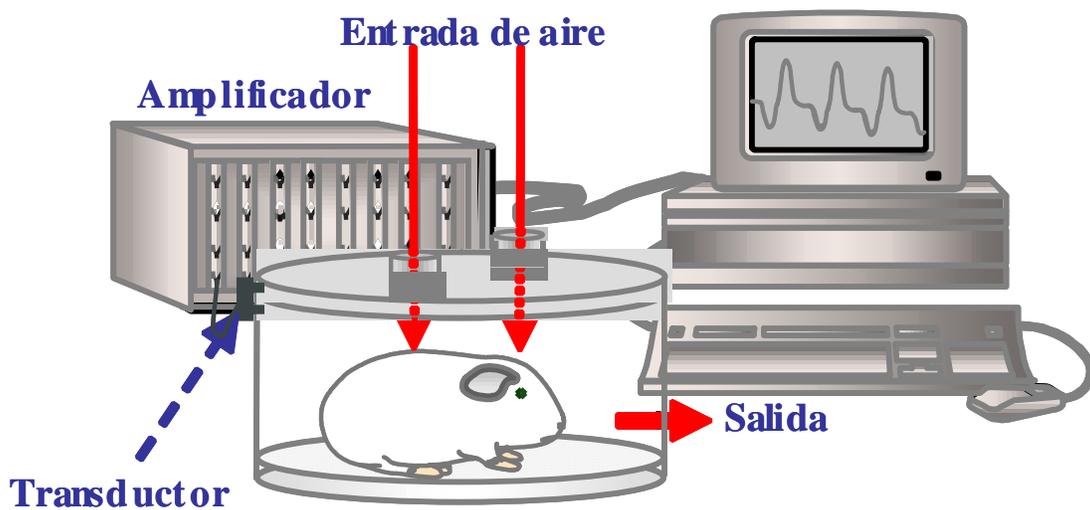


Figura 4. Dibujo del equipo de pletismografía barométrica para animales en libre movimiento. En la figura se ejemplifica a un cobayo dentro de una cámara de pletismografía barométrica. Para medir los cambios de presión generados dentro de la cámara se utiliza un transductor de presión diferencial que registrara dichos cambios con relación a la presión atmosférica que es constante. La señal generada por los transductores es transferida a un amplificador y posteriormente hacia una computadora para su procesamiento.

El íB se basa teóricamente en lo siguiente: Cuando el aire ambiental ingresa a los pulmones se calienta de $\sim 25^{\circ}\text{C}$ a 37°C y se humidifica hasta el 100%. En los sensores de la cámara de pletismografía (Fig. 4), este incremento en el volumen del aire torácico es registrado como un aumento en la presión en el interior de la cámara. Este incremento en la presión es temporal, pues disminuye

conforme el cobayo exhala el aire. Debido a que el aire exhalado pierde humedad y temperatura rápidamente, durante la exhalación baja el volumen del aire y esto se registra como una disminución en la presión. De esta manera, aunque el transductor no mide directamente los flujos espiratorios e inspiratorios, un programa computacional puede calcular el flujo de manera indirecta evaluando los cambios de presión durante la inspiración y espiración (DeLorme & Moss, 2002). La información es procesada para dar el valor del íB (Fig. 5), que es obtenido con la siguiente fórmula que ha sido corroborada por diferentes autores (Hamelmann y col., 1997):

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

Donde:

Te = Tiempo espiratorio (s)

Tr = Tiempo de relajación (s)

PFE = Pico de flujo espiratorio (presión positiva máxima, cmH₂O)

PFI = Pico de flujo inspiratorio (presión negativa máxima, cmH₂O)

Los fundamentos del íB se basaron en parámetros empíricos observados inicialmente para caracterizar las respuestas obstructivas de las vías aéreas ante un estímulo antigénico en cobayos inmunizados (Chand y col., 1993). En estos estudios se determinó que durante la obstrucción de las vías aéreas la espiración es más prolongada (Chand y col., 1993; Hamelmann y col., 1997) y conforme a la fórmula de Hamelmann y colaboradores (1997), esto incrementa el valor del íB.

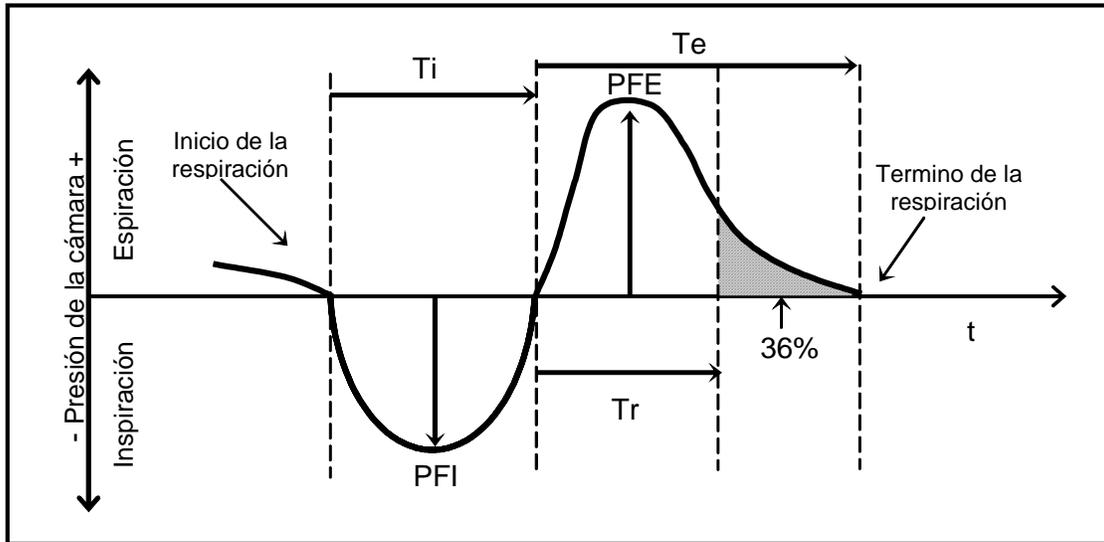


Figura 5. Esquema de una onda de presión dentro de la cámara durante la inspiración y la espiración en un ciclo respiratorio obtenido mediante pletismografía barométrica en un animal en libre movimiento. El tiempo inspiratorio (T_i), es el intervalo de tiempo ocurrido desde el inicio de la inspiración 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 y col., 1997.

Un importante mecanismo que puede producir variaciones en la Raw así como del \dot{V}_B , son los cambios del tono del músculo liso de las vías aéreas (MLVA). El tono del MLVA esta a cargo del sistema nervioso autónomo.

Control del tono de la vía aérea

El sistema nervioso autónomo puede regular el calibre de la vía aérea mediante la innervación del MLVA simpática y parasimpática, esta última mediante el nervio vago. Cuando se activan, estos nervios pueden contraer al MLVA *in vivo* o *in vitro*, o pueden relajar completamente una vía aérea precontraída. La principal innervación

que induce contracción del MLVA es parasimpática y colinérgica, a través de los receptores muscarínicos, y la principal innervación relajante comprende también nervios parasimpáticos pero del tipo no-adrenérgicos no-colinérgicos inhibitorios (iNANC) que liberan óxido nítrico (NO) y al péptido vasoactivo intestinal (Fig 6) (Diamond y Altieri, 1988; Fischer y col., 1993). Aunque comunes en origen, estos nervios parasimpáticos son anatómicamente y fisiológicamente distintos y son regulados por diferentes reflejos (Brendan y col., 2001).

En el cobayo se ha observado que los nervios parasimpáticos colinérgicos y NANC están tónicamente activos (Canning y Udem, 1997; Kesler y Canning, 1999). Esta activación permite mantener el tono de la vía aérea en condiciones basales.

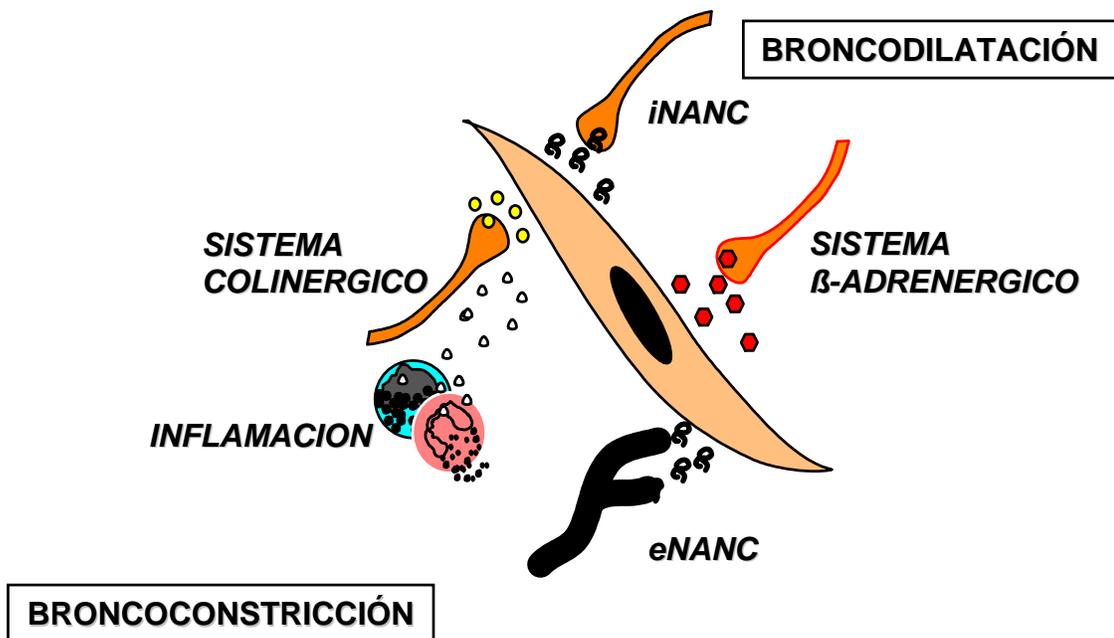


Figura 6. Representación esquemática del control del tono de la vía aérea. Las vías aéreas están inervadas por cuatro sistemas nerviosos: el β -adrenérgico, el colinérgico, el no-adrenérgico no-colinérgico inhibitorio (i-NANC), y NANC excitatorio (e-NANC). La liberación de acetilcolina está influenciada por mediadores químicos provenientes de células inflamatorias.

La liberación de acetilcolina de los nervios colinérgicos esta influenciada por neurotransmisores como las sustancia P (SP) que forma parte del sistema NANC excitatorio (eNANC; ver Fig. 6) y la serotonina, histamina y derivados del ácido araquidónico (producido por la acción de la fosfolipasa A₂), como las prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) y leucotrienos (LT) que son liberados por células inflamatorias (Kakuyama y col., 1999). Estas sustancias pueden inducir la contracción en el MLVA mediante los receptores NK para la SP, H₁ para la histamina, 5-HT_{2A} y 5-HT_{1A} para la serotonina, TP para el TX A₂ y las PG F1α y F2α , y cys-LT₁ para el LT D₄ (Devillier y Bessard, 1997; Barnes, 1997). Adicionalmente, algunos de estos mediadores químicos pueden inducir relajación del MLVA mediante los receptores EP para la PG F3α y E2 (Janssen y col., 2000).

También se ha descrito que los nervios simpáticos adrenérgicos cuyo principal receptor en el MLVA es β₂-adrenérgico, pueden contribuir en el tono del MLVA, aunque su participación es mínima (Canning y Fischer, 2001).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La pletismografía barométrica es una valiosa herramienta de la fisiología respiratoria que nos permite evaluar diferentes parámetros de la función pulmonar de manera repetitiva y prolongada, sin restricción de movimientos corporales y en ausencia de interferencias farmacológicas por agentes anestésicos. No obstante, es posible que los animales se estresen y vuelven ansiosos cuando son introducidos a nuevos ambientes, fenómeno que podría reducirse progresivamente durante la habituación. El período de habituación es importante en estudios conductuales, como el sueño, pero raramente se menciona en experimentos de fisiología respiratoria. En este contexto, es razonable especular que los patrones respiratorios, los cuales son altamente influenciados por el estrés y las emociones (Rietveld y col., 1999), pudiesen variar durante la pletismografía barométrica.

HIPÓTESIS

Si el patrón respiratorio es influenciado por el estrés entonces este patrón podría variar cuando los cobayos son introducidos a un nuevo ambiente como el de las cámaras de pletismografía barométrica.

OBJETIVO

Evaluar los cambios espontáneos en la f_R y el i_B durante la pletismografía barométrica de cobayos en libre movimiento.

Determinar si estos cambios dependen de la liberación de algún mediador químico involucrado en el control del tono de la vía aérea.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron cobayos macho raza Hartley (500.3 ± 10.9 g). Los animales se mantuvieron bajo las condiciones estándar del bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER): 12/12 de ciclo luz y oscuridad, aire filtrado a $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 50-70 % humedad y cama esterilizada. Se alimentaron con croquetas para cobayo (Harlan S.A. de C.V.) y agua esterilizada *ad libitum*. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ético y Científico del INER.

Diseño experimental

En estudios piloto observamos cambios espontáneos en el íB y la fR, y que estos cambios se desarrollaron de manera más evidente después de varias sesiones de pletismografía. Todos los cobayos estudiados tuvieron cinco sesiones previas al inicio del tratamiento, cada una en diferentes días consecutivos. En cada sesión, cada cobayo fue introducido en una cámara de pletismografía barométrica para animales en libre movimiento (Fig. 4) donde se obtuvo, después de 5 min de habituación, un registro basal durante 5 min. En la sexta sesión, los cobayos recibieron su respectivo tratamiento farmacológico y 30 min después fueron reintroducidos en la cámara pletismográfica para reiniciar un registro continuo de 8 h. Los parámetros respiratorios fueron inicialmente registrados por 5 min, luego cada 10 min durante la primer hora, y finalmente cada 15 min el tiempo restante. Los registros pletismográficos siempre se iniciaron entre las 10:00 y 11:00 h am para evitar cambios circadianos o ultradianos en los animales

(Sommer y col., 1998). Una vez terminados los registros, los animales fueron regresados al bioterio. Los respectivos pretratamientos farmacológicos consistieron en la administración intraperitoneal de 1 mg/Kg de atropina (Puede relajar al MLVA al bloquear a los receptores muscarínicos colinérgicos), 30 μ g/Kg de salbutamol (Puede relajar al MLVA al actuar como agonista de los receptores β_2 -adrenérgicos), 0.5 mg/Kg de L-NAME (Evita la relajación inducida por NO al inhibir su biosíntesis) o 3.1 mg/Kg de propranolol (Puede evitar la relajación del MLVA al antagonizar a los receptores β_2 -adrenérgicos). Un grupo adicional de cobayos recibieron la combinación de L-NAME más propranolol y otro grupo de cobayos recibieron aerosoles de budesonida (0.25 mg/ml) durante 5 min. La budesonida es un antiinflamatorio esteroideo que induce la síntesis de lipocortina 1, polipéptido que inhibe a la fosfolipasa A2, enzima clave en la producción de PG, TX, LT, factor activador de plaquetas, interleucina 5 y factor de necrosis tumoral α (Lorenzo y col., 2005). Nosotros corroboramos que las dosis seleccionadas de atropina y salbutamol fueron suficientes para provocar el desplazamiento estadísticamente significativo de la curva concentración-respuesta de acetilcolina. Las dosis de los demás grupos fueron seleccionadas de acuerdo con reportes previos (Shindoh y col., 1998; Montaña y col., 1987; Wennergren y col., 1996). Cada grupo experimental fue integrado por 4 cobayos. Debido a que contamos con 4 cámaras de pletismografía, simultáneamente estudiamos 2 cobayos experimentales y 2 controles. A los controles se les administro intraperitonealmente o vía aerosoles, solución salina fisiológica según fuera requerido.

Pletismografía

Se utilizó un pletismógrafo barométrico para animales en libre movimiento de Buxco Electronics (Troy, NY). La cámara fue provista de un flujo de aire continuo, que no modifica la señal respiratoria, durante todo el experimento (10 ml/s). Los principios de esta técnica ya han sido descritos previamente (Drorbaugh y Fenn, 1955; Epstein y Epstein, 1978; Hamelmann y col., 1997, Chavez y col., 1996). De manera breve, 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 se registraron con un transductor de presión diferencial (SCXL004DN SenSym, Milpitas, CA, EU), conectado a un preamplificador. La señal generada fue procesada y analizada continuamente por un software (Buxco Biosystem XA v1.1) instalado en 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).

El programa de captura de datos fue ajustado para incluir solamente volúmenes corrientes de 1 ml o más, con un tiempo espiratorio mínimo de 0.15 s, tiempo inspiratorio de 3 s y una diferencia máxima entre los volúmenes inspiratorios y espiratorios del 10%. Este ajuste de estos parámetros en el programa se realizó con el fin de evitar incluir artefactos en los registros. De esta forma aproximadamente del 7 al 10% de las respiraciones de cada período fueron eliminadas y estas se generaron principalmente por movimientos del cobayo. Para evitar la influencia de eventos externos

al estudio y al mismo tiempo mantener la posibilidad de detectar los cambios agudos, cada valor de \dot{V}_B usado en este estudio es el promedio de cada 15 s de lecturas y, de estas, el promedio de los últimos 5 min de cada período.

La temperatura y las concentraciones de CO_2 dentro de la cámara pletismográfica fueron continuamente monitoreadas en los controles con un termómetro digital y un capnógrafo (Novamatrix, Medical Systems Inc., CT), respectivamente.

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de t de Student t para evaluar los cambios en el \dot{V}_B y la f_R para compararlos con sus respectivos valores basales. En comparaciones múltiples se utilizó una ANOVA seguida de la prueba de Tukey o Dunnett, según correspondiera. La significancia estadística se estableció en dos colas con una $p < 0.05$. Los datos en el texto y las figuras fueron expresados como el promedio \pm error estándar.

RESULTADOS

Los valores basales del \dot{V}_B y de la f_R en todos los controles estudiados fueron de 0.268 ± 0.007 y de 114.4 ± 3.1 respiraciones/min, respectivamente ($n= 20$). Después de colocar a cada uno de los cobayos en las cámaras pletismográficas, todos los animales del grupo control mostraron un incremento gradual en el \dot{V}_B alcanzando entre un 25 y un 50%, y con un decremento progresivo de la f_R . Estos cambios ocurrieron principalmente durante la primer hora de registro, y no se registraron cambios después de la segunda hora de registro (Fig. 7) Los cambios observados en ambas variables en los animales control siempre fueron en espejo, es decir que mientras el \dot{V}_B variable se incrementó, la f_R disminuyó. Aunque los cambios en el \dot{V}_B y la f_R se observaron desde la primera vez en que los animales fueron sometidos a la sesión pletismográfica, estos fueron progresivamente mas notables en las sesiones subsecuentes, y fueron completamente manifestados desde la quinta o sexta sesión, los valores se obtuvieron en porcentaje con respecto a la basal (Fig. 8). Posteriormente, todos los experimentos farmacológicos fueron realizados en animales con al menos cinco sesiones pletismográficas previas.

La administración intraperitoneal de atropina o salbutamol no modifico los cambios espontáneos en el \dot{V}_B y la f_R de los animales control a los que solo se les administro solución salina (Fig. 9A). Asimismo, la inhalación de budesonida (inhibidor del metabolismo del ácido araquidónico) tampoco modifico esas variables en comparación al grupo control que solo recibió aerosoles de solución salina (Fig. 9B). El propranolol y el L-NAME solo causaron un moderado incremento no

significativo en el íB desde el inicio del registro en comparación a los controles. Sin embargo, la combinación del L-NAME con el propranolol provocaron que los valores del íB fueran mayores que la basal en los primeros 20 min de registro (Fig. 9C).

Las concentraciones de CO₂ en el interior de la cámara pletismográfica no cambiaron a lo largo del estudio ($n=4$). Aunque la temperatura en el interior de la cámara se incremento ligeramente (~1-2 °C) cuando el cobayo fue introducido, esta variación ocurrió dentro de los primeros minutos (~5 min), sin variar en el resto del estudio.

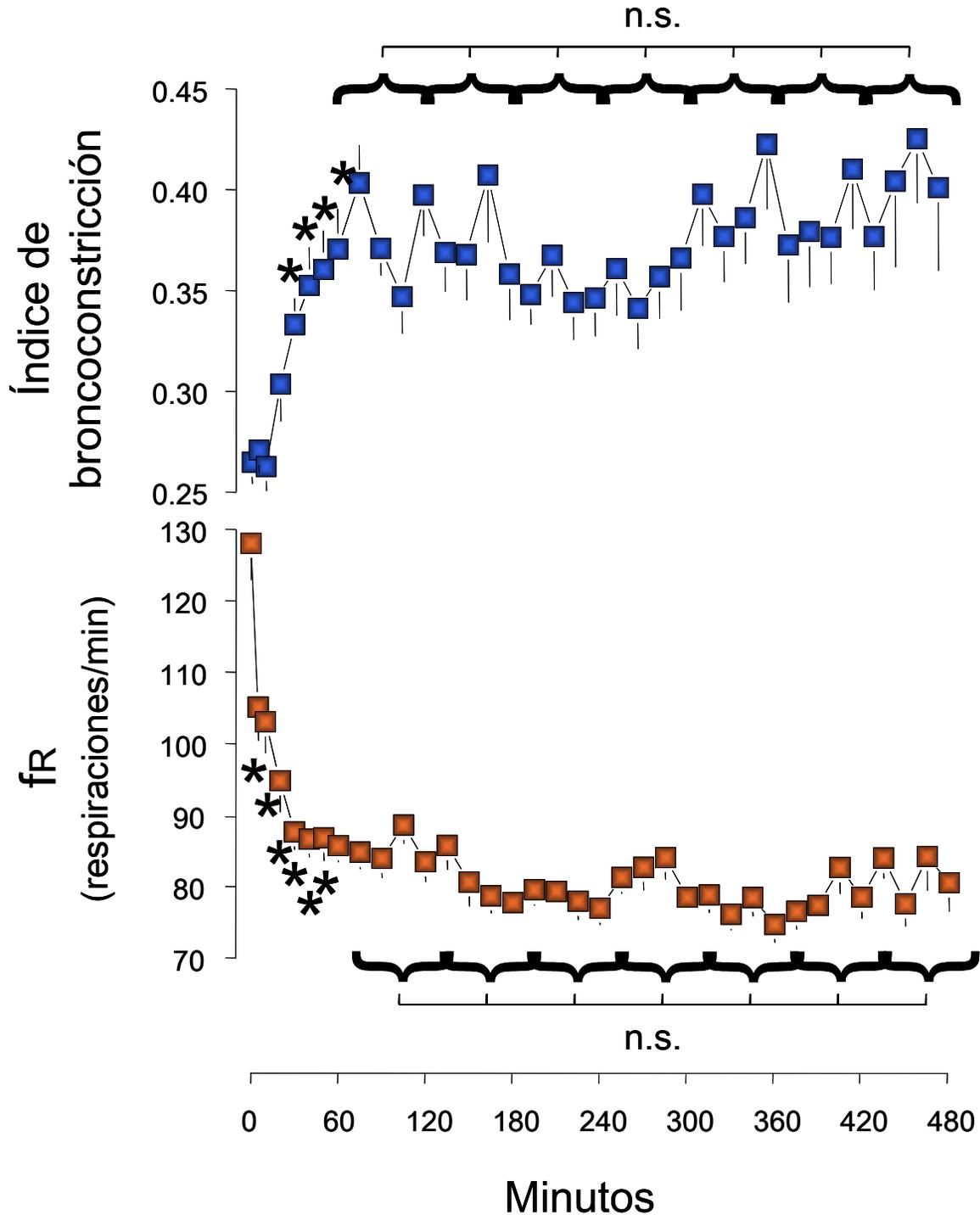


Figura 7. Cambios en el índice de broncoconstricción y en la frecuencia respiratoria (fR) durante el quinto registro pletismográfico de 8 h continuas en cobayos. Los símbolos corresponden a los promedios de 19 animales. * $p < 0.05$ con respecto al valor basal (tiempo 0; prueba pareada de t de Student). n.s.= diferencias no significativas entre intervalos promediados de 1 h (ANOVA y prueba de Tukey).

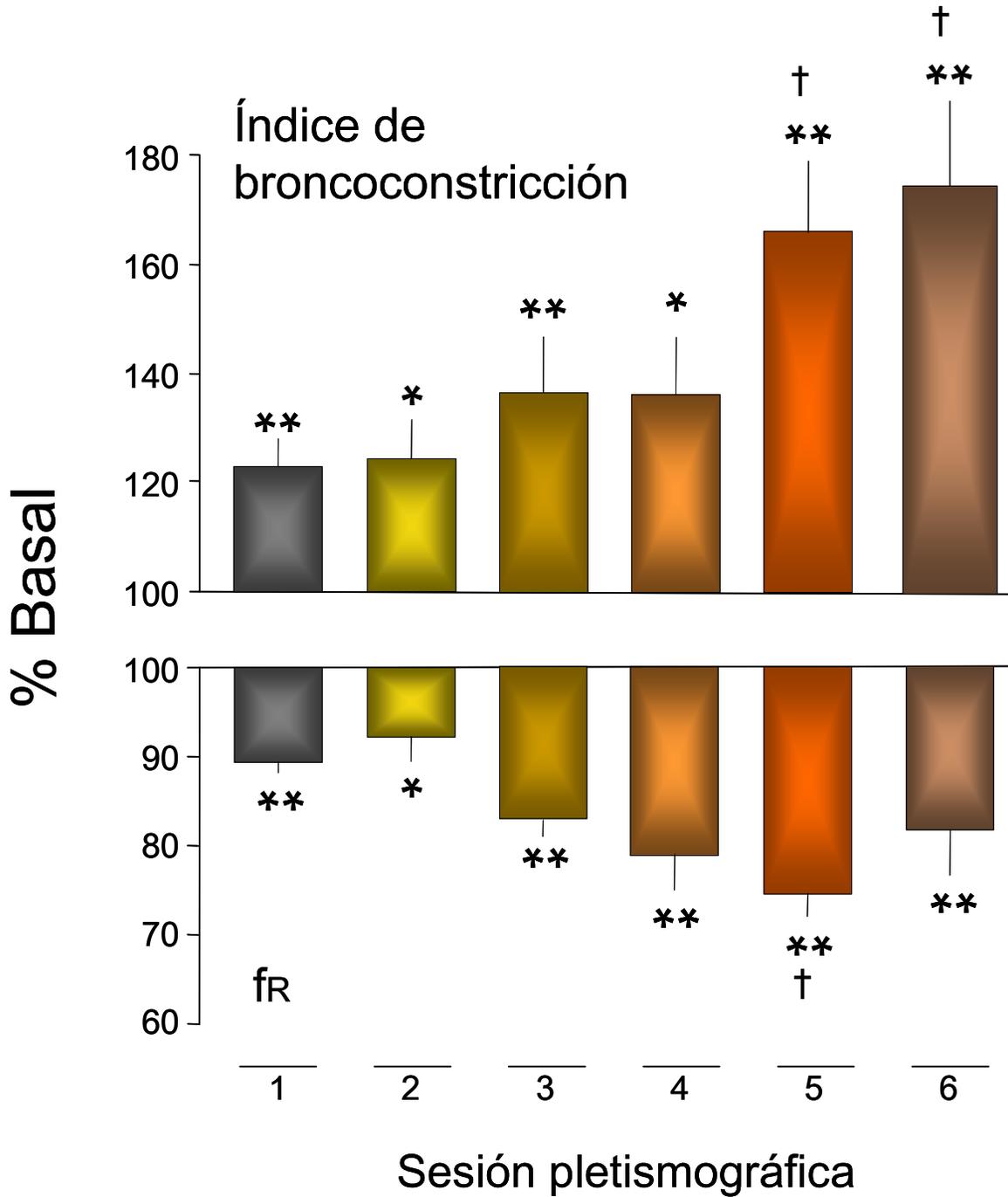


Figura 8. Porcentajes con respecto a la basal inicial del índice de broncoconstricción y la frecuencia respiratoria (fR) durante las últimas 5 h de pletismografía barométrica en cobayos repetitivamente introducidos en la cámara pletismográfica. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ con respecto a su valor basal (prueba pareada de t de Student). † $p < 0.05$ comparado con la sesión 1 (ANOVA y prueba de Dunnett). Las barras corresponden al promedio de 4 cobayos.

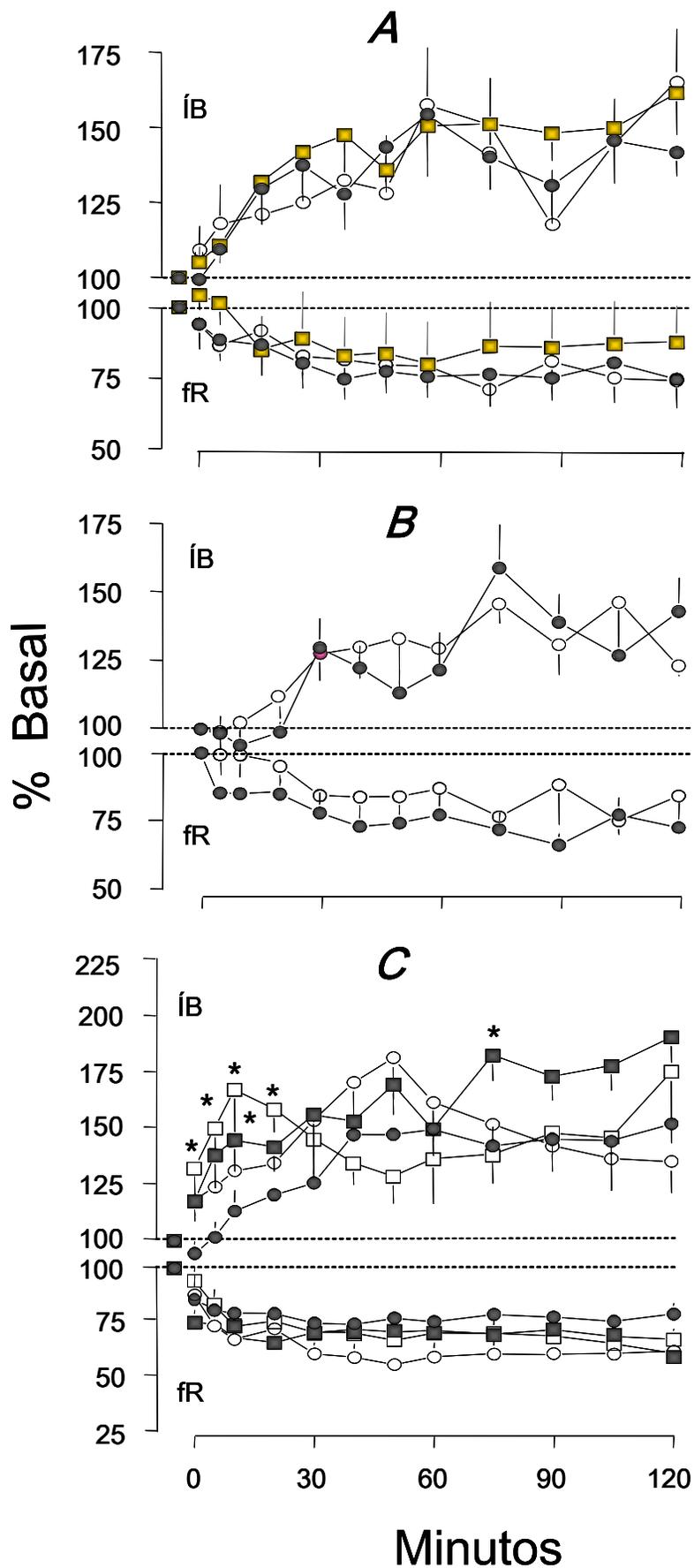


Figura 9. Efecto de diferentes tratamientos farmacológicos previos en el índice de broncoconstricción (ÍB) y la frecuencia respiratoria (fR) durante las primeras 2 horas de pletismografía barométrica. Los cobayos experimentales recibieron: (A) 30 µg/Kg i.p. de salbutamol (Círculos vacíos), 1 mg/Kg i.p. de atropina (Cuadros) (B) 0.25 mg/ml de budesonida en aerosol (Círculos vacíos); y (C) 0.5 mg/Kg i.p. de L-NAME (Círculos vacíos), 1.3 mg/Kg i.p. de propranolol (Cuadros llenos), o la combinación de ambos (Cuadros vacíos). Los grupos control (Círculos llenos) de cada grupo experimental recibieron sus correspondientes tratamientos simulados (sham). * $p < 0.05$ en comparación al grupo control (ANOVA y prueba de Dunnett).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados mostraron que cuando los cobayos son sometidos de manera repetitiva a la pletismografía barométrica para animales conscientes, experimentan cambios agudos en su función respiratoria. Estos cambios transitorios del patrón respiratorio podrían ser resultado del estrés producido por encontrarse en ambientes poco familiares y por la manipulación del cobayo. En un lapso de una hora, la habituación paulatina a las nuevas condiciones produce un estado fisiológico adecuado. Este tipo de modificación de la función respiratoria normal después de factores estresantes agudos ha sido previamente descrita en humanos (Han et al., 1997; Rietveld et al., 1999L).

Las situaciones de estrés se han asociado con cambios neurológicos y hormonales. Estos incluyen la activación del sistema nervioso simpático, la liberación de glucocorticoides y la producción de NO (Li & Quock, 2002; Sanchez et al., 2003; Shalev, 2002). En este contexto, es bien conocido que las catecolaminas y el NO son agentes relajantes del músculo liso de las vías aéreas (Hamad et al., 2003). Debido a que la combinación de propanolol y L-NAME mantuvieron el tono de la vía aérea que se alcanza después de una hora de registro desde el comienzo de la sesión pletismográfica, entonces es razonable que este fenómeno fue mediado por la liberación de catecolaminas y NO liberados probablemente por el estrés.

Se ha descrito que una vez que una situación de estrés ha terminado, sobreviene un reflejo vagal (Mezzacapa et al., 2001). Es posible que el aumento progresivo del íB que ocurre en la primera

hora de la sesión pletismográfica se debe en parte a un incremento del tono vagal en los cobayos conforme se van adaptando a la cámara. Debido a que la atropina fue inviable para prevenir el incremento del íB, esto descarta la participación colinérgica del nervio vago. También descartamos la participación de otros mediadores como eicosanoides, debido a que la budesonida fue incapaz de detener el incremento progresivo del íB.

La interpretación del íB y su posible función en la fisiología respiratoria han sido motivo de controversia (Mitzner y Tankersley, 2003). El íB es un índice que incluye varios factores independientes, que incluyen parámetros como el T_e , T_r , PFE y PFI, y, por la forma en la cual se observan en espejo, los cambios en la fR nos sugiere que la disminución de la fR podría inducir un incremento en el íB. Sin embargo, independientemente del significado fisiológico del íB, encontramos que la combinación de propanolol y L-NAME no modificó los cambios que ocurren en la fR durante la primera hora de registro pletismográfico, a pesar de tener un efecto notable en el íB. Así esto significa que los cambios en el íB no necesariamente corresponden con cambios en la fR.

La pletismografía barométrica es un método cada vez más usado para medir el íB como un indicador de la broncoobstrucción (Lomask, 2006). Aunque el fenómeno de habituación fue claramente observado en cobayos, esta en espera el ser demostrado en otras especies animales de uso de laboratorio, incluyendo ratón rata o conejo.

CONCLUSIÓN

En conclusión, nuestros resultados sugieren que las catecolaminas y el NO son liberados cuando los cobayos se introducen en la cámara pletismográfica, produciendo una disminución del tono de las vías aéreas. El incremento progresivo del tono hasta llegar a una nueva basal fisiológica sucede durante la primera hora que es cuando la influencia de estos mediadores probablemente desaparece gradualmente. Esto indica que los cambios espontáneos en el íB y la fR en el cobayo deberían ser tomados en cuenta durante la pletismografía barométrica para evitar una mala interpretación de los resultados, en especial cuando las modificaciones sutiles del íB son el objetivo del estudio.

Los resultados de este trabajo fueron publicados en: *Experimental Physiology*, 85: 623-628, 2004.

REFERENCIAS

1. Adler A, Cieslewicz G e Irvin CG (2004). Unrestrained plethysmography is an unreliable measure of airways responsiveness in BALB/c and C57BL6 mice. *J Appl Physiol* 97, 286-292.
2. Barnes PJ (1987) Inflammatory mediator receptors and asthma. *Am Rev Respir Dis* 135, S26-31.
3. Bergren DR (2001). Chronic tobacco smoke exposure increases airway sensitivity to capsaicin in awake guinea pigs. *J Appl Physiol* 90, 695-704.
4. Brendan J, Canning BJ, y Fischer A (2001). Neural regulation of airway smooth muscle tone *Respir Physiol* 125, 113-127.
5. Bolivar VJ, Caldarone BJ, Reilly AA y Flaherty L (2000). Habituation of activity in an open field: A survey of inbred strains and F1 hybrids. *Behav Genet* 30, 285-293.
6. Canning BJ y Fischer A (2001). Neural regulation of airway smooth muscle tone. *Respir Physiol*. 125, 113-127.
7. Canning BJ y Undem BJ (1997). Evidence for differential reflex regulation of parasympathetic contractile and relaxant neural pathways in the guinea pig. *Am J Respir Crit Care Med* 155, A575.
8. Chávez J, Montaña LM, Sommer B, Gustin P y Vargas MH (1996). Obstrucción de las vías aéreas en un modelo de intoxicación por paratión en cobayos. *Neumol Cirugía Tórax* 55, 49-54.
9. Chong BT, Agrawal DK, Romero FA y Townley RG (1998). Measurement of bronchoconstriction using whole-body plethysmograph: Comparison of freely moving versus restrained guinea pigs. *J Pharmacol Toxicol Methods* 39, 163-168.
10. Cortijo J y Morcillo EJ (2004). Fármacos broncodilatadores y antiinflamatorios en el asma y la enfermedad obstructiva crónica. En:

- Velázquez. Farmacología General y Clínica. Lorenzo, P., Moreno, A., Leza, J.C., Lizasoain, I. y Moro M.A. (eds.). Editorial Médica Panamericana, pp. 133-143.
11. Devillier P, Bessard G. (1997) Thromboxane A₂ and related prostaglandins in airways. *Fundam Clin Pharmacol* 11, 2-18.
 12. Diamond L, Altieri RJ. Airway nonadrenergic noncholinergic inhibitory nervous system. En: Lenfant C, editor. *Lung biology in health and disease*, vol. 33. New York: Marcel Dekker; 1988. p. 343-394.
 13. Drorbaugh JE y Fenn WO (1955). A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics* 16, 81-87.
 14. Eckert R., Randall D. Augustine G. *Fisiología Animal, Mecanismos y adaptaciones*. McGraw Hill Interamericana España 3ª Ed. 1991
 15. Epstein MA y Epstein RA (1978). A theoretical analysis of the barometric method for measurement of tidal volume. *Respir Physiol* 32, 105-120.
 16. Fischer A, Mundel P, Mayer B, Priessler U, Philippin B y Kummer W. Nitric oxide synthase in guinea pig lower airway innervation. *Neurosci Lett* 1993; 149: 157-160.
 17. Hamad AM, Clayton A, Islam B y Knox AJ (2003). Guanylyl cyclases, nitric oxide, natriuretic peptides, and airway smooth muscle function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 285, L973-L983.
 18. Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG y Gelfand EW (1997). Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 156, 766-775.
 19. Han JN, Stegen K, Simkens K, Cauberghs M, Schepers R, Van den Bergh O, Clément J y Van de Woestijne KP (1997). Unsteadiness of

- breathing in patients with hyperventilation syndrome and anxiety disorders. *Eur Respir J* 10, 167-176.
20. Janssen LJ, Premji M, Netherton S, Catalli A, Cox G, Keshavjee S, Crankshaw DJ. Excitatory and inhibitory actions of isoprostanes in human and canine airway smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 295, 506-11.
 21. Kesler BS y Canning BJ (1999). Regulation of baseline cholinergic tone in guinea-pig airway smooth muscle. *J Physiol (Lond)* 518, 843-856.
 22. Li S y Quock RM (2002). Effects of a nitric oxide donor on behavior and interaction with nitrous oxide in the mouse light/dark exploration test. *Eur J Pharmacol* 447, 75-78.
 23. Lomask M. (2006) Further exploration of the Penh parameter. *Exp Toxicol Pathol.* 57, 13-20.
 24. Mezzacappa ES, Kelsey RM, Katkin ES y Sloan RP (2001). Vagal rebound and recovery from psychological stress. *Psychosomatic Med* 63, 650-657.
 25. Mitzner W y Tankersley C (2003). Interpreting Penh in mice. *J Appl Physiol* 94, 828-831.
 26. Montaña LM, Vargas MH, Páramo JI y Selman ME (1987). Possible role of leukotrienes in propranolol-induced airway hyperreactivity in sensitized guinea pigs. *Pharmacol Res Commun* 19, 887-900.
 27. O' Keefe J y Nadel L. Exploration. In *The hippocampus as a cognitive map.* O' Keefe J & Nadel L, pp. 240-265. Oxford University Press, New York, 1978.
 28. Rietveld S, Van Beest I y Everaerd W (1999). Stress-induced breathlessness in asthma. *Psychol Med* 29, 1359-1366.
 29. Sanchez A, Toledo-Pinto EA, Menezes ML y Pereira CM (2003). Changes in norepinephrine and epinephrine concentrations in

- adrenal gland of the rats submitted to acute immobilization stress. *Pharmacol Res* 48, 607-613.
30. Shalev AY (2003). Acute stress reactions in adults. *Biol Psychiatry* 51, 532-543.
 31. Shindoh C, Wu D, Ohuchi Y, Kurosawa H, Kikuchi Y, Hida W y Shirato K (1998). Effects of L-NAME and L-arginine on diaphragm contraction in a septic animal model. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 119, 219-224.
 32. Sommer B, Montano LM, Chavez J, Gustin P, Vargas MH (1998) Guinea pig lung resistance shows circadian rhythmicity not influenced by ozone. *Respir Physiol.* 113, 223-9.
 33. Ville CA. *Biología* 8a edición. McGraw-Hill Interamericana editores, México 1996, 943pp.
 34. Weibel ER: Lung cell biology. In *The American Physiological Society Staff: Handbook of Physiology, Section 3: The Respiratory System, Vol I.* Bethesda, MD, American Physiological Society, 1985.
 35. Wennergren G, Nordvall SL, Hedlin G, Moller C, Wille S y Asbrink- Nilsson E (1996). Nebulized budesonide for the treatment of moderate to severe asthma in infants and toddlers. *Acta Paediatr* 85, 183-189.
 36. West J.B. *Fisiología Respiratoria* Ed. Panamericana 6ª Ed. Argentina 2002.