



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES
DE 5-HT DURANTE EL BRONCOESPASMO
INDUCIDO POR RETO ANTIGÉNICO EN UN
MODELO DE ASMA EN COBAYOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

JULIO GUTIÉRREZ BARRAGÁN

DIRECTOR:

Dr. José Luis Arreola Ramírez

ASESOR:

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

MÉXICO. D.F.

JUNIO 2013



**FES
ZARAGOZA**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.**

Comunico a usted que el alumno **GUTIERREZ BARRAGAN JULIO**, con número de cuenta **403072989**, de la carrera de Biología se le ha fijado el día **4** del mes de **junio** de 2013 a las **18:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en BRA MARÍA JUDITH VILLAVICENCIO MACIAS
VOCAL DR. JOSÉ LUIS ARREOLA RAMÍREZ *
SECRETARIO DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO
SUPLENTE DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR
SUPLENTE BIÓL. ANA LAURA MALDONADO TENA

El título de la tesis que presenta es: **Determinación de las concentraciones de 5-HT durante el broncoespasmo inducido por reto antigénico en un modelo de asma en cobayos.**

Opción de titulación: tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D. F., a 2 de mayo de 2013.

Dr. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

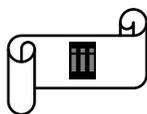
RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

Lugar donde se desarrolló el tema:

**DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN HIPERREACTIVIDAD
BRONQUIAL DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS “ISMAEL COSIO VILLEGAS”**

**En colaboración con el Hospital Centro Médico siglo XXI en el área de Cardiología en
la Unidad de Investigación Biomolecular, dirigido por el Dr. Gabriel Manjarrez
Gutiérrez con la colaboración del Dr. José Luis Arreola Ramírez y la Dra. Patricia
Segura Medina**



AGRADECIMIENTOS:

Antes que nada agradezco a Dios infinitamente por darme la oportunidad de estar vivo.

A mi padre Francisco Gutiérrez Apolonio por confiar y creer en mí. A mi madre Guadalupe Barragán Tolentino que mucha falta me ha hecho y a mis abuelos (Q.P.D).

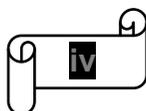
A mis hermanos: Ezequiel, Aquilino, Guadalupe y en especial a mi hermana Gudalia que para mí ha sido un ejemplo a seguir y por apoyarme en todo, los quiero mucho.

A mis tíos que aunque mucho o poco me han apoyado se los agradezco infinitamente, en especial a mi tía Ana G. A. que gracias a ella tuve y he tenido un techo donde vivir a pesar de nuestras diferencias.

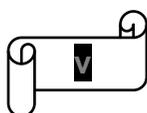
A la FEZ-ZARAGOSA (UNAM) por darme la oportunidad de pertenecer a esta institución.

Al INER y el departamento de investigación de Hiperreactividad Bronquial en especial al Dr. José Luis Arreola Ramírez y la Dr. Patricia Segura Medina por dirigirme en mi tesis de licenciatura y apoyarme en todo momento, también agradezco al Dr. Gabriel Manjarrez, Dra. Patricia Campos, Dr. Jaime Chávez por el apoyo que me brindaron, no me que das que decirles ¡Gracias mil gracias!

A mis compañeros de laboratorio de Hiperreactividad Bronquial a Jesús, Lupita, Mayra, ¡Gracias! por su apoyo.



ÍNDICE	VI
RESUMEN	V
INTRODUCCIÓN	1
Características.....	1
Hiperreactividad bronquial (HVA).....	2
Factores que influyen en el desarrollo del asma.....	2
Broncoespasmo.....	2
Modelo experimental.....	3
Modelo de broncoespasmo.....	4
SEROTONINA	5
Producción y función.....	7
Síntesis y metabolismo.....	8
Liberación de serotonina.....	10
Serotonina en asma.....	11
Serotonina en pulmón.....	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	14
Objetivo general.....	14
Objetivos particulares.....	15
Justificación del uso de animales y consideraciones éticas.....	15
MATERIAL Y MÉTODO	16
Animales de estudio.....	16
Procedimiento de sensibilización para cada grupo.....	16
Obtención de muestras sanguíneas.....	18
Descripción del estudio.....	20
Pletismografía para animales anestesiados.....	20
Determinación de serotonina por Cromatografía de Líquidos de Alta precisión.....	21
Reactivos utilizados.....	22
Análisis de datos.....	22
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES	31
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

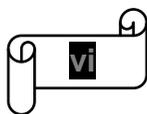


RESUMEN

El asma es una enfermedad compleja caracterizada por desórdenes inflamatorios crónicos de las vías aéreas. Afecta a millones de personas y cuesta millones de dólares en cuidados hospitalarios cada año. Se ha trabajado con diversos modelos de experimentación para recrear las características del asma que son la inflamación, broncoespasmo y la hiperreactividad de las vías aéreas. Para medir la hiperreactividad y el broncoespasmo de las vías aéreas se ha utilizado la técnica de pletismografía barométrica, que mide la resistencia de las vías aéreas (R_L) y es ampliamente aceptada como un indicador de hiperreactividad. Se cree que la 5-HT está involucrada en la fisiopatología del asma, causando en sujetos asmáticos un incremento en las concentraciones de 5-HT en el plasma, provocando broncoconstricción durante una exacerbación asmática, este incremento está relacionado con la gravedad del asma, pocos estudios han investigado el papel de la serotonina en el broncoespasmo. El objetivo del trabajo fue determinar las concentraciones de serotonina en plasma rico en plaquetas (PRP) plasma pobre en plaquetas (PPP) y en concentrado plaquetario (CP) de cobayos, sensibilizados; antes, durante y después del reto antigénico.

Todos los animales fueron sensibilizados, mediante una inyección ip e iv, después se les realizó pletismografía al día 21 para medir la resistencia pulmonar (R_L) excepto al grupo control. A todos los animales se les obtuvo muestra sanguínea para determinar las concentraciones de 5HT, por HPLC de detección fluorométrica. Las concentraciones de 5-HT tuvieron una relativamente alta dispersión de los valores, lo que se reflejó en una falta de significancia estadística entre los diferentes grupos. Sin embargo, hubo algunas tendencias que vale la pena mencionar. La concentración de 5HT tuvo al día 21 de sensibilización una tendencia a ser mayor que la encontrada en el grupo control no sensibilizado, en especial en PRP y en PPP, tanto en el ventrículo izquierdo como el ventrículo derecho. Durante el reto antigénico las concentraciones de 5-HT en la sangre tomada del ventrículo izquierdo tendieron a ser mayores que las del ventrículo derecho. El ventrículo derecho indica la cantidad de serotonina que entra hacia el pulmón para generar broncoespasmo y esta a su vez muestra la cantidad de serotonina que es liberada por el pulmón hacia el ventrículo izquierdo durante el broncoespasmo, esto se refleja en el PRP, PPP que en el CP mostrando una tendencia menor en el ventrículo derecho y una mayor en el ventrículo izquierdo.

En los cobayos que fueron sometidos al reto antigénico la R_L en condiciones basales fue de 0.497 ± 0.031 cmH₂O/ml/s, n=6. La sensibilización a OA produjo dentro de los siguientes 2 a 6 min un aumento máximo de la R_L de casi cuatro veces (389.5 ± 48.8 cmH₂O/ml/s) el valor basal antes del reto. Por otra parte, una hora después que se le da el reto antigénico al cobayo, la R_L no disminuye sin embargo el broncoespasmo se inhibe. Las cantidades de serotonina del ventrículo izquierdo como el derecho son mayores que las del grupo control, la cantidad de serotonina que entra al pulmón es mayor pero incapaz de generar broncoespasmo en el cobayo. La concentración de 5-HT cuantificada en sangre proveniente de los pulmones (ventrículo izquierdo) tuvo una alta correlación con el grado máximo de broncoespasmo, tanto en el PRP ($r=0.97$ $p=0.007$, n=5,) como en el PPP ($r=0.97$, $p=0.006$, n=5,) durante el reto antigénico, debido a que a mayor broncoespasmo, mayor es la R_L y por lo tanto mayor es la concentración de 5-HT liberada del pulmón hacia el ventrículo izquierdo. Sugiriendo que la 5-HT total o libre tuvo alguna participación en la generación del broncoespasmo durante su paso por el ventrículo derecho hacia el pulmón



incrementándose de manera significativa en el ventrículo izquierdo, esta asociación entre 5-HT y R_L durante el reto antigénico no se observó en el CP ($r=-0.44$, $p=0.45$,) pueda ser que la plaqueta no haya almacenado 5-HT sino más bien lo haya liberado al plasma o estén involucradas otras células en el pulmón que evitan que la plaqueta recapture serotonina. Sin embargo, una hora después de que cedió el broncoespasmo (después del reto antigénico) y que los valores de R_L disminuyera, la 5-HT del CP fue la única que tuvo un aumento en la concentración, evidenciando que después de una hora la 5-HT plasmática disminuye incrementándose en el CP, indicando una correlación positiva con el grado de broncoespasmo máximo, podría ser que después de una hora la plaqueta haya recapturado serotonina disminuyendo las concentraciones en el plasma ($r=0.76$, $p=0.03$), sin que hubiera correlación entre este último con los niveles de 5-HT en PRP ($r=0.08$, $p=0.84$) y en PPP ($r=0.44$, $p=0.27$). Para corroborar la participación de la serotonina en el broncoespasmo inducido por el reto antigénico, se utilizaron antagonistas de los receptores a 5HT, (tropisetron 3 mg/ kg y metiotepina 0.3mg/kg) para inhibir el broncoespasmo. Podemos concluir de acuerdo a los resultados obtenidos, que la 5-HT desempeña un papel importante en el broncoespasmo inducido por el reto antigénico en cobayos sensibilizados.

INTRODUCCIÓN

El asma es una de las enfermedades inflamatorias crónicas de las vías aéreas más comunes, en la cual intervienen diferentes procesos celulares provocando la disminución del calibre bronquial. La acumulación de células inflamatorias, la hiperplasia epitelial y deposición del tejido conectivo pueden contribuir a la disminución de la pared de las vías respiratorias, provocando así la disminución del flujo de aire hacia los pulmones acompañado de la broncoconstricción (Temelkovski, 2008).

Afecta aproximadamente al 10% de la población mundial y la incidencia, ha aumentado considerablemente en los últimos 20 años en países industrializados, afectando a 300 millones de individuos en el mundo, principalmente a niños (Hon *et al.*, 2010, Dones *et al.*, 2012). Puede presentarse a temprana edad pero también puede presentarse en la edad adulta y es la tercera causa de hospitalización y ausentismo escolar en niños (Gilmour *et al.*, 2006, Gonzáles *et al.*, 2008, Ricciardolo *et al.*, 2008).

Características

La inflamación crónica, la broncoobstrucción reversible y la hiperreactividad bronquial son características del asma (Dones *et al.*, 2012). Aunque se desconocen los mecanismos que la inducen, la remodelación como la fragilidad epitelial y el engrosamiento de la membrana basal reticular e inflamación podrían estar implicadas (Brutsche *et al.*, 2006, Bazán-Perkins *et al.*, 2009), así como la degranulación de los mastocitos, la atracción de células inflamatorias como los eosinófilos, neutrófilos, la activación de linfocitos T, producción de inmunoglobulinas E (IgE) y otras células inflamatorias (Liu *et al.*, 2012).

Hiperreactividad bronquial

La facilidad con que se contraen las vías respiratorias en el asma es debido a la hipersensibilidad ante estímulos externos e internos, provocando así una disminución en el calibre bronquial a esto se le denomina hiperreactividad de las vías aéreas (HVA), las cuales son cambios patológicos de las vías respiratorias y su relación es poco conocida (Miyahara *et al.*, 2005, Oliver *et al.*, 2007).

Factores que influyen en el desarrollo del asma

Los factores más comunes que provocando estos desordenes en las vías aéreas son ambientales, como la exposición a alérgenos como ácaros, cucarachas, pólenes, infecciones virales, el humo de tabaco, la contaminación, el aire frío, el ejercicio físico y la ingesta de alcohol. En pacientes asmáticos al estar en contacto con estos factores, le provocan episodios recurrentes de disnea, jadeo, hundimiento del pecho, sibilancia, espasmos y tos. Los factores genéticos que provocan el desarrollo del asma puede ser la obesidad ya que pueden aumentar la probabilidad de desarrollar asma (Santana *et al.*, 2007).

Broncoespasmo

El pulmón, es un órgano complejo con compartimientos separados, tiene una barrera alveolo-capilar, el endotelio microvascular y el epitelio alveolar. El pulmón, cuando es esta en contacto con alérgenos como la ovoalbúmina (OA), virus, bacterias o con sus propias endotoxinas, presenta cambios patológicos, estimulando varias respuestas de inmunidad innata como el reclutamiento de células inflamatorias, lesión del epitelio alveolar y alteración de la integridad capilar pulmonar, provocando obstrucción de la vía aérea,

inflamación, exceso de mucosidad, contracción del músculo (Figura 1), todo esto en su conjunto se le denomina broncoespasmo (Perros *et al.*, 2011).

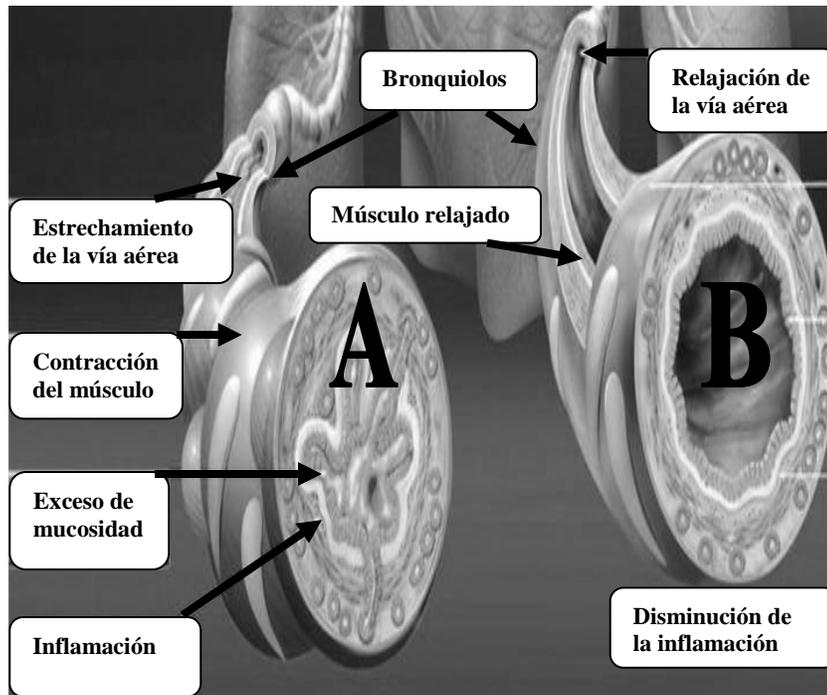


Figura 1. Estrechamiento del calibre bronquial por la contracción del músculo liso en el broncoespasmo.

(A) bronquiolo inflamado, (B) bronquiolo normal (modificado de Jeffery y Haahtela, 2006).

Modelo experimental

Se han hecho intentos para modelar al asma en una gama de especies incluyendo primates, ovejas, conejos, perros, gatos, ratas, ratones y cobayos, pero algunos modelos experimentales suelen ser muy costosos y no garantizan de estar libres de infecciones en el caso de los primates, ovejas a pesar de la no consanguinidad con los humanos (Temelkovski, 2008).

Modelo de broncoespasmo

Un modelo de broncoespasmo alérgico en cobayos sensibilizados a ovoalbúmina (OA) se utiliza para el estudio de HVA en asma, ya que los cobayos tienden a generar una mayor hipersensibilidad de las vías aéreas a la exposición de antígenos. Por lo tanto, son ampliamente utilizados como un modelo experimental en el asma alérgica (Bazán-Perkins *et al.*, 2009).

El reto antigénico se lleva a cabo estando los cobayos en un pletismógrafo para animales anestesiados y administrándoles 400 µg/kg de ovoalbúmina por vía intravenosa (iv). Esta dosis suele generar rápidamente un broncoespasmo que alcanza su máximo alrededor de 2 a 6 minutos, y que paulatinamente se revierte en 15 a 30 minutos (Segura *et al.*, 2010).

La metodología reportada en la literatura, para medir directamente la función respiratoria en animales que se mueven libremente se le domina pletismografía barométrica (Figura 2). Los principios fundamentales de esta técnica no invasiva se basan en los cambios de presión que ocurren dentro de la cámara del pletismógrafo, por la adición de calor y vapor de agua que se originan al entrar al sistema respiratorio del cobayo.

Esto consiste en colocar un cobayo, en una cámara de acrílico donde la tráquea se canula y se conecta a un ventilador para suministrar un flujo de aire constante sin alterar la señal respiratoria, adicionalmente se canula el esófago para obtener la presión transpulmonar. Para registrar la señal de flujo, la presión traqueal y la transpulmonar se conectan a un transductor de presión diferencial para calcular la resistencia pulmonar, el cobayo se introduce en la cámara del pletismógrafo quedando herméticamente sellada (Vargas *et al.*, 2010).

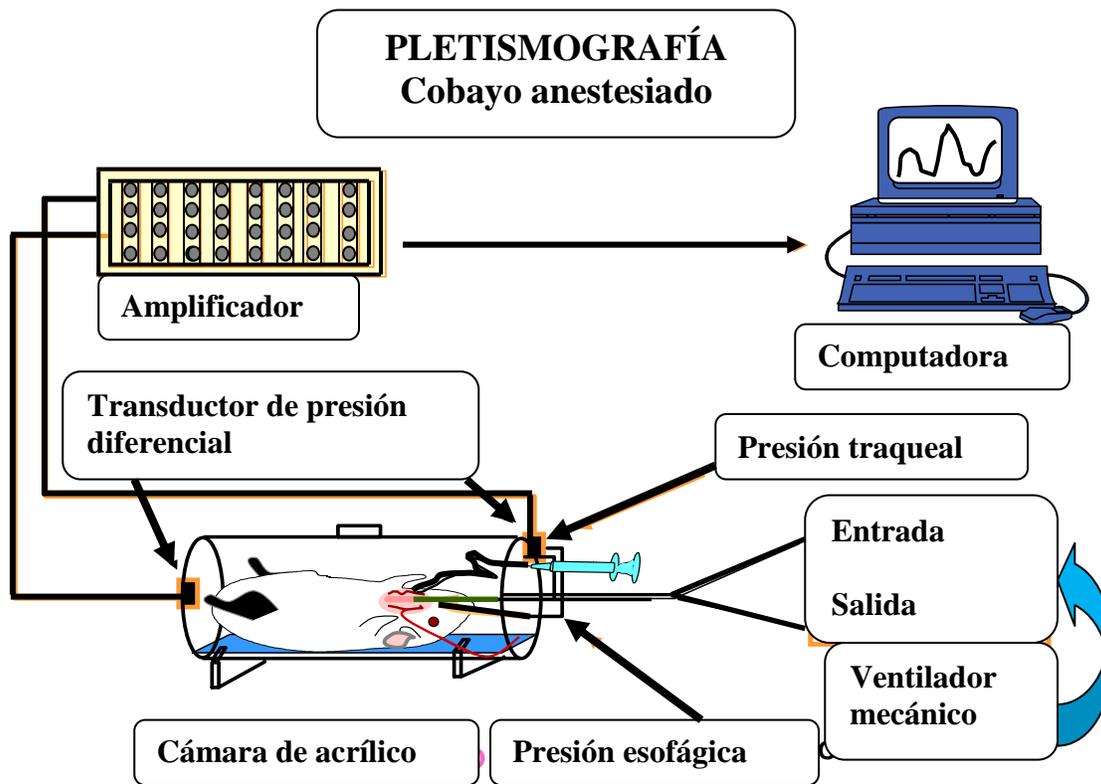


Figura 2. Sistema de pletismografía para cobayos en libre movimiento, permite evaluar la HVA inducida por el reto antigénico a ovoalbúmina *in vivo*.

SEROTONINA

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es una molécula bioactiva en la naturaleza, se encuentra en diferentes especies de semillas como en el girasol y actúa como neurotransmisor del SNC en todas las especies del reino animal. La 5-HT fue descubierta por Rapport en 1942, y aislada del suero vacuno y la llamaron serotonina por su efecto vasoconstrictor (Hodges y Richerson, 2008, Mercado and Kilic, 2010).

Está implicada en la modulación de diferentes funciones fisiológicas. Debido a su amplia presencia en diferentes órganos diana, la 5-HT puede provocar motilidad intestinal,

vasoconstricción, relajación o contracción del musculo liso bronquial (Goolaerts *et al.*, 2010 Echave, 2008, Hodges y Richerson, 2008, Troppmann *et al.*, 2010).

La 5-HT está presente en varios sistemas del organismo. Una es la del sistema nervioso central (SNC) donde actúa como neurotransmisor, a su vez, está implicada en un número de procesos fisiológicos fuera del CNS, como en el sistema nervioso entérico, sistema serotoninérgico neuroendocrino y sistema serotoninérgico periférico que incluyen al corazón, pulmones, páncreas entre otros (Figura 3) (Murphy *et al.*, 2008, de Jong *et al.*, 2010).

La 5-HT ha sido estudiada en la glándula mamaria y en la próstata. Aunque no ha sido completamente explorada la acción de la 5-HT en las glándulas salivales, páncreas, tiroides, pulmón y el hígado (Pai y Marshall, 2011).

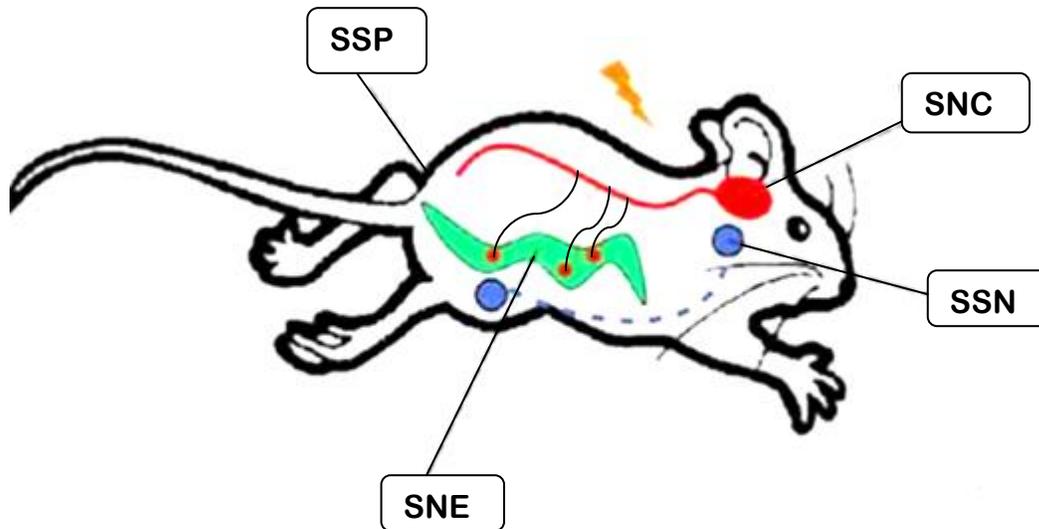


Figura 3. Sistema serotoninérgico cerebral y periférico: sistema nervioso entérico (SNE), sistema nervioso central (SNC), sistema serotoninérgico neuroendocrino (SSN) y sistema serotoninérgico periférico (SSP) (tomado de Murphy *et al.*, 2008).

Producción y función

La 5-HT es producida por neuronas, localizadas en el núcleo de rafé del SNC y fuentes no neuronales como células enterocromafines del intestino y las células neuroendocrinas pulmonares (Hodges y Richerson 2008, Davis *et al.*, 2012). Aproximadamente el 90-95 %, de la 5HT se encuentra en las células enterocromafines del aparato gastrointestinal, y solo el 1-2% se localiza en plaquetas y neuronas (Brand y Anderson, 2011)

Es liberada por diferentes células como mastocitos, plaquetas, células neuroepiteliales pulmonares de las vías respiratorias superiores (Goolaerts *et al.*, 2010). Al ser liberada puede provocar diferentes respuestas fisiológicas en las vías aéreas, como contracción del músculo liso de la vía aérea en ratones, ratas y cobayos (Zhang *et al.*, 2007).

Algunas evidencias sugieren que la 5-HT regula las funciones cardiovasculares durante la embriogénesis y en la edad adulta. Se ha identificado a la 5-HT y a sus receptores en el neuroepitelio y miocardio de roedores de ocho días de gestación, así como también a la proteína transportadora de serotonina (SERT), que es la responsable de la recaptación y regulación de 5-HT extracelular (Brenner *et al.*, 2007, Hodges y Richerson, 2008, Murphy *et al.*, 2008, Manjarrez-Gutiérrez *et al.*, 2009, Mercado and Kilic, 2010, Troppmann *et al.*, 2010). Además, la 5-HT en el sistema cardiovascular tiene funciones de vasoconstrictor, promueve la agregación plaquetaria y regula el tono vascular (Brenner *et al.*, 2007, Mercado and Kilic, 2010).

Síntesis y metabolismo

La síntesis de 5-HT se inicia a partir del triptófano que es oxidado en la posición 5 del anillo pirrólico, mediante la enzima triptófano-5-hidroxilasa (TpH-1) dando como producto a la 5-hidroxitriptófano, esta molécula tras la descarboxilación por la 5-hidroxitriptamina descarboxilaza da lugar finalmente a la 5-HT (Figura 4) y solo el 2% del triptófano de la dieta es utilizado para síntesis de 5-HT, el resto se utiliza en la síntesis de proteínas.

La 5-HT periférica se metaboliza principalmente en el pulmón y el hígado como resultado de la acción enzimática de la monoaminoxidasa (MAO) que transforma a la amina en 5-hidroxi-indolacético (5HIAA) (de Jong *et al.*, 2010).

La 5-HT es sintetizada en dos sitios muy importantes. En el interior de las neuronas serotoninérgicas, estas neuronas son identificadas así, ya que contienen a las enzimas necesarias para la síntesis de 5-HT, como la triptófano hidroxilasa 2 que oxida al triptófano

para la síntesis de 5-HT. El segundo sitio donde se sintetiza la 5-HT es en el tracto gastrointestinal, exactamente en las células enterocromafines (EC) (Gaginella 1995).

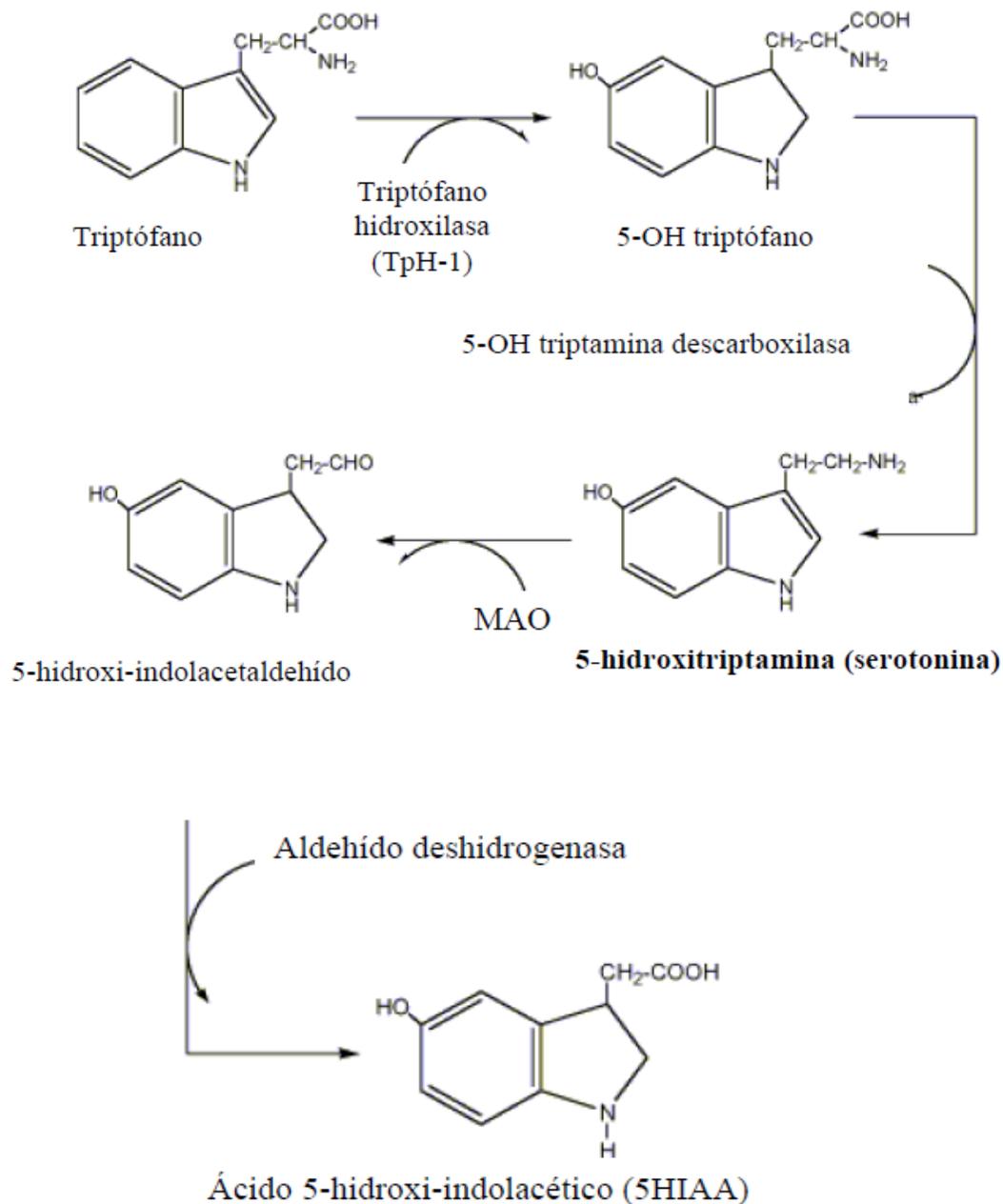


Figura 4. Síntesis y degradación de serotonina (tomado de Echave, 2008).

Liberación de serotonina

La 5-HT es liberada por exocitosis, de las neuronas serotoninérgicas. El mecanismo de exocitosis dependientes de Ca^{+} consiste en la despolarización de la membrana de las neuronas serotoninérgicas, esta despolarización conlleva que se habrán canales de Ca^{+} dependientes de voltaje y por consiguiente la entrada de Ca^{+} en la terminal sináptica que promueve la liberación de 5-HT. Una vez que la 5-HT es liberada, se puede acoplar a receptores postsinámpticos [Figura 4(1)], también puede difundirse en el espacio extracelular y ser recaptada por la propia terminación nerviosa [Figura 4(2)]. Cuando la 5-HT es liberada, un transportador de alta afinidad (SERT) la va a captar del espacio sináptico. Este transportador se va a encontrar en la membrana exterior serotoninérgica y en la membrana exterior de las plaquetas [Figura 4(3)] (aan het Rot *et al.*, 2009).

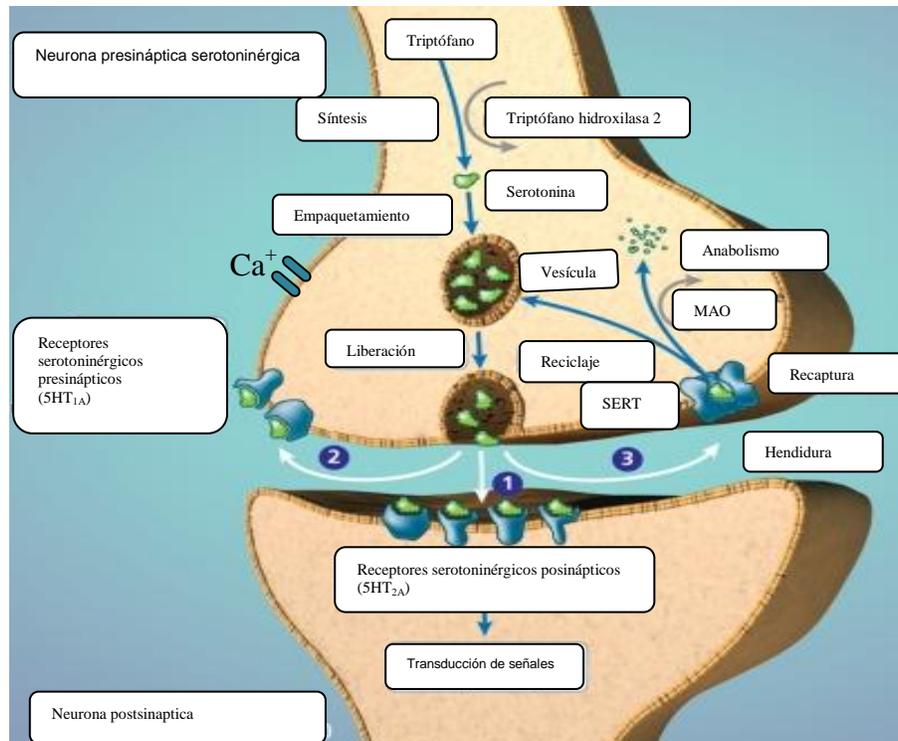


Figura 5. Sinapsis serotoninérgica (aan het Rot *et al.*, 2009).

La liberación de 5-HT en las células EC, se da 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 gastrointestinales. De igual manera como en la liberación de 5-HT en SNC, la 5-HT del tracto gastrointestinal es por exocitosis dependiente de Ca^{+} . La vida media de la 5-HT en el tracto gastrointestinal se estima entre 7-12 horas en perros, humanos y 11 horas en conejos. En términos fisiológicos la 5-HT puede ser liberada en el tracto gastrointestinal por ingestión de comida, estimulaciones adrenérgicas vagales o simpáticas, por una baja en el pH intraluminal, interacción con catecolaminas circulantes, distensiones mecánicas, isquemia y por obstrucción de la movilidad normal del tracto gastrointestinal (Gaginella 1995, aan het Rot *et al.*, 2009).

Serotonina en el asma

La 5-HT participa en diferentes funciones fisiológicas como la relajación, contracción del musculo liso bronquial y puede estar implicada en la fisiopatología del asma. Está involucrada en la vasoconstricción, broncoconstricción y motilidad intestinal en muchas especies de mamíferos (Moffatt *et al.*, 2004, Goolaerts *et al.*, 2010). En las vías aéreas puede ser liberada por las células neuroendocrinas pulmonares, células cebadas y los mastocitos. La acción de la serotonina esta mediada por siete subtipos de receptores que van del 5HT₁ al 5HT₇, a su vez se dividen en subcategorías de acuerdo a su función (Troppmann *et al.*, 2010).

La 5-HT desempeña un papel importante en la función pulmonar en humanos, aunque el papel de esta amina no ha sido completamente esclarecido, ha mostrado tener algunos efectos en la vía aérea, al activar diferentes subtipos de receptores como la 5-HT_{2A}

que provoca constricción y la 5-HT_{1A}, que al parecer está relacionado con un efecto relajante en el músculo liso (Cazzola y Matera, 2000, Zhang *et al.*, 2007). Por medio de la liberación de acetilcolina (ACh) puede causar broncoconstricción al activar receptores muscarínicos como el M₃, M₂ y por la activación de receptores 5-HT₁, 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT₇ incrementando la reactividad de la vía respiratoria en cobayos (Cazzola y Matera, 2000, Fu *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 2007). La acción de la 5-HT en las vías aéreas es compleja, *in vitro* e *in vivo* puede causar relajación o contracción de los bronquios o bronquiolos, dependiendo al subtipo de receptor que active (Zhang *et al.*, 2007).

Serotonina en el pulmón

Se cree que la 5-HT está involucrada en la fisiopatología del asma, causando en sujetos asmáticos un incremento en las concentraciones de 5-HT en el plasma, provocando broncoconstricción durante una exacerbación asmática, este incremento está relacionado con la gravedad del asma (Lechin *et al.*, 1996). En un estudio realizado en homogenados de pulmón se encontró que la 5-HT se halla nueve veces más en cobayos asmáticos en comparación con los controles, la 5-HT desempeña un papel importante en el asma y al parecer los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT₄, 5-HT₇ están implicados en la hiperreactividad de la vía aérea (Segura *et al.*, 2010).

La posible acción de la serotonina se debe a que cuando esta es liberada por las plaquetas, células enterocromafines pulmonares, células cebadas, activan diferentes vías de señalización, cuando se une a receptores 5-HT₃, 5-HT₇, activan a la acetilcolina (ACh) que es liberada por la terminal nerviosa colinérgica, esta acetilcolina se une a receptores muscarínicos (M₃, M₂) que van a generar contracción del músculo liso, por otra parte, la

activación receptores 5-HT₁, 5-HT_{2A}, provocan directamente en el musculo liso bronquial relajación o/y contracción (Figura 6) (Cazzola y Matera, 2000, Fu *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 2007).

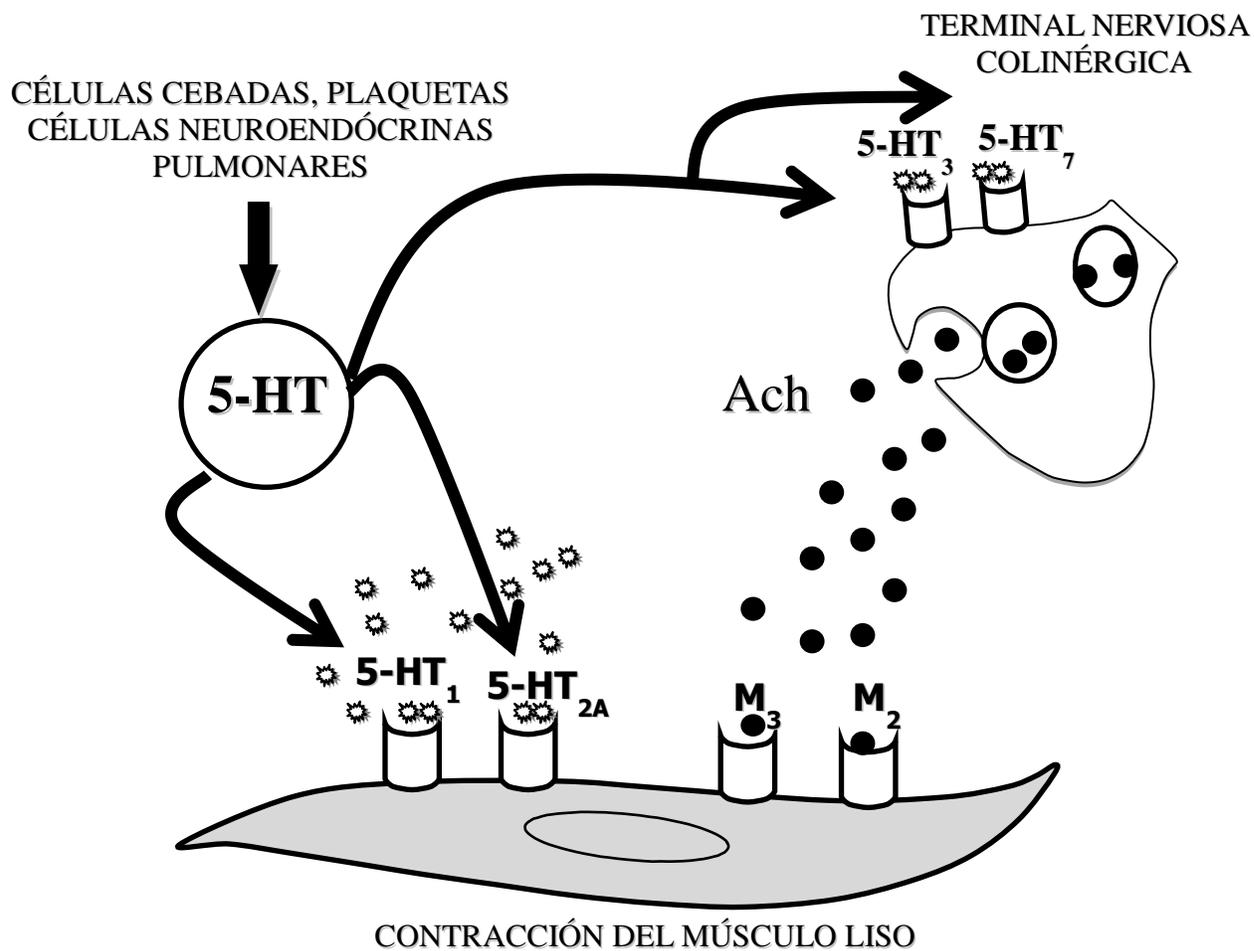


Figura 6. Acción de la serotonina en el músculo liso bronquial (modificado de Cazzola y Matera, 2000).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La importancia de la serotonina (5-HT) en el asma ha sido muy controvertida debido a que en pacientes asmáticos es capaz de producir broncoespasmo provocando una disminución aguda en el calibre bronquial y en personas sanas es incapaz de producir estos cambios agudos a nivel pulmonar. Hasta este momento, el papel de la 5-HT en el broncoespasmo y la HVA inducidas por el reto antigénico en animales sensibilizados no ha sido esclarecido, por lo que uno de los objetivos principales de esta investigación fue evaluar el papel de la 5-HT en el broncoespasmo inducido por el reto antigénico en cobayos sensibilizados.

HIPÓTESIS

Las concentraciones de 5-HT sanguínea se incrementarán de manera significativa, antes, durante y después del reto antigénico en cobayos, lo que predispone la presencia de broncoespasmo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar las concentraciones de serotonina sérica, plasmática, concentrado plaquetario en cobayos (*Cavia porcellus*) sensibilizados; antes, durante y después del reto antigénico.

Objetivos particulares

- Caracterizar un modelo de sensibilización a ovoalbúmina (AO) en cobayos.
- Inducir el broncoespasmo a grupos de cobayos mediante sensibilización intradérmica e intraperitoneal con ovoalbúmina.
- Obtener muestras sanguíneas del ventrículo derecho y ventrículo izquierdo de cobayos sensibilizados y no sensibilizados con OA.
- Cuantificar las concentraciones de serotonina sérica de plasmas ricos en plaquetas (PRP), plasma pobre en plaquetas (PPP) y concentrado plaquetario (CP), en los animales sensibilizados y no sensibilizados.
- Utilizar antagonistas de receptores serotoninérgicos como el tropisetron (antagonista de receptores 5-HT₃ y 5-HT₅), la metiotepina (antagonista de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT₂, 5-HT₅, 5-HT₆, 5-HT₇) para bloquear el broncoespasmo inducido por el reto antigénico y determinar la importancia de la 5-HT en este fenómeno.

Justificación del uso de animales y consideraciones éticas.

Los cobayos tienden a generar una mayor susceptibilidad en las vías aéreas a la exposición de varios antígenos o sensibilizantes por lo tanto son ampliamente utilizados como un modelo experimental en el asma alérgica.

Se evitó prolongar innecesariamente la permanencia de los animales en el bioterio. Los animales fueron manejados bajo anestesia para minimizar el dolor y cuando fue necesario fueron eutanasiados con una sobredosis de pentobarbital sódico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de estudio

Se utilizaron 5 grupos de cobayos machos (n=6), de la cepa Hartley con un peso aproximado de 350 a 400 g, de 8 a 10 semanas de edad. Los cobayos se mantuvieron en condiciones convencionales de bioterio: aire acondicionado filtrado, 21 ± 1 °C, con un 50-70 % de humedad, en cama estéril, con agua y alimento *ad libitum* (Teklad Global Guinea Pig Diety Harlan Teklan® Madison, WI, USA), ciclos de luz-oscuridad de 12-12 horas. De acuerdo a las normas establecidas por el Comité Bioético de nuestro Instituto y acorde con los lineamientos para el uso de animales de laboratorio (Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio, 1999).

Procedimiento de sensibilización para cada grupo

El primer día los cobayos fueron inyectados con 60 µg/kg de ovoalbúmina (OA) y 1 mg de hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) como adyuvante disueltos en 1 ml de solución salina fisiológica (SSF) que se aplicó por vía intraperitoneal (ip) y subcutánea por partes iguales. Ocho días después se les administró un refuerzo por vía inhalatoria con 3 mg/ml de OA disueltos en SSF durante 5 minutos. En el día 15 se realizó un segundo refuerzo por vía inhalada con 1 µg/ml de OA en SSF durante 10 segundos. Al día 21 a los animales se les realizó la pletismografía (Figura 7) (Segura *et al.*, 2010).

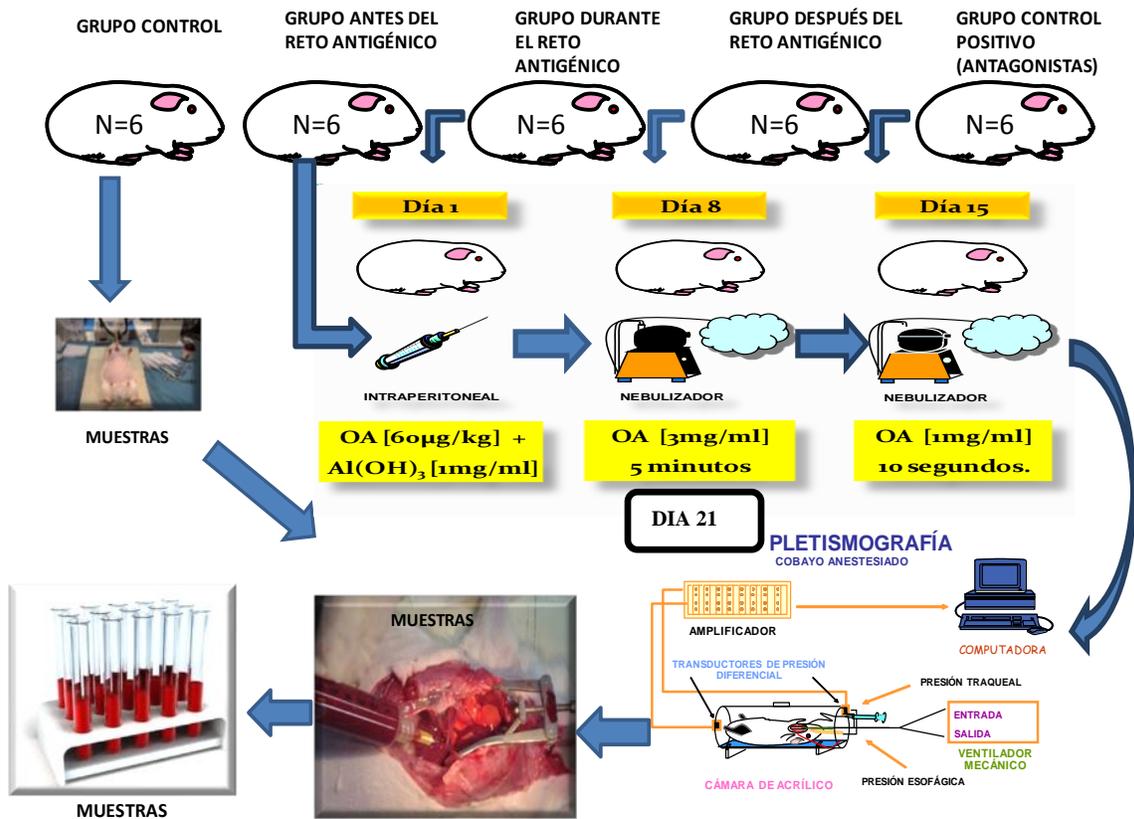


Figura 7. Método de sensibilización de los grupos: antes del reto antigénico, durante el reto antigénico, después del reto antigénico y control positivo (antagonistas), hasta la obtención de las muestras sanguíneas. Grupo control solo se le obtuvo muestra sanguínea. Grupo antes del reto antigénico se sensibilizó vía intraperitoneal e intradérmica, posteriormente se les dio un doble refuerzo nebulizado en los días 8 y 15, al día 21 se obtuvieron muestras sanguíneas. Los grupos: durante el reto antigénico y después del reto antigénico se les realizó el mismo procedimiento que al grupo anterior, a estos dos grupos se les dio un reto antigénico vía iv. Al grupo control positivo (antagonistas), se les realizó el mismo procedimiento de sensibilización que a los grupos anteriores administrando por vía iv metiotepina más tropisetron antagonistas de 5-HT para evitar el broncoespasmo por el reto antigénico, a este grupo no se le obtuvo muestra sanguínea.

Obtención de muestras sanguíneas

Para evaluar la concentración de 5-HT se estudiaron 4 grupos. El primer grupo estuvo formado por animales no sensibilizados y con peso corporal similar a los demás grupos (grupo control). Los siguientes tres grupos fueron animales estudiados al final del período de sensibilización antigénica: a) animales sin reto antigénico (*antes del reto antigénico*); b) durante el reto antigénico (*grupo durante el reto*) animales estudiados 10 minutos para observar la respuesta máxima de broncoespasmo inducida por el antígeno, c) animales después del reto antigénico (*grupo post-reto*) estudiados 1 hora después de que la R_L retornó a valores basales y d) animales estudiados durante el bloqueo del broncoespasmo por los antagonistas (metiotepina mas tropisetron) sin obtener muestra sanguínea, solo se evaluó (R_L) para obtener el grado máximo de broncoespasmo.

Las muestras de sangre se obtuvieron del ventrículo derecho y del ventrículo izquierdo (Figura 8), lo que nos permitió evaluar las concentraciones de 5-HT antes y después de su paso por el lecho vascular pulmonar, respectivamente. Las muestras se obtuvieron por punción cardiaca, una vez realizada la esternotomía media y exposición del corazón. Debido a que la 5-HT es fotosensible, las muestras fueron inmediatamente puestas en alícuotas en tubos de 1.5 ml color ámbar para protegerlas de la luz (modelo MCT-150-X, Axygen, Union City, CA, EUA). Cada tubo contenía anticoagulante ACD (ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa) así como pargilina (inhibidor de la monoaminoxidasa-B, concentración final 19 $\mu\text{g/ml}$).

Para desproteinizar las muestras se agregaron a los tubos una mezcla de ácido perclórico 0.1 M y metabisulfito de sodio 4 mM (relación 1:1). Posteriormente, los tubos se centrifugaron 3 minutos a 2500 rpm y 10 minutos a 10, 000 rpm para obtener plasma rico

en plaquetas (PRP). Para el plasma pobre en plaquetas (PPP) se obtuvieron centrifugando a 6,000 rpm por 15 minutos y a 10,000 rpm por 10 minutos. El concentrado plaquetario se resuspendió en 500 μ l de ácido perclórico y se sometió a sonicación (modelo 100, Fisher Scientific, Hanover Park, IL, EUA) y se centrifugaron 10 minutos a 10,000 rpm. Finalmente, todas las muestras así procesadas se filtraron utilizando membranas hidrofílicas de 45 μ m (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) y se congelaron a -80°C hasta su estudio.

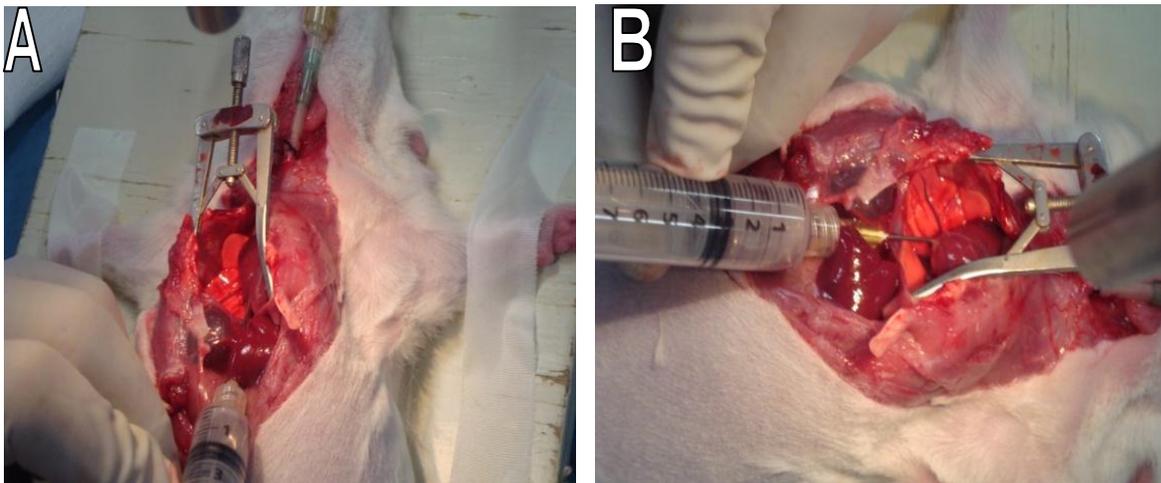


Figura 8. Obtención de muestras sanguíneas. En A punción cardiaca del ventrículo izquierdo y B punción cardiaca ventrículo derecho.

Descripción del estudio

Se empleó un modelo de broncoespasmo alérgico en cobayos sensibilizados a OA. El reto antigénico se llevó a cabo estando los cobayos en pletismógrafo para animales anestesiados y administrándoles 400 µg/kg de OA por vía intravenosa. Esta dosis suele generar rápidamente un broncoespasmo que alcanza su máximo en alrededor de 2 a 6 minutos, y que después se revierte en 15 a 30 minutos.

Pletismografía para animales anestesiados

El día de su estudio los cobayos fueron anestesiados con 35 mg/kg de pentobarbital sódico por vía intraperitoneal, y una vez que se canuló la vena yugular derecha la profundidad de la anestesia se mantuvo administrando dosis adicionales de pentobarbital por vía intravenosa (9 mg/kg aproximadamente cada hora). La tráquea se canuló y se conectó a un ventilador para pequeñas especies (modelo 50-1700, Harvard Apparatus, Bournemouth, Inglaterra). Los animales fueron ventilados a un volumen corriente de 10 ml/kg a 48 respiraciones/minutos. A cada animal se le administró 0.06 mg/kg de bromuro de pancuronio iv para suprimir los movimientos voluntarios. Adicionalmente se canuló el esófago para obtener la presión transpulmonar (Figura 7). La señal de presión traqueal se integró a través de un transductor de presión diferencial (SCXL004DN SenSym, CA, EUA) unido a las cánulas esofágica y traqueal. El animal se introdujo a la cámara del pletismógrafo para animales anestesiados (Buxco), la cual quedó herméticamente sellada. Para registrar la señal de flujo, se conectó a un extremo de la cámara un segundo transductor de presión diferencial (SCXL004DN SenSym, CA, EUA). 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) para calcular la resistencia pulmonar ($R_L=dp/df$).

Determinación de serotonina por Cromatografía de Líquidos de Alta precisión.

Las concentraciones de 5-HT se determinaron por detección fluorométrica de acuerdo al método de Peat y Gibb (1983). Se utilizó un equipo de HPLC (modelo 510, Waters, Milford, MA, EUA) con una válvula inyectora (Valco Instrument Co., Houston, TX, EUA) y un fluorómetro (modelo 474, Waters), con un flujo de 18 μ l/minuto. El rango de excitación para todos los experimentos fue de 290 nm y el de emisión de 330 nm. La señal de detección fue registrada a 10 mV de entrada. Se utilizó una columna Ultraesfera ODS de fase reversa de 5 μ m de tamaño de partícula de 150 x 3.9 mm (modelo Symmetry C18, WAT046980, Waters). No se usó pre-columna. La fase móvil fue preparada con fosfato de potasio anhidro 0.02 M, ácido heptanosulfónico 1 g/L, ajustando el pH a 3.3 utilizando ácido fosfórico, además de una dilución de metanol en agua destilada (3:2), representando esta última el 34 % de la fase. Se realizó una curva estándar de 5-HT diluida en ácido perclórico 0.1 M y metabisulfito de sodio 4 mM, las concentraciones de 5-HT fueron las siguientes: 0.005, .04, 0.2 y 2 ng/ μ l con la finalidad de evaluar las concentraciones de serotonina en las muestras.

Reactivos utilizados

Serotonina (Marca Sigma), Metanol (Marca Caledon), fosfato de potasio monobásico (Marca Sigma) metabisulfito de sodio (Marca Sigma), ácido fosfórico y ácido heptanosulfónico de sodio (Marca Sigma). Todos los reactivos empleados son grado HPLC. Columna Ultraesfera ODS de fase reversa de 5µm de tamaño de la partícula, de 150 x 4.6 mm (modelo W02I01S1S 045 3.9 x 150 ml columna simetric C18 5µm) marca Waters.

Análisis de datos

Después de corroborar la normalidad de los datos, éstos se expresaron como promedio \pm error estándar. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante análisis de varianza seguido de prueba de Tukey, y las asociaciones se evaluaron a través de regresión y correlación de Pearson. La significancia estadística se fijó a una $p < 0.05$ bimarginal.

RESULTADOS

En los cobayos que fueron sometidos al reto antigénico la R_L en condiciones basales (antes del reto) fue de 0.497 ± 0.031 cmH₂O/ml/s. Como era de esperar, la administración intravenosa de 400 µg/kg iv de OA produjo dentro de los siguientes 2 a 6 min un aumento máximo de la R_L de casi cuatro veces (389.5 ± 48.8 cmH₂O/ml/s) el valor basal antes del reto (Figura 9, 10, 11). La tendencia de este broncoespasmo fue a la disminución progresiva hasta regresar a valores basales alrededor de 15-30 min.

Con respecto a las concentraciones de 5-HT se observó alta dispersión de los valores, tanto los medidos en muestras de PRP como de PPP y concentrado plaquetario CP,

lo que se reflejó falta de significancia estadística entre los diferentes grupos. Sin embargo, mostraron algunas tendencias que vale la pena mencionar:

Concluido el proceso de sensibilización al día 21, la concentración de 5-HT fue mayor que la encontrada en el grupo control no sensibilizado, en especial en PRP y en PPP (Figura 9 y 10), tanto en el ventrículo izquierdo como el ventrículo derecho.

Durante el reto antigénico las concentraciones de 5-HT en la sangre tomada del ventrículo izquierdo (sangre que sale de los pulmones) fueron mayores que las del ventrículo derecho (sangre que entra a los pulmones). El ventrículo derecho indica la cantidad de serotonina que entra hacia el pulmón para generar broncoespasmo y esta a su vez muestra la cantidad de serotonina que es liberada por el pulmón hacia el ventrículo izquierdo durante el broncoespasmo, esto se ve reflejado en el PRP, PPP (Figura 9 y 10) lo cual fue especialmente notable en el CP mostrando una tendencia menor en el ventrículo derecho y mayor en el ventrículo izquierdo (Figura 11).

Por otra parte después del reto antigénico (una hora después) de que el cobayo regresa casi a sus condiciones basales normales, disminuyendo el broncoespasmo las cantidades de serotonina del ventrículo izquierdo como el derecho son mayores que las del grupo control (Figura 9 y 10), notablemente la cantidad de serotonina que entra al pulmón es mayor pero incapaz de generar broncoespasmo en el cobayo.

Antes del reto antigénico hay un incremento notable de serotonina en el ventrículo derecho e izquierdo pero estas condiciones no fueron suficientes para generar broncoespasmo alguno ya que no fueron retados vía iv con OA.

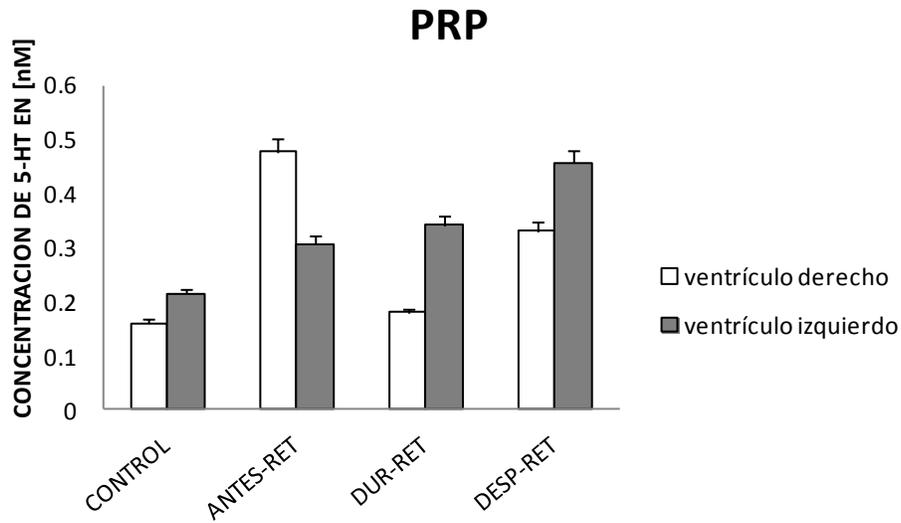


Figura 9. Comportamiento de las concentraciones de serotonina para generar broncoespasmo durante un reto antigénico en cobayos sensibilizados en plasma rico en plaquetas (PRP). Las concentraciones de 5-HT en plasma rico en plaquetas (PRP) en el ventrículo izquierdo fueron mayores al del grupo control, debido al broncoespasmo que es generado en el cobayo durante el reto antigénico, liberando así una mayor cantidad de 5-HT. Después del reto antigénico hubo un incremento de serotonina tanto la que entra al pulmón como la que sale, pero después de una hora no fue capaz de producir broncoespasmo alguno. Antes del reto antigénico las cantidades de serotonina notablemente son mayores, similares a la después del reto antigénico pero no fueron las condiciones necesarias para producir broncoespasmo.

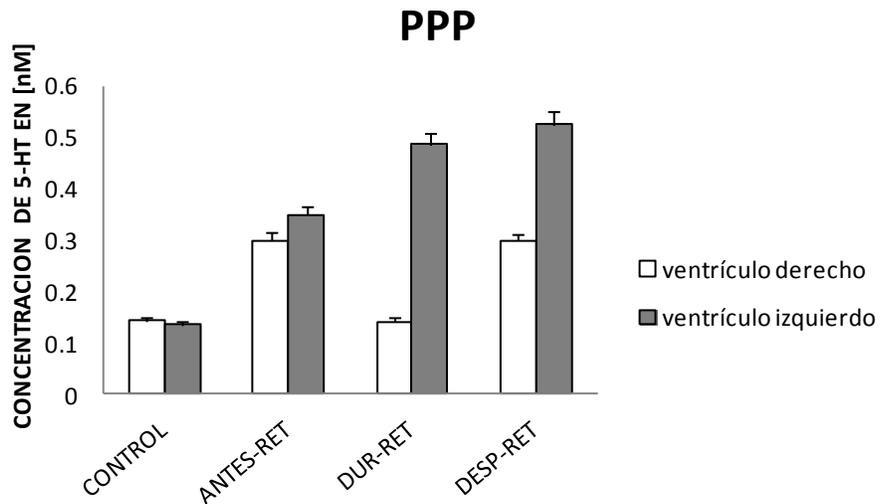


Figura 10. Comportamiento de las concentraciones de serotonina para generar broncoespasmo durante un reto antigénico en cobayos sensibilizados en plasma pobre en plaquetas (PPP). Las concentraciones de 5-HT en plasma pobre en plaquetas (PPP) en el ventrículo izquierdo durante el reto antigénico fueron mayores al del ventrículo derecho debido al broncoespasmo generado en el cobayo. Después del reto antigénico (una hora después) las concentraciones de 5-HT son mayores pero las condiciones no son suficientes para generar broncoespasmo. Grupo antes del reto antigénico no generan broncoespasmo aunque muestre cantidades elevadas de 5-HT, ya que este no se le dio reto antigénico vía iv.

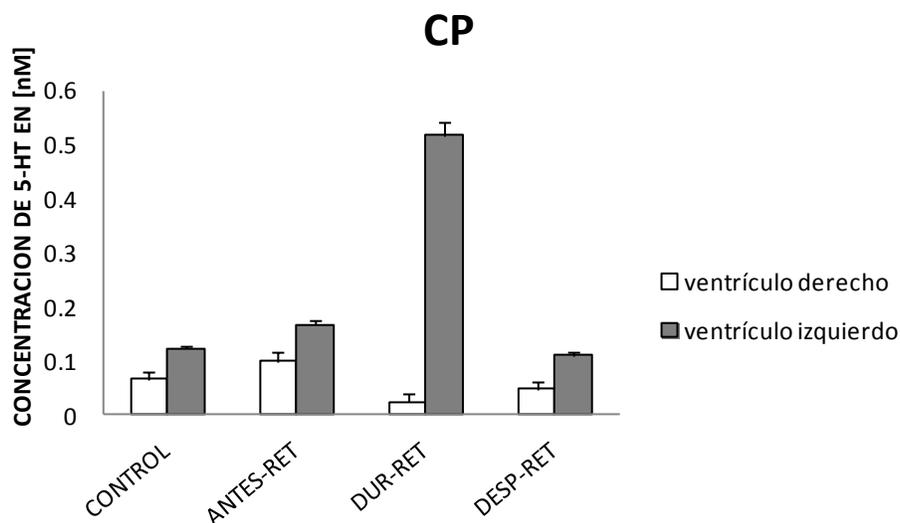


Figura 11. Comportamiento de las concentraciones de serotonina para generar broncoespasmo durante un reto antigénico en cobayos sensibilizados en concentrado plaquetario (CP). Las concentraciones de 5-HT en concentrado plaquetario (CP) en el ventrículo izquierdo durante el reto fue mayor al del ventrículo derecho debido al broncoespasmo generado en el cobayo, una hora después del reto antigénico, las concentraciones de 5-HT disminuyeron bastante en comparación con el de PRP, PPP sin generar broncoespasmo alguno. Grupo antes del reto antigénico muestran una disminución de 5-HT sin generar broncoespasmo en el cobayo.

La concentración de 5-HT cuantificada en sangre proveniente de los pulmones (ventrículo izquierdo) mostró alta correlación con el grado máximo de broncoespasmo, tanto en el PRP ($r=0.97$ $p=0.007$, $n=5$, Figura 12-A) como en el PPP ($r=0.97$, $p=0.006$, $n=5$, Figura 13- C) durante el reto antigénico, debido a que a mayor broncoespasmo, mayor es la R_L y por lo tanto mayor es la concentración de 5-HT liberada del pulmón hacia el ventrículo izquierdo.

Sugiriendo que la 5-HT total o libre tuvo alguna participación en la generación del broncoespasmo durante su paso por el ventrículo derecho hacia el pulmón incrementándose de manera significativa en el ventrículo izquierdo, esta asociación entre 5-HT y R_L durante

el reto antigénico no se observó en el CP ($r=-0.44$, $p=0.45$, Figura 14-E) pudiera ser que la plaqueta no haya almacenado 5-HT sino más bien lo haya liberado al plasma o estén involucradas otras células en el pulmón que evitan que la plaqueta recapture serotonina.

Sin embargo, una hora después de que cedió el broncoespasmo (después del reto antigénico) y que los valores de R_L retornaron a la basal, la 5-HT del CP fue la única que tuvo un aumento en la concentración, evidenciando que después de 1 hora la 5-HT plasmática disminuye incrementándose en el CP, indicando una correlación positiva con el grado de broncoespasmo máximo, pudiera ser que después de 1 hora la plaqueta haya recapturado serotonina disminuyendo las concentraciones en el plasma ($r=0.76$, $p=0.03$ Figura 14-F), sin que hubiera correlación entre este último con los niveles de 5-HT en PRP ($r=0.08$, $p=0.84$, Figura 12-B) y en PPP ($r=0.44$, $p=0.27$, Figura 13-D).

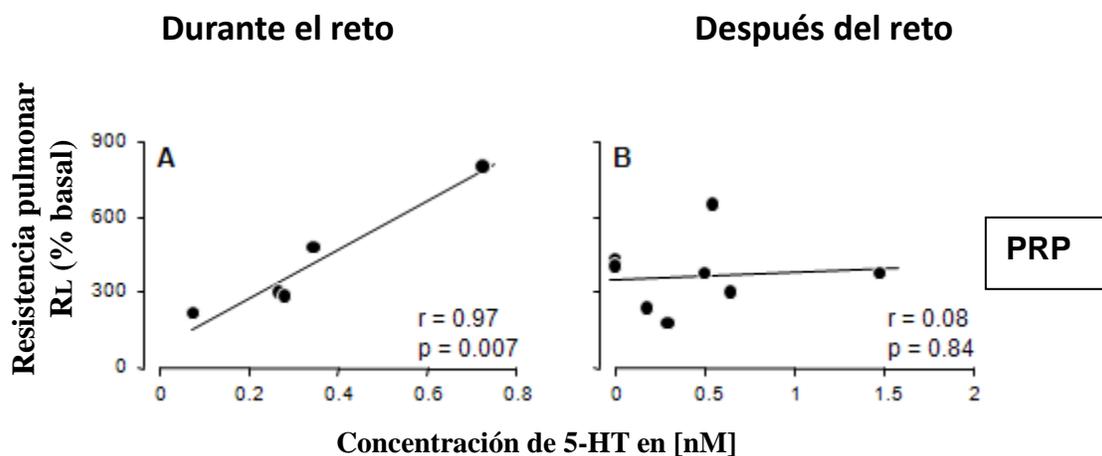


Figura 12. En A hay incremento en la R_L generando broncoespasmo agudo en el músculo lisos bronquial, provocando mayor liberación de 5-HT en PRP ($r=0.97$ $p=0.007$). En B la R_L se incrementa en el momento del reto antigénico, pero después de una hora no se observa incremento en la R_L ni en las concentraciones de 5-HT en PRP ($r=0.08$ $p=0.84$).

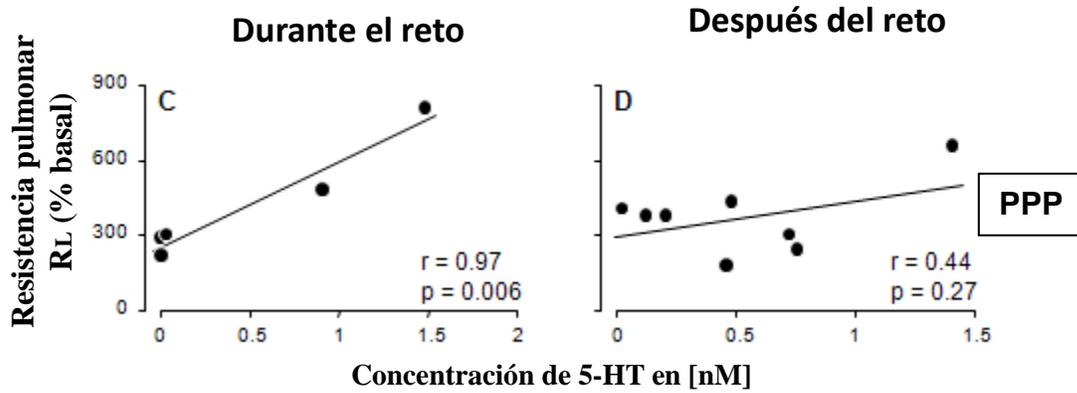


Figura 13. En C se observa incremento en la R_L generando broncoespasmo agudo en el músculo lisos bronquial, provocando mayor liberación de 5-HT en PPP ($r=0.97$ $p=0.006$), en D la R_L se incrementa en el momento del reto antigénico, después de una hora no se observa incremento en la concentración de 5-HT ni en la R_L en PPP ($r=0.44$ $p=0.27$).

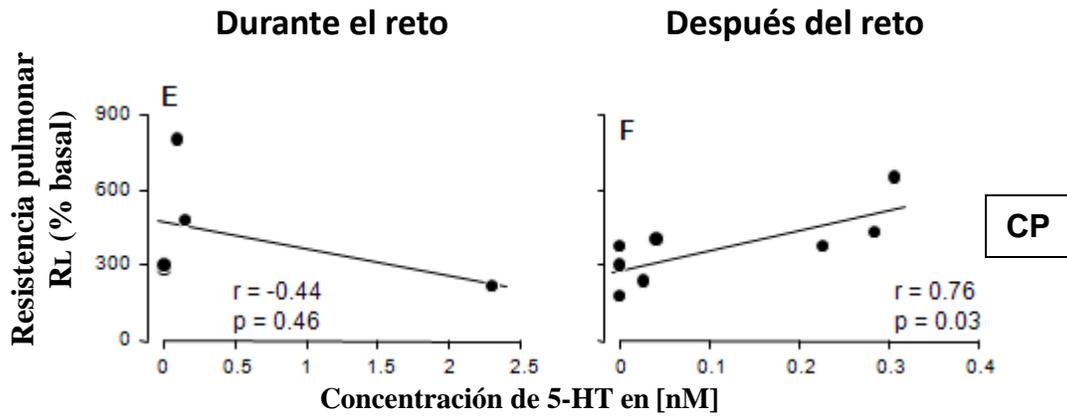


Figura 14. En C se observa incremento en la R_L generando broncoespasmo agudo en el músculo lisos bronquial, disminuyendo la concentración de 5-HT en el CP ($r=-0.44$ $p=0.46$), en F la R_L se incrementa en el momento del reto antigénico y después de una hora se observa incremento en la concentración de 5-HT pero no en la R_L en CP ($r=0.44$ $p=0.27$).

En los cobayos que fueron sometidos al reto antigénico la R_L fue de 482.4 ± 60 $\text{cmH}_2\text{O/ml/s}$, la administración intravenosa de $400 \mu\text{g/kg}$ iv de OA produjo dentro de los siguientes 2 a 6 min un aumento máximo de la R_L de casi cuatro veces su valor basal durante el reto (Figura 15). Como era de esperar la administración de metiotepina más tropisetron (antagonista de 5-HT) inhibieron por completo el broncoespasmo durante el reto antigénico, sin alterar los valores basales en su R_L de los cobayos 149.4 ± 10 $\text{cmH}_2\text{O/ml/s}$ (Figura 13).

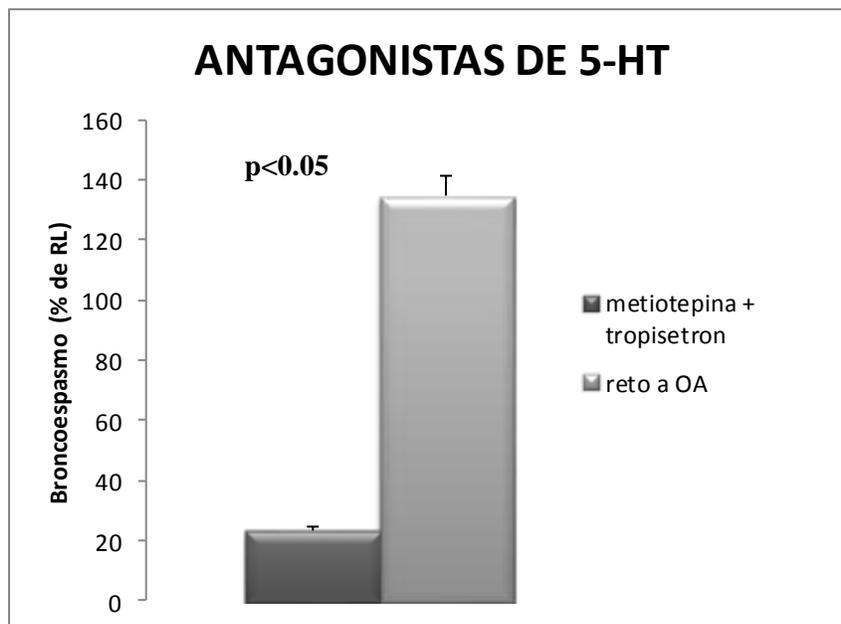


Figura 15. Tropisetron más metiotepina inhiben el grado de broncoespasmo durante el reto antigénico, disminuyendo considerablemente la respuesta a ovoalbúmina (OA).

DISCUSIÓN

En el presente estudio encontramos que la concentración de 5-HT medida pocos minutos después del broncoespasmo alérgico agudo mostro correlación con el aumento máximo de la R_L , esta asociación se observó solo con la 5-HT cuantificada en la sangre proveniente de los pulmones, mas no así en la sangre colectada antes de su paso por los pulmones, lo que sugiere que la 5-HT fue producida activamente en el tejido pulmonar.

En un estudio previo realizado por Mercado y Kilic (2010) y Segura y colaboradores (2010) encontraron que en el proceso de sensibilización se produce un incremento en la concentración de 5-HT en el parénquima pulmonar libre de sangre, y que una vez que el animal recibía un reto antigénico dicha concentración aumentaba drásticamente hasta nueve veces su concentración de 5-HT.

Puesto que en estos pulmones la sangre intravascular se había removido completamente, la fuente de 5-HT radicaba en el propio tejido pulmonar, probablemente correspondiendo a células neuroendócrinas o su agrupación en cuerpos neuroepiteliales, cuya capacidad de producción de 5-HT está bien demostrada (Cutz *et al.*, 2007).

Una fuente alternativa de 5-HT en el presente estudio podrían ser las plaquetas. En este sentido, Yoshida *et al.* (2002) encontraron en un modelo de broncoespasmo alérgico en ratón que casi inmediatamente del reto antigénico existe un secuestro de plaquetas en los capilares pulmonares y subsecuente liberación de 5-HT.

Otro de los datos interesantes derivado de nuestro estudio fue que la asociación entre concentración de 5-HT y broncoespasmo sólo se observó en las muestras que contenían 5-HT en el plasma (PRP y PPP) mas no con la 5-HT contenida en el las plaquetas (CP). Sin embargo, una hora después de que el broncoespasmo había cedido, el grado

máximo de obstrucción sólo correlacionó con la 5-HT plaquetaria. Se conoce bien que las plaquetas son las principales responsables de la recaptura extravascular de 5-HT (Mercado y Kilic, 2010), por lo que estos resultados podrían implicar que la 5-HT liberada por el reto antigénico estuvo siendo activamente recapturada por las plaquetas (Cazzola y Matera 2000). Con el fin de evaluar el papel de la 5-HT en el broncoespasmo inducido por reto antigénico, a un grupo de cobayos se les administró 300 µg/kg de metiotepina (antagonista de receptores 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₅, 5-HT₆ y 5-HT₇) (Gerhardt y van Heerikhuizen, 1997, Roberts *et al.*, 1997) y 3 mg/kg de tropisetron (antagonista de receptores 5-HT₃ y 5-HT₄) (Schiavi *et al.*, 1994, Villalón *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 1996), ambos por vía iv aproximadamente 10 min antes del reto con OA. La participación de estos dos antagonistas administrados vía iv evito por completo el broncoespasmo durante el reto antigénico sin alterar cambios en la R_L de los cobayos.

En los resultados obtenidos muestran que la 5-HT desempeña un papel importante en el broncoespasmo inducido por el reto antigénico en cobayos sensibilizados. Se observó que durante el reto antigénico se produjo un incremento en la resistencia pulmonar (R_L) desencadenando una crisis de broncoespasmo, provocando así una mayor liberación de 5-HT en el plasma proveniente del pulmón que sale directamente del ventrículo izquierdo. Sin embargo después del reto antigénico las concentraciones de 5-HT tanto de PRP y PPP no se observó incremento alguno. Por otra parte, el tropisetron y la metiotepina (antagonistas de 5-HT) inhibieron el broncoespasmo sin reflejar cambios en la R_L inducido por el reto antigénico a OA en cobayos sensibilizados.

La administración de OA vía intravenosa en animales sensibilizados durante el reto antigénico provoca un aumento en la R_L , provocando así broncoespasmo agudo y aumentando las concentraciones de 5-HT plasmática.

CONCLUSION

En nuestro modelo de sensibilización el reto antigénico, por vía intravenosa con OA fue eficaz para inducir broncoespasmo agudo en cobayos, generando un aumento las concentraciones de 5-HT plasmática durante dicho evento.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la 5-HT es activamente liberada durante el reto antigénico, y este autacoide está involucrado en la generación de la broncoobstrucción, lo cual fue corroborado al administrar por vía iv antagonistas a 5HT, como el tropisetron y metiotepina, que evitaron casi por completo el broncoespasmo, lo que sugiere que la 5-HT tiene un papel preponderante en la contracción del musculo liso de las vías aéreas inducido por el reto antigénico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- **aan het Rot, M., S. J. Mathew, y D. S. Charney. 2009.** Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. *CMAJ* **180**:305-313.
- **Bazán-Perkins, B., E. Sánchez-Guerrero, M. H. Vargas, E. Martínez-Cordero, P. Ramos-Ramírez, M. Alvarez-Santos, G. Hiriart, M. Gaxiola, y R. Hernández-Pando. 2009.** Beta1-integrins shedding in a guinea-pig model of chronic asthma with remodelled airways. *Clin Exp Allergy* **39**:740-751.
- **Brand, T., and G. M. Anderson. 2011.** The measurement of platelet-poor plasma serotonin: a systematic review of prior reports and recommendations for improved analysis. *Clin Chem* **57**:1376-1386.
- **Brenner, B., J. T. Harney, B. A. Ahmed, B. C. Jeffus, R. Unal, J. L. Mehta y F. Kilic. 2007.** Plasma serotonin levels and the platelet serotonin transporter. *J Neurochem* **102**:206-215.
- **Brutsche, M. H., S. H. Downs, C. Schindler, M. W. Gerbase, J. Schwartz, M. Frey, E. W. Russi, U. Ackermann-Liebrich, P. Leuenberger, and S. Team. 2006.** Bronchial hyperresponsiveness and the development of asthma and COPD in asymptomatic individuals: SAPALDIA cohort study. *Thorax* **61**:671-677.
- **Cazzola, I., and M. G. Matera. 2000.** 5-HT modifiers as a potential treatment of asthma. *Trends Pharmacol Sci* **21**:13-16.
- **Cutz, E., H. Yeger y J. Pan. 2007.** Pulmonary neuroendocrine cell system in pediatric lung disease-recent advances. *Pediatr Dev Pathol* **10**:419-435.
- **Davis, R. P., J. Pattison, J. M. Thompson, R. Tiniakov, K. E. Scrogin y S. W. Watts. 2012.** 5-hydroxytryptamine (5-HT) reduces total peripheral resistance during chronic infusion: direct arterial mesenteric relaxation is not involved. *BMC Pharmacol* **12**:4.
- **de Jong, W. H., M. H. Wilkens, E. G. de Vries y I. P. Kema. 2010.** Automated mass spectrometric analysis of urinary and plasma serotonin. *Anal Bioanal Chem* **396**:2609-2616.
- **Dones, F., G. Foresta y V. Russotto. 2012.** Update on perioperative management of the child with asthma. *Pediatr Rep* **4**:e19.
- **Echave, R. I. 2008.** Caracterización del transportador de serotonina humano en células CACO-2: estudio de los mecanismos de regulación fisiológica, Universidad de Zaragoza, Unidad de Fisiología.
- **Fu XW, Wang D, Pan J, Farragher SM, Wong V, Cutz E. 2001.** Neuroepithelial bodies in mammalian lung express functional serotonin type 3 receptor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **281**:L931-40.
- **Gaginella TS, Galligan JJ. 1995.** Serotonin and gastrointestinal function. 1^a edition. CRC Pres, Inc. Florida. 1-5, 21, 53, 85 pp.
- **Gerhardt, C. C y H. van Heerikhuizen. 1997.** Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. *Eur J Pharmacol* **334**:1-23.
- **Gilmour, M. I., M. S. Jaakkola, S. J. London, A. E. Nel y C. A. Rogers. 2006.** How exposure to environmental tobacco smoke, outdoor air pollutants, and increased pollen burdens influences the incidence of asthma. *Environ Health Perspect* **114**:627-633.

- **González Juárez, F., Suárez Nuñez., y José Francisco. (2008).** *Diagnóstico y tratamiento en neumología*. 1ª ed. 626 pp.
- **Goolaerts, A., J. Roux, M. T. Ganter, V. Shlyonsky, A. Chraibi, R. Stéphane, F. Mies, M. A. Matthay, R. Naeije, S. Sariban-Sohraby, M. Howard y J. F. Pittet. 2010.** Serotonin decreases alveolar epithelial fluid transport via a direct inhibition of the epithelial sodium channel. *Am J Respir Cell Mol Biol* **43**:99-108.
- **Hodges, M. R y G. B. Richerson. 2008.** Contributions of 5-HT neurons to respiratory control: neuromodulatory and trophic effects. *Respir Physiol Neurobiol* **164**:222-232.
- **Hon, K. L., W. S. Tang, T. F. Leung, K. L. Cheung y P. C. Ng. 2010.** Outcome of children with life-threatening asthma necessitating pediatric intensive care. *Ital J Pediatr* **36**:47.
- **Jeffery, P. K., and T. Haahtela. 2006.** Allergic rhinitis and asthma: inflammation in a one-airway condition. *BMC Pulm Med* **6 Suppl 1**:S5.
- **Lechin F, van der Dijs B, Orozco B, Lechin M, Lechin AE. 1996.** Increased levels of free serotonin in plasma of symptomatic asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol*; **77**:245–53.
- **Liu, M., K. Liu, N. Zhu, J. Xia y X. Chen. 2012.** Inflammatory mediators in induced sputum and airway hyperresponsiveness in cough variant asthma during long-term inhaled corticosteroid treatment. *Mediators Inflamm* **2012**:403868.
- **Manjarrez-Gutiérrez, G., N. Camacho-Calderón, R. Mercado-Camargo, A. Boyzo-Montes de Oca, A. Arvizu-Flores y J. Hernández-Rodríguez. 2009.** Characterization of serotonergic cells in fetal heart tissue. *Cir Cir* **77**:395-400.
- **Mercado, C. P y F. Kilic. 2010.** Molecular mechanisms of SERT in platelets: regulation of plasma serotonin levels. *Mol Interv* **10**:231-241.
- **Miyahara, N., K. Takeda, S. Miyahara, S. Matsubara, T. Koya, A. Joetham, E. Krishnan, A. Dakhama, B. Haribabu y E. W. Gelfand. 2005.** Requirement for leukotriene B4 receptor 1 in allergen-induced airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* **172**:161-167.
- **Moffatt, J. D., T. M. Cocks y C. P. Page. 2004.** Role of the epithelium and acetylcholine in mediating the contraction to 5-hydroxytryptamine in the mouse isolated trachea. *Br J Pharmacol* **141**:1159-1166.
- **Murphy, D. L., M. A. Fox, K. R. Timpano, P. R. Moya, R. Ren-Patterson, A. M. Andrews, A. Holmes, K. P. Lesch y J. R. Wendland. 2008.** How the serotonin story is being rewritten by new gene-based discoveries principally related to SLC6A4, the serotonin transporter gene, which functions to influence all cellular serotonin systems. *Neuropharmacology* **55**:932-960.
- **Oliver, M. N., B. Fabry, A. Marinkovic, S. M. Mijailovich, J. P. Butler y J. J. Fredberg. 2007.** Airway hyperresponsiveness, remodeling, and smooth muscle mass: right answer, wrong reason? *Am J Respir Cell Mol Biol* **37**:264-272.
- **Pai, V. P y A. M. Marshall. 2011.** Intraluminal volume homeostasis: A common serotonergic mechanism among diverse epithelia. *Commun Integr Biol* **4**:532-537.

- **Peat, M. A y J. W. Gibb. 1983.** High-performance liquid chromatographic determination of indoleamines, dopamine, and norepinephrine in rat brain with fluorometric detection. *Anal Biochem* **128**:275-280.
- **Perros, F., B. N. Lambrecht y H. Hammad. 2011.** TLR4 signalling in pulmonary stromal cells is critical for inflammation and immunity in the airways. *Respir Res* **12**:125.
- **Ricciardolo, F. L., F. Nijkamp, V. De Rose y G. Folkerts. 2008.** The guinea pig as an animal model for asthma. *Curr Drug Targets* **9**:452-465.
- **Roberts, C., G. W. Price y B. J. Jones. 1997.** The role of 5-HT(1B/1D) receptors in the modulation of 5-hydroxytryptamine levels in the frontal cortex of the conscious guinea pig. *Eur J Pharmacol* **326**:23-30.
- **Santana Rodríguez C., Castrillo Bustamante S y Moraleda Redecilla C. 2007.** Diagnóstico del asma infantil. *BOL PEDIATR* **47**:5.
- **Schiavi, G. B., S. Brunet, C. A. Rizzi y H. Ladinsky. 1994.** Identification of serotonin 5-HT₄ recognition sites in the porcine caudate nucleus by radioligand binding. *Neuropharmacology* **33**:543-549.
- **Segura, P., M. H. Vargas, G. Córdoba-Rodríguez, J. Chávez, J. L. Arreola, P. Campos-Bedolla, V. Ruiz, L. M. García-Hernández, C. Méndez y L. M. Montaña. 2010.** Role of 5-HT_{2A}, 5-HT₄ and 5-HT₇ receptors in the antigen-induced airway hyperresponsiveness in guinea-pigs. *Clin Exp Allergy* **40**:327-338.
- **Temelkovski J., H. S. Shepherd DP, Foster PS, Kumar RK. 2008.** An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen. *Thorax* **53**:8.
- **Troppmann, B., S. Balfanz, A. Baumann y W. Blenau. 2010.** Inverse agonist and neutral antagonist actions of synthetic compounds at an insect 5-HT₁ receptor. *Br J Pharmacol* **159**:1450-1462.
- **Vargas, M. H., B. Sommer, B. Bazán-Perkins y L. M. Montaña. 2010.** Airway responsiveness measured by barometric plethysmography in guinea pigs. *Vet Res Commun* **34**:589-596.
- **Villalón, C. M., D. Centurión, G. Bravo, P. De Vries, P. R. Saxena y M. I. Ortiz. 2000.** Further pharmacological analysis of the orphan 5-HT receptors mediating feline vasodepressor responses: close resemblance to the 5-HT₇ receptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **361**:665-671.
- **Wang, Y., A. G. Ramage y D. Jordan. 1996.** Mediation by 5-HT₃ receptors of an excitatory effect of 5-HT on dorsal vagal preganglionic neurones in anaesthetized rats: an ionophoretic study. *Br J Pharmacol* **118**:1697-1704.
- **Yoshida, A., M. Ohba, X. Wu, T. Sasano, M. Nakamura y Y. Endo. 2002.** Accumulation of platelets in the lung and liver and their degranulation following antigen-challenge in sensitized mice. *Br J Pharmacol* **137**:146-152.
- **Zhang, Y., L. O. Cardell y M. Adner. 2007.** IL-1 β induces murine airway 5-HT_{2A} receptor hyperresponsiveness via a non-transcriptional MAPK-dependent mechanism. *Respir Res* **8**:29.