



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES**

**Identificación de los receptores serotoninérgicos  
involucrados en la hiperreactividad de las vías  
aéreas inducida por reto antigénico en cobayos  
sensibilizados**

**T E S I S**

*Que para obtener el título de*

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

***Guadalupe Córdoba Rodríguez***



**TUTORA**

**Dra. Patricia Segura Medina**

**México, D.F. a Junio 2008.**



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.

***Para todos los cobayitos...  
ya que sin ellos no hubiera podido hacer  
esta investigación.  
¡Gracias!***

# **1. AGRADECIMIENTOS**

Todo lo que era, soy y seré se lo debo sólo a dos personas que siempre estuvieron, están y estarán en mi vida: Mi mami y mi papi.

El llegar al INER fue uno de mis mejores golpes de suerte, pero hacerlo con la Super Duper Doctora Patty... fue el MEJOR!. Gracias Patty por todo, me has brindado un gran apoyo y realmente estoy muy agradecida, seguire contigo muchas años más así que no te desharás de mí fácilmente.

Tengo tres hermanos a los cuales quiero, aunque no lo demostremos muy seguido. Son parte de mí por lo tanto están en mí tesis también: Cesar Alejandro, Oscar y Miguel Angel. También tengo unas grandes tías, mi tía Tere y mi tía Pera que son la pura buena onda, al igual que la primix Alexita, que son muy lindas conmigo.

Hace siete años recibí un lindo regalo cósmico, ella llegó a mi vida y la cambio para siempre, es mi amiga entrañable: Zelia.

A mis grandes amigos: Oscar, Nancy, Ivonne, Zelia, Mayita, Anita, Tania, Fabo, Edgarcito, Margarita..

A la M. en C. Patricia Campos , a la Dra. Blanca Bazán, M. en C. José Luis Arreola y Dra. Lourdes Segura por participar en la revisión de mi tesis y por ser jurado de mi examen profesional.

A la UNAM, al INER y al Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial, ya aquí es donde parte mi vida como investigadora.

## 2.ÍNDICE

1. AGRADECIMIENTOS .....	4
2. ÍNDICE .....	5
3. RESUMEN .....	8
4. INTRODUCCIÓN .....	9
4.1 EL ASMA .....	9
4.1.1 EPIDEMIOLOGÍA .....	9
4.1.2 DEFINICIÓN DEL ASMA .....	10
4.1.3 HIPERREACTIVIDAD DE LAS VÍAS AÉREAS .....	11
4.1.4 ALERGENOS .....	12
4.1.5 ATOPIA .....	13
4.1.6 HIPERSENSIBILIDAD TIPO I .....	15
4.1.7 ASMA ALÉRGICA .....	17
4.2 LA SEROTONINA .....	18
4.2.1 LOCALIZACIÓN .....	20
4.2.2 LUGARES DE SÍNTESIS .....	21
4.2.3 SÍNTESIS .....	24
4.2.4 RECEPTORES DE 5-HT .....	27
4.2.5 EFECTOS FISIOLÓGICOS .....	29
4.2.6 TABLA DE RECEPTORES DE 5-HT .....	33

<b>4.2.7 PAPEL DE 5-HT EN EL ASMA .....</b>	<b>36</b>
<b>5. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA .....</b>	<b>40</b>
<b>6. HIPÓTESIS .....</b>	<b>40</b>
<b>7. OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
<b>8. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
<b>8.1 ANIMALES DE ESTUDIO .....</b>	<b>42</b>
<b>8.2 PROCEDIMIENTO DE SENSIBILIZACIÓN .....</b>	<b>43</b>
<b>8.3 ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN RESPIRATORIA: PLETISMOGRAFÍA PARA ANIMALES ANESTESIADOS .....</b>	<b>44</b>
<b>9. DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>46</b>
<b>9.1 REACTIVIDAD DE LAS VÍAS AÉREAS A LA ACETILCOLINA ANTES Y DESPUÉS DEL RETO .....</b>	<b>46</b>
<b>10. ANÁLISIS DE DATOS .....</b>	<b>47</b>
<b>11. JUSTIFICACIÓN DE USO DE ANIMALES Y CONSIDERACIONES ÉTICAS .....</b>	<b>48</b>
<b>12. RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
<b>12.1 CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE SENSIBILIZACIÓN .....</b>	<b>49</b>
<b>12.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE 5-HT .....</b>	<b>50</b>
<b>13. DISCUSIÓN .....</b>	<b>52</b>
<b>14. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>57</b>
<b>15. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>58</b>

### 3. RESUMEN

Las vías aéreas de sujetos asmáticos responden con obstrucción exagerada ante estímulos comunes, fenómeno que se llama hiperreactividad de las vías aéreas (HVA). Aunque se ha sugerido que la serotonina, también llamada 5-hidroxitriptamina (5-HT), participa en la generación de obstrucción aguda durante una crisis asmática, pocos estudios han investigado el papel de la 5-HT en la HVA. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de diversos antagonistas de 5-HT sobre la HVA inducida por reto antigénico en cobayos. Se utilizaron cobayos sensibilizados a ovoalbúmina (OA) mediante una inyección ip, seguida de retos antigénicos por vía inhalatoria. A la tercera semana de sensibilización los animales fueron anestesiados e introducidos en un pletismógrafo para medir la resistencia isovolumétrica de las vías aéreas ( $R_L$ ). Con el fin de evaluar la reactividad de las vías aéreas se realizaron curvas dosis-respuesta a acetilcolina iv (ACh) antes y una hora después del reto antigénico iv, calculándose la dosis que triplicó la  $R_L$  basal (dosis provocativa 200%). El número de animales por grupo fue de 11. Al observarse que en el grupo de control el reto antigénico produjo un desplazamiento a la izquierda de la curva a ACh, en comparación con la curva basal, es decir, produjo HVA. La metiotepina (subtipos 1, 2, 5, 6, 7), y el tropisetron (subtipos 3, 4), así como la combinación de ambos compuestos inhibieron la producción de HVA. Estos resultados sugieren que la 5-HT tiene un papel importante en el desarrollo de HVA inducida por el reto antigénico dónde varios receptores de 5-HT pudieran hallarse involucrados.

## **4. INTRODUCCIÓN**

### **4.1 EL ASMA**

#### **4.1.1 EPIDEMIOLOGIA**

El asma es una enfermedad respiratoria que cada vez tiene mayor incidencia en las personas, al tener un incremento del 10 al 40% en la población mundial (Huerta, 2001). Se han realizado estudios para estimar el porcentaje de enfermos de asma en el mundo, de los cuales el trabajo de mayor relevancia es el llamado ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood), que en México se llevó a cabo realizó en las ciudades de Cuernavaca, Hermosillo y Monterrey. Los resultados que arrojó fueron sorprendentes y alarmantes, uno de ellos revela que en Monterrey en una muestra de 3000 niños de primaria se encontró que había una prevalencia del 9%de asma) (Cano, 2006).

En la población infantil, el asma es un grave problema, los niños menores de cinco años son la población más vulnerable, por lo cual se deben detectar a tiempo los factores de riesgo para prevenir morbilidad, mortalidad y severidad del asma (Huerta, 2001). El asma en menores de cinco años representa el 44% de los casos, con una relación de un hombre por cada dos mujeres; hasta un 35% de los pacientes de asma requieren hospitalización en alguna vez en el transcurso de la enfermedad. La mortalidad por asma no es tan alarmante como en otras enfermedades respiratorias pero si tiene cifras que se deben tomar en consideración: la relación de mortalidad en México es

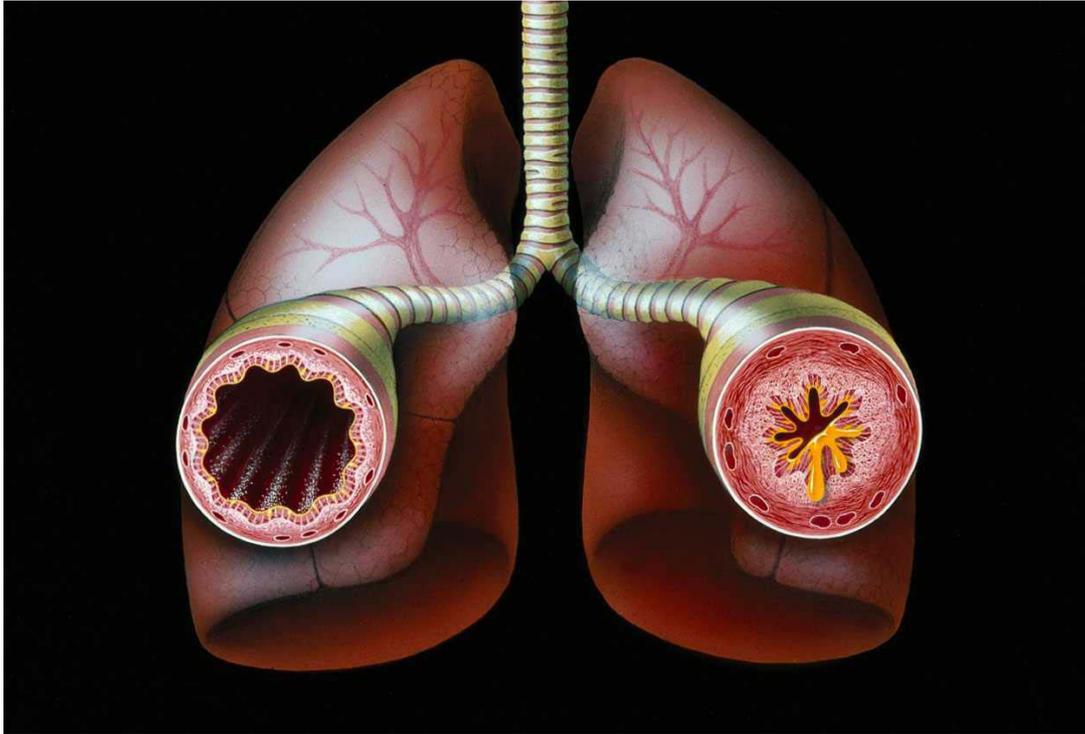
de 2.4 casos por cada millón de habitantes al año, presentándose en los niños 1.4 veces más mortalidad que las niñas (García, 2003). Algo que debe de tomarse en cuenta sobre el asma es el costo de los tratamientos. Por ejemplo en Estados Unidos el costo excedió los 12 mil millones de dólares durante el año 2000 (Goldsby, 2004).

#### **4.1.2 DEFINICIÓN DE ASMA**

El asma es una enfermedad que se caracteriza por la inflamación crónica de la mucosa bronquial (Roca, 1993) provocada por varios tipos de células como mastocitos, eosinófilos y linfocitos T (Barnes, 1998) y sus mediadores celulares provocan una inflamación crónica; ésta inflamación provoca un incremento en la hiperractividad de las vías aéreas (HVA) (GINA, 2005); en el cual se presentan episodios recurrentes de sibilancias, disnea, opresión en el pecho, y/o tos, especialmente por las noches o temprano por las mañanas (Strek, 2006). Estos episodios usualmente están asociados con la contracción del músculo liso de las vías aéreas, de tal forma que esta broncoconstricción puede ser reversible ya sea espontáneamente o con tratamiento (GINA, 2005). Otra característica del asma es la remodelación de las vías aéreas (Ying, 2006), que es un proceso heterogéneo en donde hay cambios en los tejidos conjuntivos y una alteración en la estructura de las vías por diferentes procesos como diferenciación, migración y maduración de células estructurales (GINA, 2005).

### **4.1.3 HIPERREACTIVIDAD DE LAS VIAS AEREAS**

Una característica muy importante del asma es la respuesta broncoconstrictora exagerada a gran variedad de estímulos externos o internos, a la que se denomina hiperreactividad de las vías aéreas (GINA, 2005, figura 1). El origen de la HVA en humanos es aún desconocida; ya que la prevalencia de la HVA es mayor a la del asma y no hay una estrecha relación entre la gravedad e intensidad de una y otra (Roca, 1993). Clínicamente, la HVA se puede analizar por el incremento de dosis de fármacos en aerosol que se usan como estimulantes, por ejemplo la histamina o la metacolina (GINA, 2005). Una forma de evaluar la HVA es administrar concentraciones crecientes de metacolina y medir la función pulmonar después de cada dosis, hasta que ocurra un 20% de obstrucción. Con esta curva concentración-respuesta se puede calcular la dosis necesaria para provocar un 20% de obstrucción, a lo que se denomina PD20 (provocative dose 20%). Por tanto, la PD20 es una medida de HVA, es decir, de la facilidad con que se obstruyen las vías aéreas.



**Figura 1.** Engrosamiento de la pared bronquial en el asma. En esta ilustración se muestra el engrosamiento de la pared bronquial en el asma (derecha) en comparación con las condiciones normales (izquierda). Tomado de Jeffery, 2006.

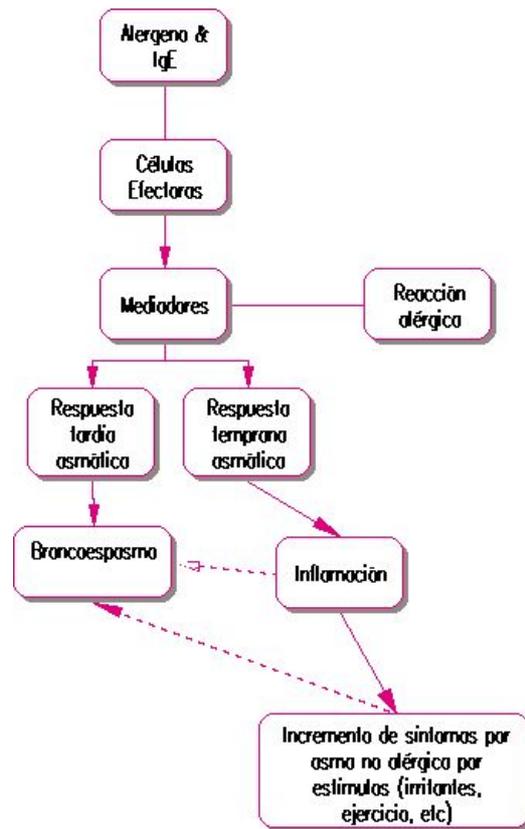
#### **4.1.4 ALERGENOS**

El asma alérgica se caracteriza por ser provocada por alérgenos; la exposición a alérgenos es un disparador importante de exacerbaciones en los pacientes con asma (Platts-Mills, 2007). Los alérgenos son un tipo de antígeno específico no parasitarios, pueden ser pequeñas proteínas o sustancias químicas; la mayoría de los alérgenos comparten características comunes como peso molecular alto, glucosilación y solubilidad alta en líquidos corporales, se encuentran comúnmente en el medio ambiente y provoca la hipersensibilidad del tipo I (alergia) en individuos alérgicos (Abbas, 2004). Hay dos tipos de alérgenos: los alérgenos dentro de casa y los de fuera; los primeros no pueden ser evitados y los segundos sí (Jiménez, 2005). Los

alergenos más comunes son los pólenes, ácaros del polvo doméstico, caspas de animales, ciertos alimentos y productos químicos como el antibiótico penicilina (Abbas, 2004). La severidad y/o duración de las reacciones alérgicas en las vías aéreas, particularmente en edades tempranas, pueden ocasionar una hiperreactividad persistente (Barnes, 1998).

#### **4.1.5 ATOPIA**

La atopía es generada por la presencia de concentraciones elevadas de inmunoglobulina E (IgE) de alergenios específicos (Ying, 2006). La atopía y el asma están estrechamente relacionadas, ya que la atopía puede ser un factor de riesgo de hiperreactividad, apareciendo como una posible causa (figura 2). (Barnes, 1998). En los individuos atópicos hay una concentración elevada de IgE en la sangre, por lo que ellos son más susceptibles a alergias y desarrollar asma (Goldsby, 2004). La IgE media las reacciones de hipersensibilidad del tipo I, causantes de los síntomas del asma alérgica, al unirse a las membranas de mastocitos tisulares y basófilos sanguíneos (Goldsby, 2004).

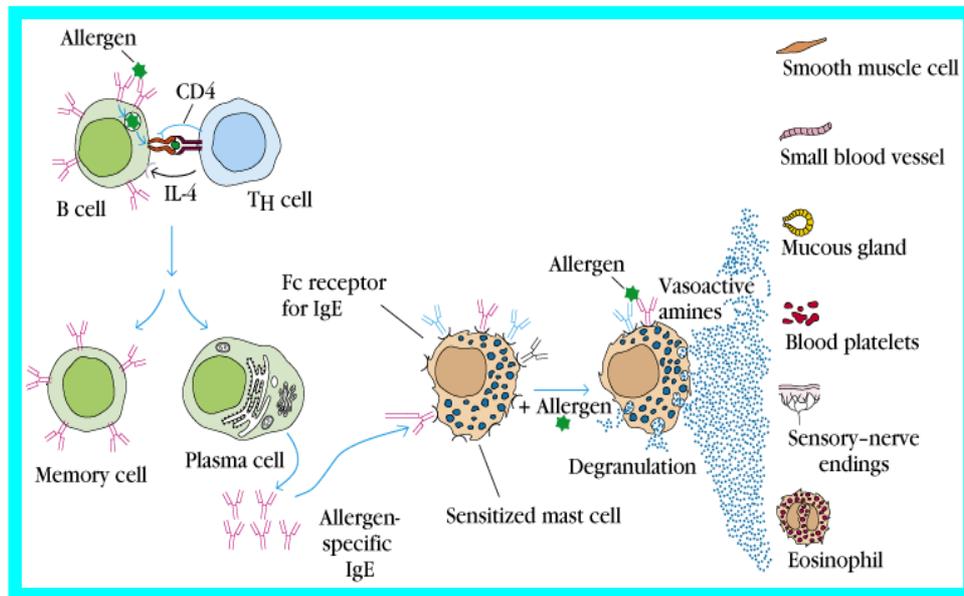


**Figura 2.** Interacción alérgeno-IgE es la respuesta asmática. Modificado de Barnes 1998.

La mayoría de las reacciones alérgicas provocadas por la IgE se dan en mucosas, como respuesta a alérgenos que entran por inhalación o ingestión. Hasta el momento no es posible explicar el por qué hay alérgenos más potentes que otros . Al parecer la alergenidad es una compleja cadena de reacciones que no sólo dependen del alérgeno si no de otras características como dosis, vías de sensibilización, adyuvantes y la constitución genética del receptor (Goldsby, 2004).

#### 4.1.6 HIPERSENSIBILIDAD TIPO I

La hipersensibilidad del tipo I (figura 3) tiene una serie de eventos que consisten en: una exposición a algún antígeno, la activación de linfocitos del tipo  $T_H2$  específicos para el antígeno, producción de IgE, unión de la IgE a receptores específicos en los mastocitos (receptores  $Fc\epsilon RI$  que son de alta afinidad para la IgE) (Abbas, 2004) y la activación de los mastocitos por reexposición al antígeno, lo que da lugar a la liberación de mediadores a partir de los mastocitos, y como consecuencia la reacción patológica (Abbas, 2004). Cuando hay interacción entre la IgE y los receptores de mastocitos se lleva a cabo la desgranulación; este evento ocurre cuando hay un enlace cruzado alérgeno–antígeno que provoca que los mastocitos y los basófilos liberen sus gránulos al ambiente extracelular, es decir, se liberan diferentes mediadores activos que provocan reacciones alérgicas (Goldsby, 2004).



**Figura 3.** Mecanismo de una reacción de hipersensibilidad tipo I. La exposición de un alérgeno activa las células B para que éstas formen células plasmáticas y se segregue IgE. Las moléculas de IgE se fijan en receptores Fc de mastocitos y basófilos. En la segunda exposición del alérgeno se produce un enlace cruzado de la IgE fija, lo que da lugar a la liberación de mediadores con actividad farmacológica; estos mediadores producen contracción del músculo liso, vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. Tomado de Goldsby, 2004.

Las manifestaciones clínicas y los efectos biológicos de las reacciones de la hipersensibilidad tipo I provocados por los mediadores liberados durante la desgranulación de los mastocitos y basófilos afectan tejidos o poblaciones de células como eosinófilos, neutrófilos y plaquetas. Los mediadores tienen la función de amplificar y hacer efectiva la interacción antígeno-anticuerpo: la liberación de estos produce incrementos innecesarios de la permeabilidad vascular e inflamación, siendo estos procesos dañinos para el individuo. Estos mediadores se clasifican en: primarios que se producen antes de la desgranulación y se almacenan en gránulos como la histamina y la serotonina; ambas aumentan la permeabilidad vascular y la contracción del músculo liso, y las proteasas provocan la secreción de moco bronquial y degradación de la membrana basal de vasos sanguíneos. Los mediadores secundarios son

aquellos que se liberan cuando se está llevando a cabo la desgranulación, como los leucotrienos que aumentan la permeabilidad vascular y contraen el músculo liso, y las prostaglandinas que contraen el músculo liso pulmonar y favorecen la agregación plaquetaria (Goldsby, 2004).

#### **4.1.7 ASMA ALERGICA**

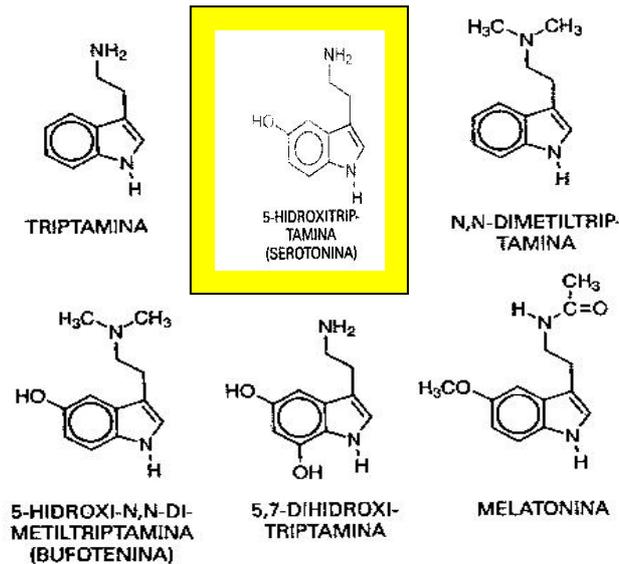
Aproximadamente del 70% de los individuos asmáticos, su enfermedad se debe a una hipersensibilidad del tipo I mediada por IgE (Abbas, 2004). Los ataques asmáticos de asma alérgica se deben principalmente a alérgenos transportados por el aire y la sangre, como pólenes, polvo, humo, productos de insectos (venenos) o antígenos virales. (Goldsby, 2004). En realidad, del 10 al 30% de los individuos atópicos presentan asma. Por medio de estudios en familias se ha descubierto que la atopía tiene un componente genético y la relación de estos factores genéticos con el asma y la atopía es de 40 a 60%; identificando a los genes 5q, 5q31-33, 11q13 como portadores de la información para que se desarrolle asma alérgica (Goldsby, 2004).

El asma alérgica se inicia con la activación de los mastocitos como respuesta al alérgeno que se une a la IgE. Los mastocitos, los basófilos y los eosinófilos producen mediadores que provocan la contracción del músculo liso de las vías respiratorias. Los mediadores más importantes para la contracción del músculo liso son LTC<sub>4</sub> (Leucotrieno C<sub>4</sub>), LTD<sub>4</sub> (Leucotrieno D<sub>4</sub>), LTE<sub>4</sub> (Leucotrieno E<sub>4</sub>) y PAF (Factor liberador de plaquetas) (Abbas, 2004). En el asma la desgranulación de los mastocitos y basófilos se lleva a cabo en las partes bajas

de las vías respiratorias; la contracción del músculo liso provocada por los mediadores liberados por estas células provocan la broncoconstricción, el edema de las vías respiratorias, la secreción de moco y la inflamación (Goldsby, 2004). Además de la prevención el tratamiento que se da actualmente a los enfermos de asma es el control de la inflamación y la relajación del músculo liso, por lo cual se utilizan fármacos que contienen corticoides cuya función es bloquear las citocinas inflamatorias y el cromoglicato sódico (Abbas, 2004).

## **4.2 LA SEROTONINA**

“Serotonina” es la denominación común del compuesto 5-hidroxitriptamina (5-HT), este nombre se le aplicó a la sustancia encontrada en el suero después de la coagulación y en 1948 se identificó como 5-HT (Rang 2004). En la década de los treinta un equipo de investigación en Italia identificó una sustancia que se encontraba en las células enterocromafines (EC) del intestino y la nombró “enteramina” por su secreción abundante. Por otro lado en los Estados Unidos, se reconoció una sustancia vasonconstrictora en el suero y la llamaron “serotonina”. Años más tarde se dieron cuenta de que las dos sustancias tienen la misma identidad molecular y se deja el nombre de serotonina para denominar a la 5-hidroxitriptamina, que resulta ser uno de los principales neurotransmisores (Meunier, 1999).



**Figura 4.** Ejemplos de indolalquilaminas representativas. Modificado del Hardman, 1999.

La serotonina pertenece a la familia de los autacoides, una gran variedad de sustancias que tienen estructuras químicas y propiedades farmacológicas muy diversas; pero todos los autacoides tienen una característica común: se forman en los tejidos en los que actúan y, por tanto tienen la función de hormonas locales (Velásquez, 2005). También es clasificada como una indolalquilamina (figura 4) (Meunier, 1999) y como una amina biogénica que posee un anillo indólico y una cadena lateral etilamino (Flores, 1998), que tiene un pK de 9.8, por lo cual está cargada. Por tanto esta sustancia no puede atravesar la barrera hematoencefálica (Velásquez, 2005).

#### 4.2.1 LOCALIZACIÓN

La 5-HT se localiza en plaquetas, células EC y células nerviosas (Meunier, 1999). La mayor concentración de 5-HT en el organismo se halla en

el tracto gastrointestinal (GI). Aproximadamente, el 90% se encuentra en las células EC, que son células que están en la cresta neural, intercaladas con las células de las mucosas, principalmente en el estómago y en el intestino delgado; también hay 5-HT en las células nerviosas del plexo mientérico donde tiene la función de neurotransmisor excitador (Rang, 2004). Un 8% de esta sustancia estará guardada en plaquetas (Meunier, 1999), que la acumulan desde el plasma por medio de transporte activo y la liberan cuando hay lesiones tisulares (Rang, 2004), y no más del 2% se encuentra en células nerviosas del sistema nervioso central (SNC) (Meunier, 1999) en donde tiene una función de neurotransmisor y existe en grandes concentraciones en regiones del mesencéfalo (Rang, 2004).

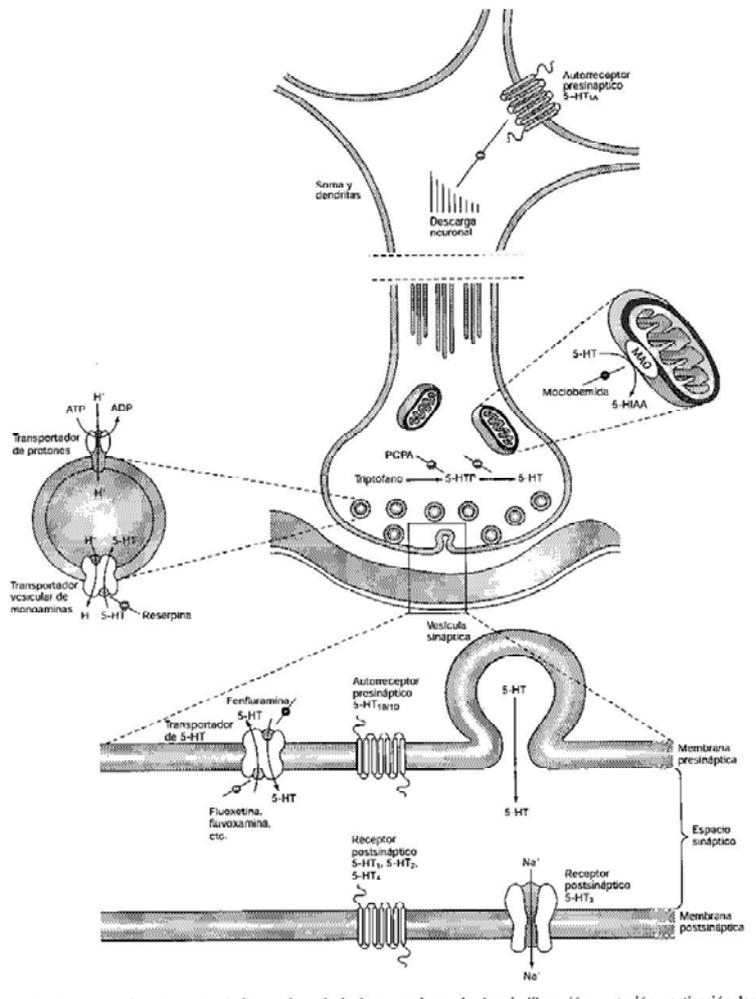
La 5-HT ha sido reconocida desde hace casi 50 años como efector en diversos tipos de músculo liso, provoca la agregación plaquetaria y tiene la función de neurotransmisor en el sistema nervioso central (SNC). Se encuentra en vertebrados, tunicados, moluscos, artrópodos, celenterados, frutas y semillas; también se le ha encontrado en venenos, como el de la ortiga ordinaria, y de avispas y escorpiones (Hardman, 1996).

#### **4.2.2 LUGARES DE SÍNTESIS**

La 5-HT es sintetizada sólo en dos sitios; en el interior de las neuronas serotoninérgicas y el tracto GI. Las neuronas serotoninérgicas son identificadas así, porque contienen las enzimas necesarias para la síntesis de 5-HT (figura

5). Para liberar 5-HT el principal mecanismo utilizado es la exocitosis, en él se despoaliza la membrana de las células neuronales, lo que conlleva la apertura de canales de  $\text{Ca}^+$  dependientes de voltaje y, por consiguiente la entrada de  $\text{Ca}^+$  en el terminal sináptico (Velázquez 2005). Una vez que la 5-HT es liberada, una parte actúa en receptores, otra se difunde en el espacio extracelular y el resto es recaptada por la propia terminación nerviosa (Flores, 1998). Cuando 5-HT es liberada, un transportador de alta afinidad la capta del espacio sináptico; este transportador se encuentra en la membrana exterior de las neuronas serotoninérgicas y en la membrana exterior de las plaquetas (Hardman, 1996). Funciona en serie con un transportador vascular, que capta a 5-HT intracelular en vesículas sinápticas (Velázquez, 2005).

Por ser la 5-HT una catecolamina tiene dos compartimentos para su liberación: uno que se denomina “funcional”, que responde a las demandas inmediatas y utiliza 5-HT neo-sintetizada; el otro compartimiento es llamado como de “reserva” y sólo se usa cuando hay una carencia del primero; el excedente de 5-HT se almacena en reservas que permiten regular su liberación (Meunier, 1999).



**Figura 5.** Neurona y sinapsis serotonérgica con los principales mecanismos de síntesis, liberación, captación y activación de receptores. Tomado de Flores 1998.

El segundo sitio en donde se sintetiza 5-HT es el tracto GI, exactamente en las células EC. La liberación de 5-HT en las células EC, ocurre en los gránulos de estas células, pero también en el plexo mientérico y en el plexo de la mucosa, en donde se activan neuronas que están involucradas en las funciones gastro-intestinales. De igual manera que 5-HT en el SNC, la liberación de 5-HT del tracto GI es por exocitosis dependiente de Ca<sup>+</sup>; los ionóforos de Ca<sup>+</sup> promueven la liberación de 5-HT, y los canales de Ca<sup>+</sup>

pueden ser bloqueados por fármacos, estos bloquean canales de clase L- y N- y abren canales de K<sup>+</sup>. La vida media de la 5-HT en el tracto GI se estima entre 7 y 12 horas en perros y humanos, y 11 horas en conejos; las ratas excretan aproximadamente 0.4 mg/Kg diarios de 5-HT. En términos fisiológicos, la 5-HT puede ser liberada en el tracto GI por ingestión de comida, estimulaciones adrenérgicas vagales o simpáticas, por una baja en el pH intraluminal, por interacción con catecolaminas circulantes, distensiones mecánicas, isquemia o por obstrucción de la movilidad normal del tracto GI (Gaginella, 1995).

En las plaquetas, donde también se almacena 5-HT, ésta no se sintetiza, ya que no cuentan con las enzimas necesarias para este proceso. La única vía por la cual las plaquetas obtienen 5-HT es por medio del transportador de 5-HT (5-HTT) (Hardman, 1996); las plaquetas almacenan 5-HT que proviene del plasma mediante el transporte activo (Velásquez, 2005); alguna fracción que se escapa de la liberación de 5-HT en las neuronas serotoninérgicas es captada por plaquetas (Flores 1998). También las plaquetas se cargan de 5-HT a medida que pasan por el tracto GI, en donde la concentración de 5-HT es alta (Rang, 2004).

La 5-HT también se sintetiza en la glándula pineal, donde tiene la función de ser precursor de la melatonina, una hormona que tiene una extensa actividad endócrina por su capacidad de acción en el hipocampo (Flores, 1998). La síntesis de melatonina a partir de 5-HT está influenciada por varios factores externos, entre ellos la presencia de la luz ambiental. La melatonina

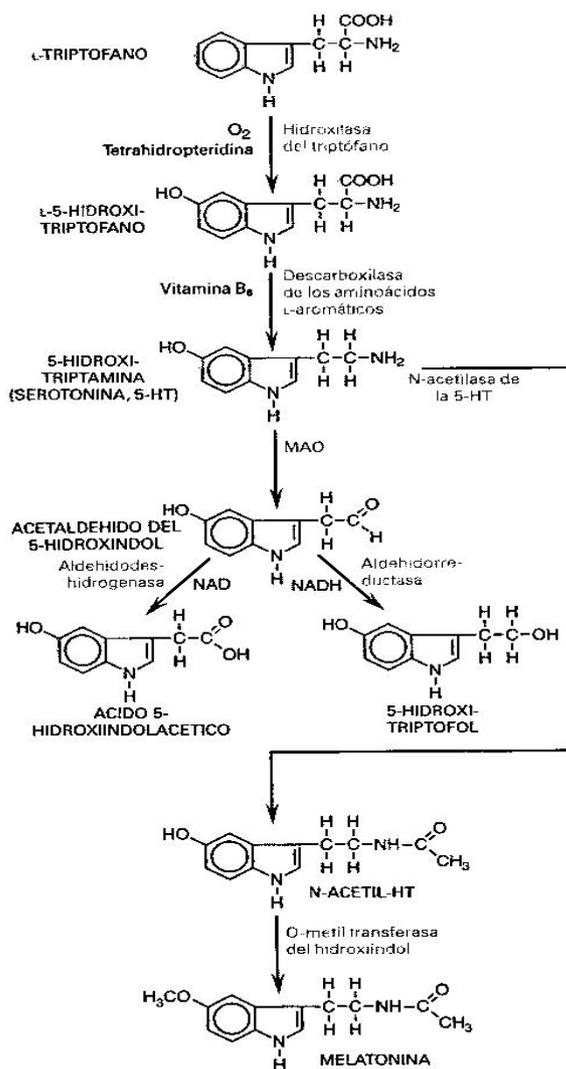
tiene la labor de suprimir funciones ováricas, pigmentar las células cutáneas, además de influir en los ritmos biológicos (Hardman, 1996).

### 4.2.3 SÍNTESIS

La 5-HT se sintetiza a partir de un aminoácido primordial, el llamado L – triptófano, que se deriva de la dieta y es captado por la célula (Flores, 1998). La captación de esta amina es el primer paso para la síntesis de 5-HT (Hardman, 1996). El L-triptófano sufre una oxidación en el C5 del anillo indólico por la *triptófano-hidroxilasa* (Flores 1998), una enzima limitada a las células productoras de 5-HT (Rang, 2004) por lo cual, la cantidad de L-triptófano plasmático que se encuentre, es lo que influye en la síntesis de 5-HT (Hardman, 1996), para obtener 5-hidroxitriptófano (5-HTP) (Flores, 1998). En este paso dos cofactores tienen un papel muy importante en la síntesis de 5-HT, el oxígeno y la eritrotetrahidrobiopterina; estos cofactores son sustancias esenciales para que se lleve a cabo esta reacción de síntesis; si hay una baja cantidad de alguno de estos cofactores se provoca una ruptura en la cadena de síntesis de 5-HT. La concentración de eritrotetrahidrobiopterina es regulada por la enzima dihidropterina reductasa; si esta enzima no se encuentra presente, provoca una baja concentración de éste cofactor lo que conlleva a que no se sintetice 5-HT (Meunier, 1999). Posteriormente el 5-HTP es descarboxilado en su cadena lateral por la *L-aminoácido-descarboxilasa* (Gaginella, 1995). Esta enzima es la descarboxilasa de los amino ácidos aromáticos (Meunier, 1999) que también participa en la síntesis de catecolaminas e histamina (Rang,

2004), tiene una amplia distribución y una especificidad grande para los sustratos (Hardman, 1996). Es cuando se forma la 5-hidroxitriptamina (figura 6).

La 5-HT en las células EC y en las neuronas serotoninérgicas se almacena en estructuras vesiculares para protegerse de enzimas intracelulares como la *monoaminoxidasa* (MAO) (Flores, 1998). Hay dos tipos de MAO, la del tipo B (MAO-B) que cataliza a las catecolaminas y la MAO del tipo A (MAO-A) que cataliza a la 5-HT (Meunier, 1999). Si la 5-HT entra en contacto con la MAO sufre una desaminación oxidativa (Rang, 2004) y el catabolito resultante es el 5-hidroxiindol-acetaldehído (5-HIAC) (Meunier, 1999). Este es metabolizado por la aldehído-deshidrogenasa que crea el metabolito 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (Flores, 1998). El 5-HIAC puede ser metabolizado por un alcohol deshidrogenado y dar como resultado el 5-hidroxitriptofol. Existen otras dos vías de degradación de 5-HT: la glicoconjugación en donde 5-HT y su metabolito 5-HIAC se conjugan en ácido uridino difosfoglicurónico; y la sulfoconjugación en el hipocampo humano con la participación de la enzima sulfotransferasa (Meunier, 1999).



**Figura 6.** Biosíntesis de 5-HT. Se muestran los cofactores ( $\text{O}_2$ , tetrahydropterina y vitamina  $\text{B}_6$ ) que se encuentran involucrados en cada paso de la síntesis. Modificado de Hardman, 1996.

Se almacena en estas vesículas teniendo la función de cotransmisor, junto a otras hormonas peptídicas como la somatostatina, sustancia P o polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) (Rang, 2004). Cuando la 5-HT pasa a la sangre, una fracción es captada por el hígado y el endotelio vascular, en especial el pulmonar y es transformada en 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). Tanto en las células EC y las neuronas serotoninérgicas se sintetiza 5-HT a partir del L-triptófano. En el SNC la enzima triptófano-hidroxilasa se utiliza como marcador específico de estas neuronas en técnicas inmunohistiquímicas; y la 5-HT queda almacenada en vesículas que la protegen de la degradación

de la MAO intraneuronal (Flores, 1998). El 5-HIAA del cerebro y del tracto GI se elimina en la orina junto a cantidades mínimas de 5-hidroxitriptofolsulfato o de conjugados glucuronados. La eliminación diaria de 5-HIAA en un adulto normal es de 2 a 10 mg/día (Hardman, 1996, Gaginella, 1995). Por la distribución difusa que tiene la 5-HT, parece orquestar muchas propiedades diferentes en la función cerebral y se encuentra involucrada en la patogenia de diferentes enfermedades cerebrales (Velásquez, 2005), y la secreción incrementada de 5-HT, y otros autacoides se ve involucrada en el cuadro intestinal de la enfermedad carcinoide (Hardman, 1996).

#### **4.2.4 RECEPTORES DE 5-HT**

En 1957, Gaddmum y Picarelli hicieron un estudio precursor, en el cual se propuso que existían dos tipos de receptores para 5-HT, que fueron denominados *subtipos M y D* (Hardman, 1996); hicieron ensayos farmacológicos en intestino, en los cuales se dieron cuenta que había dos tipos de respuesta a 5-HT: la bloqueada por morfina y la bloqueada por dibenanina; y así fue como se introdujo la clasificación M y D (Flores, 1998). Los receptores M se localizaban sobre las terminaciones nerviosas parasimpáticas, aquellas que controlaban la descarga de acetilcolina, y los receptores D estaban localizados en el músculo liso (Hardman, 1996).

Los receptores para la 5-HT se dividen en siete clases que son 5-HT<sub>1</sub> a 5-HT<sub>7</sub>; en los cuales, las clases 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> (antiguo D) (Flores, 1998), 5-HT<sub>5</sub> tienen a su vez subtipos, 5-HT<sub>1</sub> tiene cinco (5-HT<sub>1A</sub> a 5-HT<sub>1F</sub>), 5-HT<sub>2A</sub> tiene tres (5-HT<sub>2A</sub> a 5-HT<sub>2C</sub>) y el receptor 5-HT<sub>5</sub> tiene dos subtipos (5-HT<sub>5A</sub> y 5-HT<sub>5B</sub>)

(véase tabla de receptores de 5-HT). Se tiene poca información sobre este receptor (Rang, 2004); en las clases, 5-HT<sub>3</sub> (parece que corresponde al antiguo M) (Flores, 1998), 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub> por el momento solo se ha encontrado un subtipo para cada uno. Con excepción del receptor 5-HT<sub>3</sub> (Velásquez, 2005) que esta asociado a un receptor intrópico (Rang, 2004), todos los receptores de 5-HT están asociados a proteínas G (Velásquez, 2005). Esta clasificación de receptores se debe a los datos que arrojaron estudios en las últimas décadas, estos se refieren a diferentes datos secuenciales de clonación, los mecanismos de transducción de señales, la especificidad farmacológica (Rang, 2004) y fijación de radioligandos (Flores, 1998).

En el receptor 5-HT<sub>1</sub>, no hay un subtipo 5-HT<sub>1C</sub>; en un principio se reconoció un receptor en el plexo coroideo y se denominó 5-HT<sub>1C</sub>, porque era el tercer receptor encontrado que tenía una gran afinidad por la 5-HT. Pero, con base en sus propiedades farmacológicas, la función de su segundo mensajero y la secuencia de amino ácidos deducida, el receptor 5-HT<sub>1C</sub>, más bien pertenecía a la familia de 5-HT<sub>2</sub>, y recientemente se ha caracterizado como el receptor 5-HT<sub>2C</sub> (Hardman, 1996). Ahora sabemos que estaba relacionado con la síntesis de trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) y no con la síntesis de la adelinato ciclasa (Rang, 2004).

## 4.2.5 EFECTOS FISIOLÓGICOS

Los efectos fisiológicos de 5-HT son muy variados, su función primordial es la regulación en la motilidad del tracto GI en donde es almacenada y liberada por las células EC y por plaquetas, además de su función de neurotransmisor en el SNC (Hardman, 1996). La reacción tradicional de los vasos sanguíneos a 5-HT es la contracción, en vasos espláncnicos, renales, pulmonares, cerebrales y músculo liso bronquial (Hardman, 1996). El efecto que tiene la 5-HT en vasos sanguíneos depende del tamaño del vaso, la especie y la actividad simpática dominante. Los vasos grandes, arterias y venas, se contraen generalmente por la acción de la 5-HT; esta acción es directa en las células musculares lisas vasculares mediada por el receptor 5-HT<sub>2A</sub>. También, la 5-HT tiene una función en la vasodilatación (Rang, 2004) por la acción de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, que intervienen en la liberación de factores relajantes endoteliales o al inhibir la liberación de noradrenalina, lo que provoca la respuesta dilatadora. Este mismo receptor, en el corazón realiza las acciones inotrópica y cronotrópica positivas, secundaria a la liberación de noradrenalina. La 5-HT está asociada a la hipertensión arterial con el receptor 5-HT<sub>2</sub>, por su efecto constrictor (Flores, 1998). La activación de receptores de 5-HT<sub>1</sub> hacen que se de una contracción de vasos intercraneales, lo cual da lugar a la cefalea (Rang, 2004).

La 5-HT desencadena en el tracto GI la estimulación de líquido para provocar náuseas y vómito por la estimulación de los receptores 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub>

en el músculo liso y en los nervios sensitivos del estómago (Rang, 2004). En la pared del tracto GI tiene la función de contracción y relajación; la contracción es un efecto directo a la estimulación de receptores 5-HT<sub>2</sub> en las fibras musculares. En el intestino estas reacciones están mediadas por el receptor 5-HT<sub>2A</sub>, en el fundus por el receptor 5-HT<sub>2B</sub> y la estimulación en terminaciones nerviosas en el músculo intestinal y esofágico por los receptores 5-HT<sub>4</sub>; y en las neuronas ganglionares por los receptores 5-HT<sub>3</sub> (Flores, 1998). El reflejo peristáltico, que se provoca por un aumento de presión en un segmento intestinal, esta mediado por la liberación de 5-HT que se encuentra en las células EC. Esta liberación se da como respuesta a un estímulo mecánico; estas células también reaccionan a estímulos vagales liberando 5-HT (Rang, 2004). La 5-HT también está relacionada con el síndrome del colón irritable (5-HT<sub>4</sub>) (Velásquez, 2005).

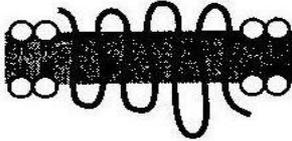
Como ya se mencionó antes, la 5-HT no se sintetiza en plaquetas, más bien es captada de la circulación y se almacena en gránulos de secreción por medio de transporte activo (Hardman, 1996). Por medio de la agregación plaquetaria es como se libera 5-HT de las plaquetas, ya que cuando éstas hacen contacto con el endotelio dañado se libera ADP, trombina y tromboxano A<sub>2</sub>, factores que propician la agregación (Velásquez, 2005). La 5-HT provoca la agregación plaquetaria por medio de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> (Rang, 2004); y esta agregación es débil y se acrecienta notablemente si hay presencia de colágena (Hardman, 1996). Aquellas plaquetas que se acumulan en vasos liberan aún más 5-HT. Esta liberación produce vasodilatación para ayudar a mantener el

flujo sanguíneo; si algún vaso está dañado, la 5-HT causa contracción y afecta aún más el flujo sanguíneo (Rang, 2004).

En el SNC la 5-HT es un neuroregulador de diversas funciones; estimula algunas neuronas e inhibe otras, tiene acción anivel presináptico, en donde inhibe la liberación de transmisores de las terminaciones nerviosas. Estos efectos son mediados por diferentes receptores y mecanismos de membranas (Rang, 2004), las neuronas serotoninérgicas están ampliamente distribuidas por todo el SNC; y la 5-HT está involucrada en las siguientes funciones: control eferente de la sensibilidad dolorosa (5-HT<sub>1</sub>), regulación del sueño, la posición y tono en la postura (5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub>), actividad de los ganglios basales (5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub>); regulación de funciones vegetativas, como la presión arterial y actividad respiratoria (5-HT<sub>1</sub>); la regulación endocrina, como la secreción de ACTH, hormonas gonadotrópicas, hormona del crecimiento y prolactina (5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub>); control del apetito (5-HT<sub>2</sub>), control de la actividad emética (5-HT<sub>3</sub>); control de la ansiedad (5-HT<sub>1A</sub>), en episodios psicóticos (5-HT<sub>2</sub> y 5-HT<sub>3</sub>), en la depresión se utilizan antagonistas que evitan la recaptación de 5-HT como la fluoxetina y paroxetina (Flores, 1998); también se ve involucrada en esquizofrenia (5-HT<sub>2A</sub>), obesidad (5-HT<sub>2C</sub>), funciones cognitivas (5-HT<sub>6</sub>), migraña (5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>) (Velásquez, 2005), en la percepción sensorial, actividad motora, regulación de la temperatura, nocicepción, conducta sexual (Hardman, 1996).

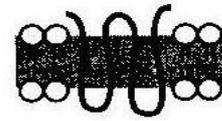
## 4.2.6 Tabla de receptores de 5-HT

5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>4-7</sub>



Receptor acoplado a proteína G

5-HT<sub>3</sub>



Canal de iones de compuerta de 5-HT

Receptor	Estructura génica	Localización	Proteína G acoplada	Señal de Transducción	Segundo mensajero	Función	Agonista	Antagonista
<b>5-HT<sub>1A</sub></b>	Sin intrones	SNC (hipocampo, corteza y rafe), vasos	G <sub>i/o</sub>	Inhibición de la AC	↓ AMP <sub>c</sub>	Autorreceptor, inhibición neural Efectos sobre la conducta: sueño, alimentación, termorregulación, ansiedad.	5-CT 8-OH-DPAT Buspirona (AP)	Espiperona Metiotepina Ergotamina (AP) WAY100635
<b>5-HT<sub>1B</sub>*</b>	Sin intrones	SNC (ganglios basales, sustancia negra, corteza), músculo liso vascular	G <sub>i/o</sub>	Inhibición de la AC	↓ AMP <sub>c</sub>	Autorreceptor Inhibición presináptica Efectos sobre la conducta Vasoconstrictor pulmonar	5-CT Ergotamina (AP)	Metiotepina GR127935
<b>5-HT<sub>1D</sub></b>	Sin intrones	SNC Vasos sanguíneos	G <sub>i/o</sub>	Inhibición de la AC	↓ AMP <sub>c</sub>	Vasoconstricción craneal Efectos	5-CT Sumatriptán	GR127935 Metiotepina

		craneales				sobre la conducta: locomoción		Ergotamina (AP)
<b>5-HT<sub>1E</sub></b>	Sin intrones	SNC (Corteza, Cuerpo Estriado)	G <sub>i/o</sub>	Inhibición de la AC	↓ AMP <sub>c</sub>	_____	5-HT <sup>a</sup> Sumatriptán	Metiotepina
<b>5-HT<sub>1F</sub>**</b>	Sin intrones	SNC Encéfalo y periferia	G <sub>i/o</sub>	Inhibición de la AC	↓ AMP <sub>c</sub>	_____	Sumatriptán	Metiotepina
<b>5-HT<sub>2A</sub> (Receptor D)</b>	Intrones	SNC (corteza cerebral y ganglios basales) SNP Músculo liso Plaquetas	G <sub>q/11</sub>	Activación de la PLC	↑ IP <sub>3</sub> /DAG	Excitación neuronal Efectos sobre la conducta Vasoconstricción/Vasodilatación Agregación plaquetaria Contracción del músculo liso (intestinal, bronquial, etc)	α-Metil-5-HT-DOI LSD (SNC) LSD (periferia)	Ketanserina Ciproheptadina Pizotifeno (no selectivo) LY53857 MDL 100907 Metiotepina
<b>5-HT<sub>2B</sub></b>	Intrones	Fondo gástrico	G <sub>q/11</sub>	Activación de la PLC	↑ IP <sub>3</sub> /DAG	Contracción	α-Metil-5-HT-DOI	LY53857 SB204741 Metiotepina
<b>5-HT<sub>2C</sub></b>	Intrones	SNC Plexo coroideo	G <sub>q/11</sub>	Activación de la PLC	↑ IP <sub>3</sub> /DAG	Secreción de LCR	α-Metil-5-HT-DOI LSD	Mesulergina LY53857 Metiotepina
<b>5-HT<sub>3</sub> (Receptor M)</b>	Intrones	SNC (área postrema) Plexos entéricos Terminaciones	No acoplado a proteína G (canal para	Canal de iones operado por el ligando	Ninguno: canales catiónicos dependientes	Excitación neuronal (neuronas autónomas, nociceptivas)	2-Metil-5-HT Clorfenilguadina	Ondansetrón Tropisetron Granisetron Zacoprida

		vegetativas y sensitivas	caciones)		de ligando	Emesis. Efectos sobre la conducta: ansiedad		
<b>5-HT<sub>4</sub></b>	Intrones	Hipocampo o Tubo digestivo	G <sub>s</sub>	Activación de la AC	↑ AMP <sub>c</sub>	Excitación neuronal Motilidad digestiva	Benzamidas BIMU8 5-metoxitriptamina Renzaprida	GR113808 SB207266 Tropisetron
<b>5-HT<sub>5A</sub></b>	Intrones	Hipocampo	G <sub>s</sub> ¿?	----- ----	----- ---	----- --	----- ----	LSD Metiotepina
<b>5-HT<sub>5B</sub></b>	Intrones	SNC	G <sub>s</sub> ¿?	----- -----	----- ---	----- --	----- ----	LSD Metiotepina
<b>5-HT<sub>6</sub></b>	Intrones	SNC (estriado)	G <sub>s</sub>	Activación de la AC	----- ---	Aumenta la neurotransmisión colinérgica central	----- ----	SB258585 Metiotepina
<b>5-HT<sub>7</sub></b>	Intrones	SNC (hipotálamo) Tubo digestivo	G <sub>s</sub>	Activación de la AC	↑ AMP <sub>c</sub>	Relajación del músculo liso vascular y del aparato GI	5-CT LSD Agonistas no selectivos	SB269970 SB258719 Metiotepina

\* Llamado también 5-HT<sub>1Db</sub>

\*\* Llamado también 5-HT<sub>1Eb</sub>

**AC**, adeniliclasa; **PLC**, fosfolipasa C; **8-OH-DPAT**, 8-hidroxi-(2-N,N-dipropilamino)-tetralina; **DOI**, 1-(2,5-dimetoxi-4-yodofenil)isopropilamina; **SNC**, sistema nervioso central; **SNP**, sistema nervioso periférico; **5-CT**, 5-carboxamidotriptamina; **8-OH-DPAT**, 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralina; **DAG**, diacilglicerol; **5-HT**, 5-hidroxitriptamina, **IP<sub>3</sub>**, trifosfato de inositol; **LCR**, líquido cefalorraquídeo; **LSD**, dietilamida del ácido lisérgico.

- La lista que se presenta de agonistas y de antagonistas comprende solo los compuestos más conocidos hasta el momento.

- Actualmente, se están desarrollando varios ligandos nuevos para los receptores de 5-HT, y por ahora son conocidos por códigos. **Modificado de Rang 2004, Flores 1998, Hardman 1996, Velázquez 2005.**

#### **4.2.7 PAPEL DE LA 5-HT EN EL ASMA**

En el área clínica la importancia de 5-HT en el asma ha sido muy controvertida. En sujetos sanos, inhalar 5-HT no produce ninguna alteración en las vías aéreas; pero en personas asmáticas, inhalan 5-HT, del 10 al 65%, la 5-HT, les ocasiona hiperreactividad de las vías aéreas. El nivel de 5-HT libre en sujetos asmáticos es alto al compararlo con sujetos asintomáticos (Cazzola *et al*, 2000) ; y este nivel de concentración de 5-HT se correlaciona con la severidad del asma y con el VEF<sub>1</sub> (Volumen Espiratorio Forzado al primer segundo) (Dupont *et al*, 1999), de tal forma que la concentración de 5-HT en sujetos asmáticos se relaciona positivamente con el estatus clínico del asma y negativamente con la función pulmonar (VEF<sub>1</sub>)(Lechin *et al*, 1998). Se ha relacionado íntimamente la 5-HT con la HVA, porque se asocia a ésta amina con las sibilancias características del asma (Cushley *et al*, 1986). El nivel elevado de concentración de 5-HT en sujetos asmáticos y la liberación de 5-HT desde las plaquetas durante las reacciones alérgicas tienen un papel importante para que se de la HVA (Dupont *et al*, 1999). La forma por la cual llega 5-HT al pulmón es por las plaquetas, estas la toman 5-HT de las células EC del tracto GI, viajan por la sangre cargadas de 5-HT y por medio de la perfusión pulmonar es como llega por el pulmón (Lechin *et al*, 2007).

Se ha observado que en pacientes asmáticos las concentraciones plasmáticas de 5-HT se incrementan después de una crisis asmática, en comparación con los pacientes asintomáticos (Lechin *et al*, 1994), y este incremento está relacionado significativamente con la gravedad del asma (Lechin *et al*, 1996). Por esto, se ha publicado que si se reducen las concentraciones de 5-HT en la sangre en niños asmáticos, se puede tener una mejor función pulmonar. La tianeptina, por el momento, es el fármaco mejor conocido que recapta 5-HT; al administrarlo en niños asmáticos se observó que disminuía la concentración en sangre de 5-HT y había un incremento en la función pulmonar (Lechin *et al*, 1998). Estas observaciones sugieren que la 5-HT desempeña un papel importante en la patogénesis de la crisis asmática, por lo que la utilización de fármacos modificadores del transporte y de la transmisión sináptica y post-sinápticas de la 5-HT podrían representar nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento del asma.

Se han evaluado los efectos que tienen diferentes receptores de 5-HT en las vías áreas. Estudios realizados *In vitro* en tráquea de cobayo para conocer la función del receptor 5-HT<sub>1</sub> (D'Angostino *et al*, 1996); en estudios *In vivo* también se ha visto que la 5-HT provoca HVA en cobayos (Cushley *et al*, 1986), sin embargo, el efecto de esta amina biogénica ha sido poco explorado en tejidos provenientes de animales sensibilizados.

Se ha observado también, que el receptor 5-HT<sub>2A</sub> en el músculo liso de las vías áreas, provoca contracción a bajas concentraciones de 5-HT y relajación a altas concentraciones; la 5-HT facilita la contracción del músculo

liso en rata y ratón por la estimulación de receptores 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub> (Dupont *et al*, 1999). En el caso del asma alérgica, cuando ocurre la desgranulación de los mastocitos por la interacción del alérgeno con la IgE, se libera una elevada concentración de 5-HT, que favorece que se ocurran crisis de HVA, principalmente por un incremento en la permeabilidad vascular, producción de moco y por varios efectos relacionados con células-T (De Bie *et al*, 1998).

El papel que tiene la 5-HT en el asma puede ser descrito de la siguiente manera: la 5-HT es tomada desde las células endocrinas que se encuentran en el pulmón, localizadas en las terminales parasimpáticas; estas células liberan 5-HT y acetilcolina (ACh), este neurotransmisor induce la contracción del músculo bronquial. Este efecto es mediado por los receptores 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub>, que son receptores post-sinápticos; todo esto da como resultado un incremento de 5-HT en la sangre por la agregación plaquetaria y por la actividad hiperparasimpática nocturna y/o diurna que tendrá como consecuencia la HVA (Lechin *et al*, 2007).

En un estudio reciente se observó que el pretratamiento con ketanserina (antagonista de receptores 5-HT<sub>2A</sub>) inhibe por completo la constricción bronquial inducida por el reto antigénico en cortes de alta precisión provenientes de pulmón de rata sensibilizados de manera pasiva<sup>o</sup> (Wohlsen *et al*, 2001). Hasta este momento, el papel de la 5-HT en la HVA inducida por el reto antigénico en animales sensibilizados no ha sido evaluado.

## 5. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Las vías aéreas de sujetos asmáticos responden con obstrucción exagerada ante estímulos comunes, fenómeno que se llama hiperreactividad de las vías aéreas bronquial (HVA). Aunque se ha sugerido que la serotonina, también llamada 5-hidroxitriptamina (5-HT), participa en la generación de obstrucción aguda durante una crisis asmática, pocos estudios han investigado el papel de la 5-HT en la HVA. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de diversos antagonistas de 5-HT sobre la HVA inducida por reto antigénico en cobayos sensibilizados, para posteriormente poder evaluar con precisión los receptores serotoninérgicos que pudieran estar involucrados en el fenómeno .

## **6. HIPÓTESIS**

La 5-HT desempeña un papel importante en la producción de hiperreactividad de las vías aéreas (HVA) a la ACh inducida por el reto antigénico en cobayos.

## **7. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Investigar la participación de la 5-HT sobre la HVA inducida por reto antigénico en cobayos sensibilizados.

### **Objetivos específicos**

**Investigar el papel de la 5-HT sobre la obstrucción aguda de las vías aéreas y la HVA a ACh inducida por el reto antigénico en cobayos sensibilizados.**

1. Caracterizar un modelo de sensibilización a ovoalbúmina (OA) en cobayos.

2. Evaluar si la OA intravenosa incrementa la resistencia de las vías aéreas en los cobayos asmáticos, es decir, si genera HVA mediante pletismografía para animales anestesiados.
  
3. Determinar el papel de la 5-HT en la respuesta de HVA de las vías aéreas inducida por el reto antigénico mediante el uso de antagonistas de receptores serotoninérgicos como el tropisetron (antagonista de receptores 5-HT<sub>3</sub> y 5HT<sub>4</sub>), la metiotepina (antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub>).
  
4. Analizar si el reto antigénico induce HVA a la acetilcolina (ACh) realizando curvas dosis-respuesta, antes y después del reto a OA.
  
5. Estudiar el papel de la 5-HT en la HVA inducida por el reto antigénico mediante el uso de una mezcla de tropisetron y la metiotepina.

## **8. MATERIAL Y MÉTODOS**

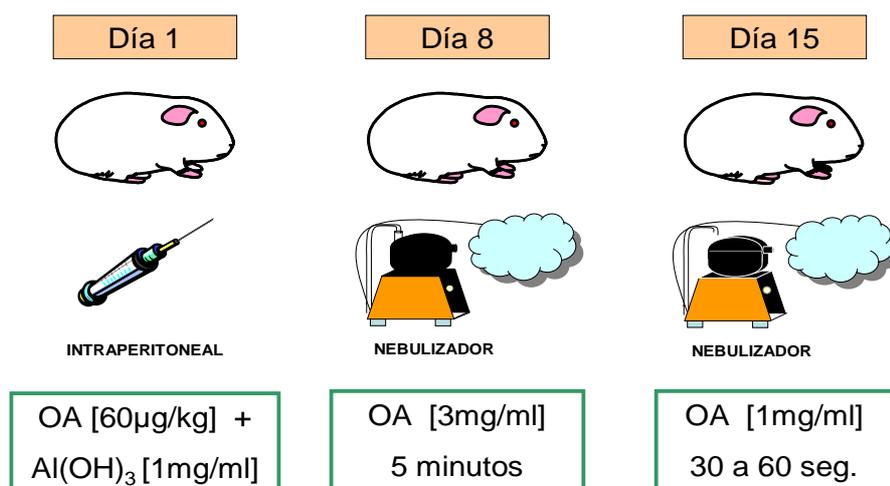
### **8.1 ANIMALES DE ESTUDIO**

Se utilizaron cobayos machos, cepa Hartley, con peso aproximado de 400g al inicio del protocolo, criados en condiciones convencionales de bioterio (aire acondicionado filtrado,  $21\pm 1$  °C, con un 50-70% de humedad, en cama estéril) con acceso a agua y alimento *ad libitum* con un ciclo de luz y oscuridad de 12-12 horas. De acuerdo a las normas establecidas por el Comité Bioético del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Numero de animales....

### **8.2 PROCEDIMIENTO DE SENSIBILIZACIÓN**

Para realizar el proceso de sensibilización se siguió el siguiente procedimiento; el primer día los cobayos fueron inyectados con 60 µg de ovoalbúmina (OA) y 1 mg de hidróxido de aluminio ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) como adyuvante disueltos en 1 ml de SSF que se aplicó subcutáneamente. Siete días después se les administró un refuerzo por vía inhalatoria con 3 mg/ml de OA disueltos en SSF durante 5 minutos, se utilizó una caja de acrílico sellada herméticamente. El día 15 se realizó un segundo refuerzo por vía inhalada con 1 µg/ml de OA en SSF durante 60 segundos, se utilizó un equipo de

pletismografía para animales de libre movimiento a fin de evaluar cuantitativamente la respuesta al refuerzo antigénico en la generación la HVA inducida por el reto a OA. Todos los animales sensibilizados fueron utilizados a partir del día 21 (figura 7).

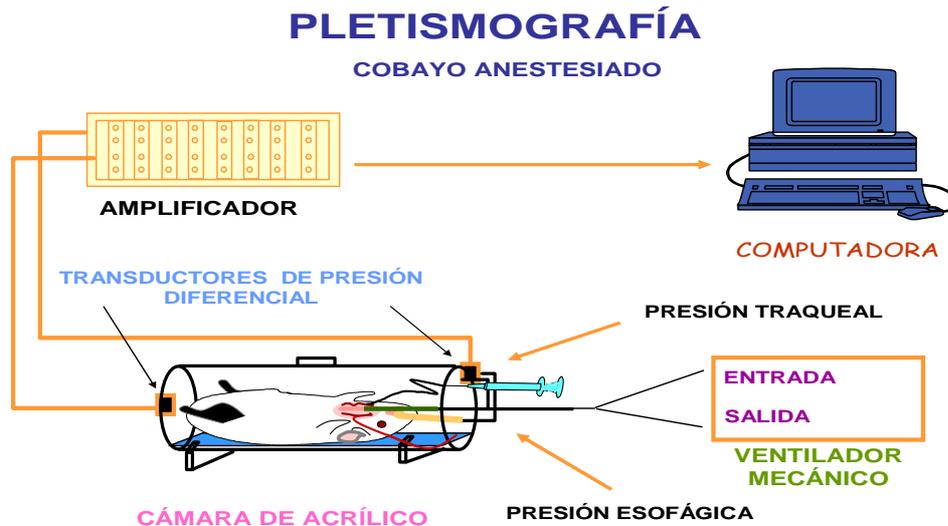


**Figura 7.** Método de sensibilización con Ovoalbúmina para cobayos.

### **8.3 ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN RESPIRATORIA: PLETISMOGRAFÍA PARA ANIMALES ANESTESIADOS**

Los cobayos fueron anestesiados profundamente con pentobarbital sódico (35 mg/kg i.p.), la profundidad de la anestesia se mantuvo al administrar el mismo anestésico aproximadamente cada hora (9 mg/kg i.v.). La vena yugular derecha y la arteria carótida izquierda fueron canuladas para la administración de fármacos y para el registro de la presión arterial, respectivamente. Para el registro de este último parámetro, se utilizó un transductor (modelo 4-327-0129, Beckman), conectado a un polígrafo (modelo

R612, Beckman). La tráquea de igual manera se canuló y se conectó a un ventilador para pequeñas especies (Modelo 50-1700, Harvard Apparatus). Los animales fueron ventilados a un volumen corriente de 10 ml/kg a 48 respiraciones/min. Se administró bromuro de pancuronio (0.06 mg/kg i.v.) a cada animal para suprimir los movimientos torácicos voluntarios. Adicionalmente se canuló también el esófago, para obtener la presión transpulmonar. La señal de presión traqueal se integra a través de un transductor de presión diferencial (SCXL004DN SenSym, CA, USA) unido a las cánulas esofágica y traqueal. El animal se introdujo a la cámara, sellándola herméticamente. Para registrar la señal de flujo se conectó a un extremo de la cámara un segundo transductor de presión diferencial (SCXL004DN SenSym, CA, USA). Ambas señales obtenidas se analizaron a través de un software (Buxco Biosystem XA v1) que genera un registro proveniente de la señal diferencial de flujo (df) y la de presión (dp). En este sistema, el parámetro de resistencia pulmonar ( $R_L$ ) es el producto de la división entre los valores de dp y df ( $R_L=dp/df$ ). El registro de la  $R_L$  permite evaluar las respuestas a dosis crecientes de un agonista.



**Figura 8.** Sistema de pletismografía para cobayos en libre movimiento, permite evaluar la broncoconstricción y la HVA inducida por el reto antigénico a ovoalbúmina in vivo

## 9. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 9.1 REACTIVIDAD DE LAS VÍAS AÉREAS A LA ACETILCOLINA ANTES Y DESPUÉS DEL RETO

La sensibilidad de las vías aéreas a la acetilcolina (ACh) se evaluó realizando curvas dosis-respuesta a dicho agonista. Antes de comenzar cada curva, se registró un valor basal de RL y después se administraron dosis crecientes de ACh a partir de 0.18  $\mu\text{g}/\text{kg}$  hasta incrementar el valor basal de RL dos veces (RL basal  $\times$  3), es decir, obtener la dosis provocativa 200 (DP<sub>200</sub>). Cada registro de RL posterior a la inyección i.v. de ACh representa el valor máximo de RL en un periodo de tres minutos posteriores a la administración.

Después, los animales fueron retados al antígeno (400 µg/Kg de OA i.v. en un bolo único). El efecto del reto antigénico sobre la reactividad de las vías aéreas a la ACh se determinó realizando una segunda curva al agonista una hora después del reto. Estos experimentos fueron realizados tanto en los animales sensibilizados, así como con un grupo de animales controles no sensibilizados. Adicionalmente se evaluó el efecto de los fármacos antiserotoninérgicos (metiotepina 0.3 mg/kg i.v., y/o tropisetron 3 mg/kg i.v.) sobre la HVA inducidas por el reto antigénico administrando los antagonistas 10 minutos antes de realizar la segunda curva a la ACh.

## **10. ANÁLISIS DE DATOS**

El efecto del reto antigénico sobre la reactividad de las vías aéreas a la ACh *in vivo* se evaluó comparando la DP<sub>200</sub> obtenida antes de la administración del mismo, respecto a la obtenida una hora después del reto. Todos los datos se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar con grupos experimentales de al menos cinco animales estudiados. La diferencia estadística se determinó mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y se realizaron pruebas de T student, prueba de Dunnett para comparar los grupos experimentales con los controles o análisis múltiple de Bonferroni acorde a las necesidades. La significancia estadística se fijó a una  $p < 0.05$  a nivel bimarginal.

## **11. JUSTIFICACIÓN DEL USO DE ANIMALES Y CONSIDERACIONES ÉTICAS**

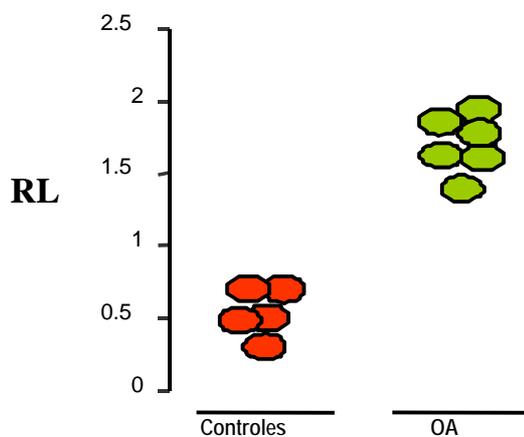
El uso de este modelo experimental animal de sensibilización nos permite evaluar algunos procesos fisiopatológicos que podrían estar presentes en el asma en humanos. Se evitó prolongar innecesariamente la permanencia de los animales en el bioterio. Los animales se manejaron bajo anestesia para minimizar el dolor y cuando fue necesario se eutanasiaron con una sobredosis

de pentobarbital sódico. El cuidado y trato de los animales se hizo de acuerdo a las recomendaciones emitidas por la *Guía para el Cuidado uso de los Animales de Laboratorio*. Los cobayos machos de la cepa Hartley se encuentran bajo cuidados del personal y en las instalaciones del bioterio del INER.

## 12. RESULTADOS

### 12.1 CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE SENSIBILIZACIÓN

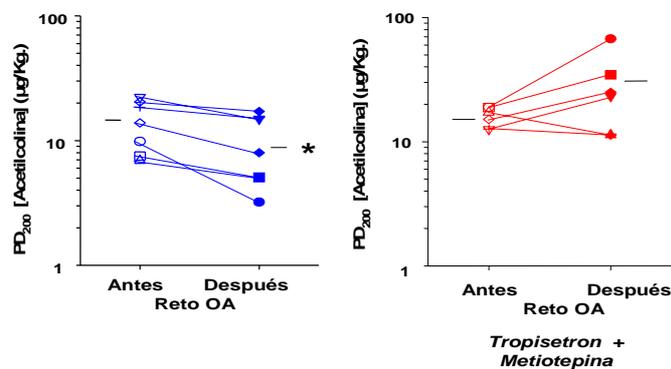
Con el método de sensibilización antes descrito se analizaron 11 cobayos de los cuales cinco fueron controles (n=5) y seis fueron sensibilizados con OA (n=6). Los animales del grupo control mantuvieron la resistencia pulmonar dentro de parámetros normales mientras que los sensibilizados con OA lo llevaron tres veces por arriba de su valor basal. Estos resultados se muestran en la siguiente gráfica:



**Gráfica 1.** Caracterización del modelo de sensibilización en animales controles (n=5) y animales sensibilizados con OA (n=6).

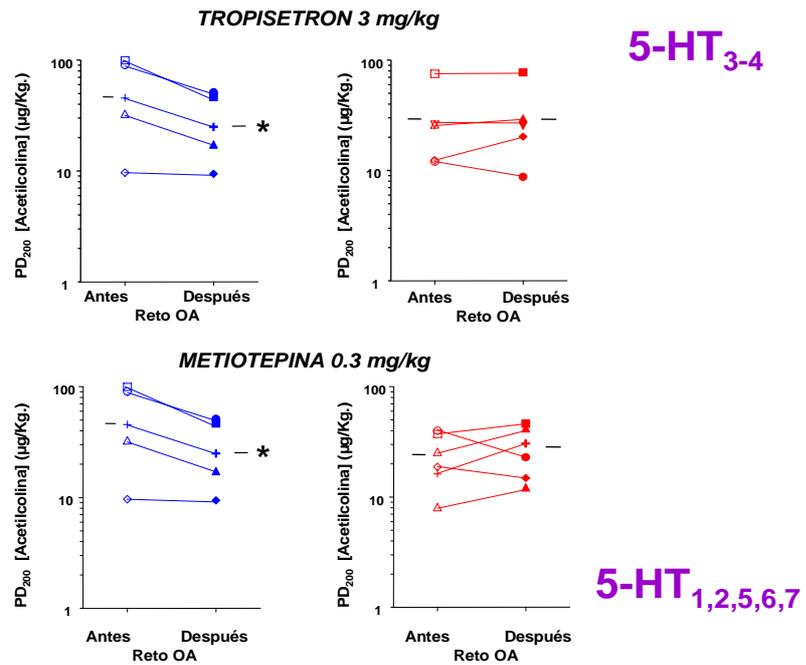
## 12.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE 5-HT

Se determinó el papel de la 5-HT en la respuesta de la HVA inducida por el reto antigénico mediante el uso de antagonistas de receptores serotoninérgicos como el tropisetron (antagonista de receptores 5-HT<sub>3</sub> y 5HT<sub>4</sub>) y la metiotepina (antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub>) donde se concluyó que la HVA pudo prevenirse añadiendo una mezcla de estos dos componentes en una dosis de 0.3 y 3 mg/Kg IV respectivamente.



**Gráfica 2.** Reto OA (n=7, azul),  
Metiotepina + Tropisetron (n=6,  
rojo)

Posteriormente, el tropisetron (n=5) y la metiotepina (n=5) al ser administrados por separado lograron abatir la HVA producida por reto OA. Los receptores sobre los que actúan son 5-HT<sub>3,4</sub> y 5-HT<sub>1,2,5,6,7</sub> respectivamente.



**Gráfica 3.** Reto a OA (n=5, azul), respuesta de Tropicsetron y metiotepina por separado (n=5, rojo)

Los resultados exactos de cada una de las respuestas a los antagonistas se presentan en la siguiente tabla:

<b>Antagonista</b>	<b>Subtipo de receptor de 5-HT bloqueado</b>	<b>DP<sub>200</sub> ACh (µg/Kg) Antes vs. después del reto a OA</b>	<b>Resultado</b>
Control		14.1±2.3 vs 9.8±2.2 p<0.001	HVA
Metiotepina + Tropicsetrón	1,2,3,4,5,6,7	15.9±1.2 vs 28.8±8.5 p=0.16	Inhibición de HVA
Metiotepina	1,2,5,6,7	24.4±5.1 vs 28.1±5.7 p=0.49	Inhibición de HVA
Tropicsetrón	3,4	30.4±9.7 vs 32.3±9.8 p= 0.36	Inhibición de HVA

## 13. DISCUSIÓN

En primer lugar, se validó nuestro modelo de sensibilización a la OA: en los animales tratados que recibieron el reto alérgico, la OA, se desencadenó un incremento significativo de la  $R_L$ , fenómeno que no se observó en los animales controles (figura 9); dejando claro que nuestro modelo de sensibilización es efectivo. Los modelos de sensibilización pueden ser muy variados, Sanjar y colaboradores en 1990, utilizaron un modelo de sensibilización en cobayos en el cual utilizaron 3 inyecciones de OA (1 ó 10  $\mu\text{g}/100$  mg de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  por animal intradermicamente con intervalos de 2 semanas entre cada inyección; y la séptima semana se utilizó OA nebulizada como reto antigénico. En estos animales se obtuvieron LBA en los que se observó que entre mayor sea la concentración de OA que se utilice para sensibilizar mayores son las poblaciones de eosinófilos y neutrófilos, al igual que incrementa la HVA. En 1995 Lewis y colaboradores utilizaron un modelo de sensibilización en el cual inyectaron i.p. 10  $\mu\text{g}$  de OA/ 100 mg de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  y de 14-21 días después fueron utilizados para nebulizarlos con OA como reto antigénico para después nebulizarlos con 5-HT, MCh y adenosina; y observaron que la adenosina provoca broncoobstrucción aguda y la 5-HT y MCh hacen que decrezca la broncoobstrucción.

Por otro lado nuestro modelo de sensibilización también nos permite evaluar la HVA ya que, al administrar el reto antigénico los animales

presentaron un incremento en la sensibilidad a la ACh, es decir, al administrar la segunda curva de ACh se necesitó menos concentración de ésta para alcanzar la misma respuesta broncoobstructora en las vías aéreas, pues quedan sensibles a cualquier estímulo, de tal forma que así es como se observó HVA.

Se determinó el papel de la 5-HT en la respuesta de la HVA inducida por el reto antigénico mediante el uso de antagonistas de receptores serotoninérgicos como el tropisetron (antagonista 5-HT<sub>3,4</sub>) y la metiotepina (antagonista de 5-HT<sub>1,2,5,6,7</sub>). Utilizando nuestro modelo de HVA, pudimos observar que al bloquear los siete receptores de 5-HT mediante la combinación de tropisetron+metiotepina (figura 10) se evitó la HVA. En la tabla 2, se puede observar que se necesitó casi el doble de ACh en la segunda curva con respecto a la primera, al analizar esto nos dice que se pudo evitar la HVA al bloquear todos los receptores de 5-HT que se encuentran en las vías aéreas. Si este fenómeno fuera extrapolable al ser humano el uso de compuestos antiserotoninérgicos podría ser una alternativa en la terapéutica del asma.

Se analizó la función del tropisetron y la metiotepina por separado. El tropisetron, gráfica C, se puede observar que al administrarse, se necesitó casi la misma concentración de ACh en la segunda curva con respecto a la primera curva; en la tabla 2, queda claro que se necesitó menos ACh para llegar a la DP<sub>200</sub>; de tal modo que los receptores 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub> fueron bloqueados y se logró evitar la HVA; dejando en evidencia que estos receptores tienen un papel muy crítico, ya que al bloquearlos generaron una respuesta de evitar la HVA. Con la metiotepina, gráfica D, de la misma forma logró evitar la HVA, ya que se necesitó más ACh en la segunda curva de ACh, se puede notar que la

diferencia entre la primera y la segunda curva de ACh es muy notoria, entonces con la administración de este antagonista ayudo al animal a protegerse de la HVA.

En estudios realizados sobre la 5-HT y la relación estrecha que tiene con el asma, se han encontrado grandes hallazgos. Lechin y colaboradores en 1996 encontraron que las concentraciones de 5-HT se elevan considerablemente en sujetos asmáticos después de la crisis asmática en comparación con sujetos que no son asmáticos, de tal forma que estas concentraciones elevadas de 5-HT van a repercutir de manera directa en la función pulmonar, haciendo que haya un aumento en la gravedad del asma. Como ya se mencionó anteriormente, la 5-HT tiene diversas funciones, una de estas es ser un neurotransmisor importante del sistema nervioso central, por lo tanto, la gran parte de las investigaciones sobre 5-HT es sobre esta función. Al igual, pero en menor medida, se han hecho investigaciones en la función que tiene en el tracto gastrointestinal, ya que la 5-HT tiene la principal función de actuar como hormona local para los movimientos peristálticos.

En pocos estudios se ha podido encontrar una relación entre el asma y las concentraciones séricas de 5-HT, Lechin y colaboradores en 1998 hicieron una investigación en la cual observaron dicha relación al suministrar concentraciones crecientes de tianeptina, que es un fármaco capaz de reducir las concentraciones plasmáticas de 5-HT, y los resultados que él obtuvo fueron muy interesantes, ya que al administrar este fármaco a sujetos con asma, se dieron cuenta que la función pulmonar mejoró.

En 1998 De Bie y colaboradores, hicieron un estudio en ratones sensibilizados a OA, para poder medir la modificación de la HVA utilizando antagonistas de histamina (mepirina y cimetidina) y de 5-HT (ketanserina y metiotepina). Estos autores utilizaron un modelo de HVA parecido al nuestro, pero éste modelo se utilizó a la metacolina como agonista para provocar la broncoobstrucción; y De Bie y colaboradores observaron que la ketanserina fue capaz de disminuir la HVA, pero cuando este antagonista fue combinado con cimetidina, antagonista de receptores H<sub>2</sub>, completamente se inhibió la HVA. Dejando claro que estos mediadores tienen una gran influencia en la generación de HVA. Por otro lado Yoshida y colaboradores en el 2002, hicieron un estudio de igual manera en ratones, estos fueron sensibilizados con OA, en donde se estudio la segregación de histamina y 5-HT después de la agregación plaquetaria, ya que la segregación plaquetaria sucede después de una reacción alérgica.

Nuestros resultados, así como los antecedentes presentados nos permiten observar, que la 5-HT desarrolla un papel importante en la HVA, se debe seguir una línea de estudio, en la cual se caractericen todos los receptores (5-HT<sub>1,2,3,4,5,6,7</sub>), por separado y ver cuáles son los más influyentes en la HVA. Este estudio fue una caracterización fisiológica del papel de la 5-HT en las vías aéreas; para seguir con la línea de investigación de este estudio se pretende una caracterización histológica, para ubicar en que parte de las vías aéreas se encuentran los receptores de 5-HT, al igual cuantificar receptores y

medir las concentraciones de 5-HT que se libera en el momento de la HVA.

Estos estudios serán los objetivos de mi proyecto de posgrado.

## 14. CONCLUSIÓN

La 5-HT desempeña un papel importante en la HVA a la ACh inducida por el reto antigénico en cobayos, ya que al administrar los antagonistas de 5-HT, tropisetron y metiotepina, se pudo evitar la HVA tanto combinados como separados. Ambos compuestos en conjunto, bloquearon los 7 receptores de 5-HT (5-HT<sub>1,2,3,4,5,6,7</sub>), por lo que no podemos dilucidar con exactitud que receptor o que receptores son los que trabajan para evitar la HVA. Pero, se deja con gran evidencia que al bloquear todos los receptores de 5-HT que se encuentran en las vías aéreas se puede abatir la HVA.

## 15. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas AK, Lichtman AH. 2004. Inmunología celular y molecular. 5<sup>a</sup> edición. Elsevier imprint. Madrid. 432-452 pp.
- Barnes PJ, Rodger IW, Thomson NC. 1998. Asthma. Basic mechanics and clinical management. 3<sup>a</sup> edición. Academic press. London. 1-3, 514-517 pp.
- Cano VF, Ibarra PC, Morales GJ, 2006. Enfermedades respiratorias. Temas selectos. 1<sup>a</sup> edición. Elsevier España. Madrid.255-270.
- Cazzola, M., and Matera, M.G. 5-HT Modifiers as a potential treatment of asthma. *Trends in Pharmacological Sciences* 2000, 21:13-16.
- Cushley, MJ., Wee, LH. and Holgate, ST. The effect of inhaled 5-hydroxytryptamine (5-HT, serotonin) on airway caliber in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1986; 22:487-490.
- D'Agostino B, Matera MG, Cazzola M, Mangrella M, Rossi F. Effects of *in vitro* 5-HT<sub>1</sub> receptor activation in guinea pig trachea. *Life Sci.* 1996;59(2):153-160.
- De Bie J.J., Henricks P.A.J., Cruikshank W.W., Hofman G., Jonker E.H., Nijkamp F.P., Van Osterhout A.J. Modulation of airway hyperresponsiveness and eosinophilia by selective histamine and 5-

HT receptor antagonista in a mouse model of allergic asthma. *Br J Pharmacol.* 1998; 124:857-864.

- Dupont, L.J., Pype, M.G., Demedts, P, De Leyn., Deneffe G and Verleden G.M.: The effects of 5-HT on cholinergic contraction in human airways in vitro. *Eur. Respir.J.* 1999;14: 642-649.
- Flores J, Armijo JA, Mediavilla A. 1998. Farmacología humana. 3<sup>a</sup> edición. Masson Multimedia. Barcelona. 315-320 pp.
- Gaginella TS, Galligan JJ. 1995. Serotonin and gastrointestinal function. 1<sup>a</sup> edición. CRC Press, Inc. Florida. 1-5, 21, 53, 85 pp.
- García IDA, Huerta LJG. Asma en menores de 5 años. *Alergia, asma e inmunología pediátricas*. 2003,12(3); 82-88.
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. 2004. Inmunología. 5<sup>a</sup> edición. Mc Graw-Hill. USA. 99-100, 382-399 pp.
- Guidelines for the diagnosis and management of asthma. Expert Panel Report 2. NIH Publication. No. 97-4051. 2005.
- Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman GA. 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Vol. I. 8<sup>a</sup> Edición. Mc Graw-Hill Interamericana. México. 265-279 pp.
- Huerta LJG. Asma bronquial infantil. Tratamiento. *Alergia, asma e inmunología pediátricas*. 2001, 10(3); 72-76.
- Jeffery KP, Haahtela T. Allergic rhinitis and asthma: inflammation in a one airway condition. *BMC Pulm Med*. 2006; 6(1):S5.

- Jiménez GCA, Cuevas SF. Neumología y cirugía de tórax. *Sociedad mexicana de neumología y cirugía de tórax*. 2005;64(S3); S117-S139.
- Lechin F, van der Dijs B, Lechin A, Orozco B, Lechin M, Báez S, Rada I, León G, Acosta E. Plasma neurotransmitters and cortisol in chronic illness: role of stress. *J. Med*. 1994;25, 181-192.
- Lechin F., van der Dijs B, Orozco B, Lechin M, Lechin AE. Increased levels of free serotonin in plasma of symptomatic asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996; 77: 245-253.
- Lechin F, van der Dijs B; Orozco B; Jara H; Rada I; Lechin M, Lechin A. Neuropharmacologic treatment of bronchial asthma with the antidepressant tianeptine: a double-blind, crossover, placebo-controlled study. *Clin Pharmacol Ther* 1998; 64:223-32.
- Lechin F, Van der Dijs B., Lechin A.E. Serotonin Bronchial Hyperresponsiveness and Eosinophilic Cholangiopathy. *Dig Dis Sci*. 2007; 52:3369-3370.
- Lewis CA, Broadley KJ. Airway hyper- or hyporeactivity to inhaled espasmogens 24h after ovalbumin challenge of sensitized guinea pigs. *Br J Pharmacol*. 1995;116:2351-2358.
- Lorenzo P, Moreno A, Leza JC, Lizasoan I, Moro MA. 2005. Farmacología básica y clínica / Velázquez. 17<sup>a</sup> edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid. 477-486 pp.

- Meunier J-M, Shvaloff A. 1999. Neurotransmisores. Bases Neurobiológicas y Farmacológicas. 2ª edición. Editorial Polemos S.A. Buenos Aires. 113-120 pp.
- Platts-Mills T, Leung DYM, Shtaz M. The role of allergens in asthma. *Am Fam Physician.* 2007; 76:675-680.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. 2004. Farmacología. 5ª edición. Elsevier España S.A. Madrid. 184-192, 480-482 pp.
- Roca J. 1993. Asma bronquial. 1ª edición. Ediciones Doyma S.A. Barcelona. 1, 18-22 pp.
- Sanjar S, Aoki S, Kristersson, Smiyh D, Morley J. Antigen challenge induces pulmonary airway eosinophil accumulation and airway hyperreactivity in sensitized guinea-pigs: the effect of anti-asthma drugs. *Br J Pharmacol.* 1990; 99:679-686.
- Strek ME. Difficult asthma. *Proc Am Thorac Soc.* 2006; 3:116-123.
- Wohlsen A, Uhling S, Martin C. Immediate allergic response in small airways. *An J Respir Crit Med.* 2001;163(6):1462-1469.
- Ying S, Zhang G, Gu S, Zhao J. How much do we know about atopic asthma: Where are we know?. *Cell Mol Immunol.* 2006;3(5):321-332.
- Yoshida A, Ohba M, Wu X, Sasano T, Nakamura M, Endo Y. Accumulation of platelets in the lung and liver and their degranulation following antigen-challenge in sensitized mice. *Br J Pharmacol.* 2002; 137(2):146-152.