



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“Influencia de la regulación de las hormonas sexuales en la  
contracción y relajación de la tráquea en un modelo de  
asma alérgica”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JORGE LUIS ISLAS

Directora de tesis: Dra. María Guadalupe Campos Lara

Asesora: Dra. Martha Asunción Sánchez Rodríguez



Noviembre 2013

Lugar en el que se desarrolló el trabajo experimental: **Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.** Av. Cuauhtémoc 330, Doctores, Ciudad de México, Distrito Federal

## INDICE

RESUMEN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	2
Definición de asma.....	2
Fisiología de la contracción de la musculatura lisa de las vías aéreas.....	2
La función inmunitaria en las vías respiratorias.....	3
Fisiopatología del asma.....	4
Epidemiología.....	8
Tratamiento farmacológico del asma.....	9
Broncodilatadores.....	9
Agonistas $\beta_2$ adrenérgicos.....	10
Anticolinérgicos.....	10
Xantinas.....	11
Antiinflamatorios.....	12
Asma y hormonas sexuales.....	13
Diferencias sexuales en la modulación de la respuesta inmune.....	14
El modelo de asma alérgica en rata.....	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17

OBJETIVOS.....	18
HIPÓTESIS.....	19
MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
Tipo de estudio.....	20
Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	20
Variables.....	20
Población de estudio.....	21
Gonadectomías.....	21
Sensibilización y reto con ovoalbúmina.....	21
Grupos experimentales.....	21
Obtención de tejido traqueal.....	22
Curva concentración respuesta a carbacol.....	23
Curva concentración respuesta a salbutamol.....	23
Análisis estadístico.....	24
RESULTADOS.....	25
DISCUSIÓN.....	31
CONCLUSIÓN.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35

## RESUMEN

El asma es una enfermedad de las vías aéreas de origen multifactorial; algunos de los factores que participan son contaminantes ambientales, exposición a alérgenos, cambios fisiológicos y anatómicos, etc. Se ha observado también que entre los factores que pueden afectar los episodios de asma están las hormonas esteroides sexuales, pues se ha observado una reversión de proporción entre hombres y mujeres asmáticos, es decir, en la infancia hay mayor proporción de niños asmáticos que niñas, mientras que en la adolescencia y adultez la proporción se invierte. Para determinar la forma en que influyen las hormonas sexuales en la contracción del músculo liso de la tráquea se llevó a cabo un estudio *in vitro* en ratas macho gonadectomizadas, sensibilizadas con ovoalbúmina y no sensibilizadas, en diferentes estadios hormonales. Se encontró que las hormonas sexuales con mayor influencia en este tejido son la testosterona y la progesterona en ratas sensibilizadas, mostrando la testosterona un efecto inductor de la relajación del músculo liso en ratas no sensibilizadas, mientras que en ratas sensibilizadas la relajación fue menor. Por su parte, la progesterona en ratas sensibilizadas indujo una menor contracción. Estos hallazgos sugieren que la testosterona puede ayudar a contrarrestar la broncoconstricción asmática, en tanto que la progesterona sería de apoyo para prevenir las exacerbaciones asmáticas. Estos resultados pueden ayudar a establecer un nuevo enfoque en la terapéutica de esta enfermedad que involucre a las hormonas sexuales para mejorar a los pacientes asmáticos, aunque futuras investigaciones son necesarias.

## **MARCO TEÓRICO**

### **DEFINICIÓN DE ASMA**

El asma es una enfermedad crónica de las vías respiratorias que se caracteriza por inflamación de dichas vías y una variabilidad exagerada de su calibre debido a una hiperrespuesta del músculo liso bronquial. Tiene diversos síntomas, entre ellos la disnea y la sibilancia, así como la producción de moco y tos, sobre todo por la noche. El componente obstructivo del asma se caracteriza por una broncoconstricción mientras que el componente inflamatorio está marcado por edema de las vías respiratorias, aumento en número de las células caliciformes (hiperplasia), secreción mucosa y filtración y liberación de citocinas por parte de las células inmunitarias e inflamatorias. Aunque la obstrucción de las vías respiratorias es generalmente reversible, el asma puede producir, tras un tiempo una remodelación de las vías respiratorias y un deterioro permanente de la función pulmonar (1).

### **FISIOLOGÍA DE LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS**

El sistema nervioso autónomo es el encargado de regular las respuestas involuntarias de la musculatura lisa. En las vías respiratorias, el tono simpático (adrenérgico) provoca broncodilatación y el tono parasimpático (colinérgico) broncoconstricción. El tono de la musculatura lisa también se regula mediante fibras no adrenérgicas no colinérgicas (NANC) que inervan el árbol respiratorio.

Las células de la musculatura lisa de la vías aéreas (MLVA) tienen receptores adrenérgicos  $\beta_2$  (y en menor medida, receptores adrenérgicos  $\beta_1$ ) que responden a las catecolaminas circulantes. Los receptores adrenérgicos  $\beta_2$  son activados por la adrenalina que provoca broncodilatación.

Así mismo las células de la MLVA tienen receptores muscarínicos, sobre todo el subtipo excitatorio de receptor muscarínico  $M_3$ . Las neuronas posganglionares parasimpáticas liberan acetilcolina que estimula estos receptores muscarínicos y provoca broncoconstricción.

Las fibras NANC no liberan adrenalina ni acetilcolina, pero sí neuropeptidos: la neurocinina A, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, la sustancia P, la bradisinina, la taquicinina y el neuropeptido Y son broncoconstrictores liberados por las fibras NANC, mientras que el óxido nítrico (NO) y el polipéptido intestinal vasoactivo se liberan para provocar broncodilatación (1).

## **LA FUNCIÓN INMUNITARIA EN LAS VÍAS RESPIRATORIAS**

Los linfocitos T desempeñan un papel fundamental en el control de la respuesta inmunitaria. Los linfocitos  $T_C$   $CD8^+$  (citotóxicas) son los mediadores de la inmunidad adaptativa celular y los linfocitos  $T_H$   $CD4^+$  (cooperadores) regulan las respuestas inmunitarias adaptativas. Las células  $T_H$  se subclasifican en células  $T_{H1}$  y  $T_{H2}$  basándose en las citocinas que producen. Las células  $T_{H1}$  que producen sobre todo interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleucina 2 (IL-2) y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), favorecen una respuesta inmunitaria celular que implica a los

linfocitos T. Por otra parte, las células T<sub>H2</sub> producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 y favorecen una respuesta inmunitaria humoral que implica la producción de anticuerpos por parte de las células B. Dado que las citocinas producidas por la activación de las células T<sub>H1</sub> y T<sub>H2</sub> se inhiben mutuamente, cualquier estímulo inmunitario desencadena de manera predominante una u otra respuesta como se muestra en la figura 1.

## **FISIOPATOLOGÍA DEL ASMA**

La tendencia de las vías respiratorias asmáticas a estrecharse en respuesta a una gran variedad de estímulos como alérgenos, irritantes ambientales, ejercicio, aire frío e infecciones, se denomina *hiperrespuesta*. Dos características de la hiperrespuesta de las vías respiratorias diferencian la respuesta asmática a los estímulos de la respuesta no asmática: *la hipersensibilidad y la hiperreactividad*. La hipersensibilidad produce una respuesta normal con estímulos anormalmente bajos. La hiperreactividad consiste en una respuesta exagerada ante estímulos normales; es decir las vías respiratorias responden con demasiado vigor (3) (Figura 2).

El rasgo distintivo del asma ha sido siempre la obstrucción reversible (con agonistas  $\beta_2$  adrenérgicos) de las vías aéreas; sin embargo, el asma es también un proceso inflamatorio que comprende edema de la mucosa, producción de moco

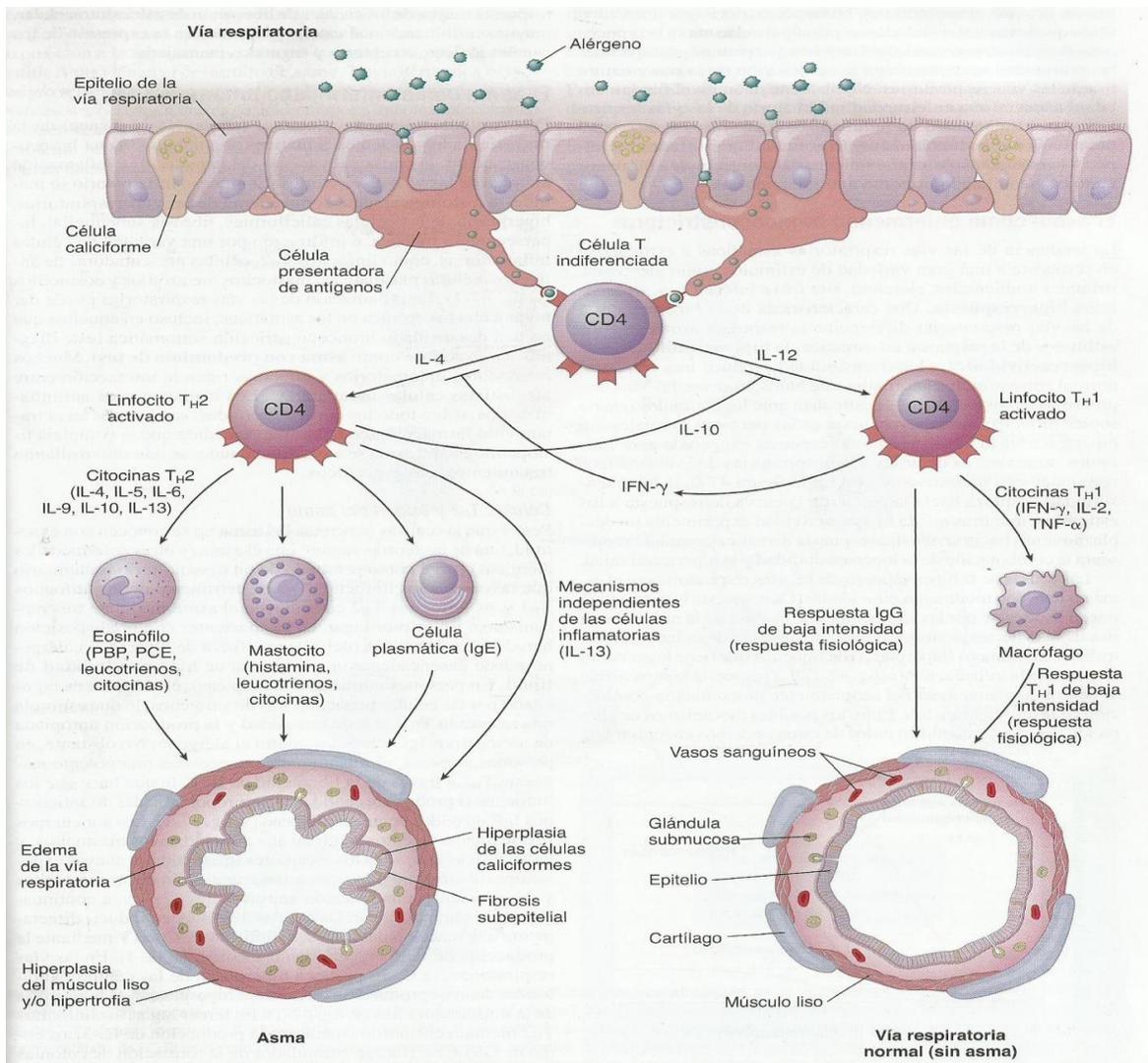


Figura 1. Orígenes de la respuesta inmunitaria asmática. En personas no atópicas, los antígenos derivados de los alérgenos son presentados por células dendríticas presentadoras de antígeno con el fin de generar una respuesta fisiológica  $T_H1$  de baja intensidad. En personas asmáticas la respuesta se da por  $T_H2$ , el cual a su vez recluta células como son eosinófilos, mastocitos y células B productoras de IgE, como resultado hay una hipersensibilidad e hiperreactividad de las vías aéreas. Tomado de: Galanter, 2012.

y aumento de la permeabilidad vascular. Este proceso inflamatorio incluye dos fases:

- **Fase inmediata:** Se presenta de 15 a 30 minutos después de la exposición al estímulo. Los mastocitos y los basófilos superficiales son las células

fundamentales en esta fase, que es el resultado de la interacción de un alérgeno específico con anticuerpos IgE unidos a los receptores de superficie de estas células, lo que produce su activación y la posterior liberación de mediadores. Algunos de estos mediadores son la histamina, diversas enzimas y factores quimiotácticos, prostaglandinas  $D_2$  ( $PGD_2$ ), leucotrienos ( $LTC_4$ ,  $LTD_4$ ,  $LTE_4$ ) y factor activador de plaquetas.

- **Fase tardía:** Esta fase aparece 4-10 horas después de la exposición al alérgeno y ocasiona el empeoramiento de los síntomas. Los factores quimiotácticos liberados en la fase inmediata son responsables de reclutar neutrófilos, basófilos y eosinófilos al sitio de inflamación, donde se instalan y comienzan a liberar mediadores específicos.(3)

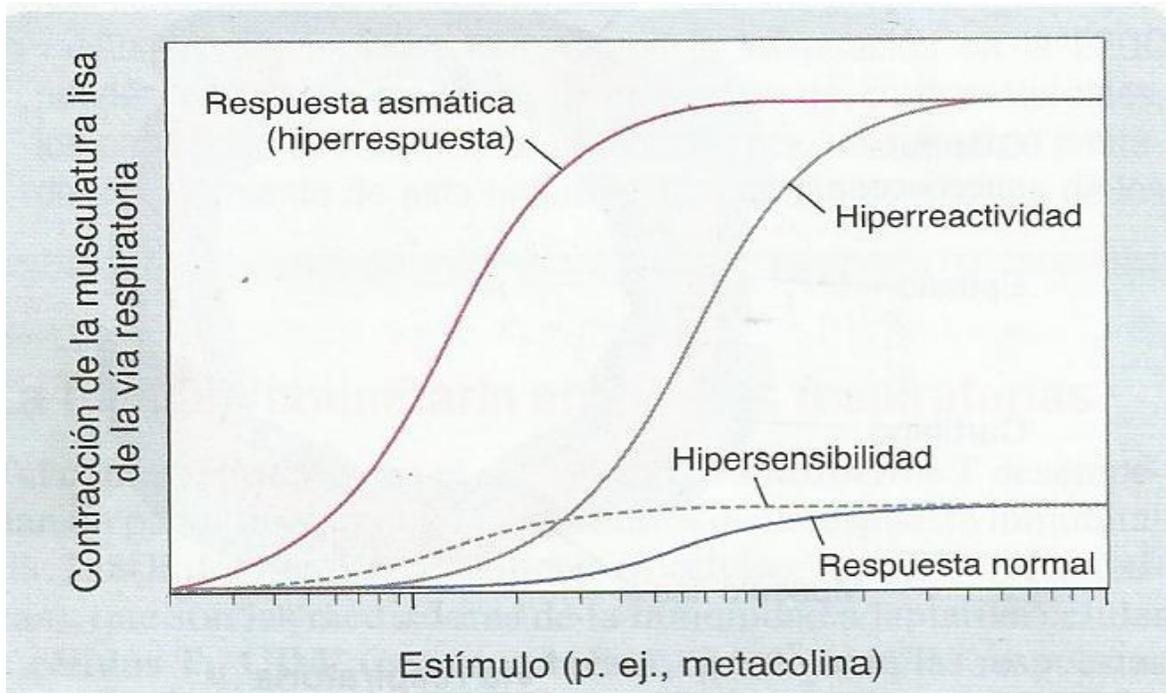


Figura 2. Hiperrespuesta de las vías respiratorias en el asma. La hipersensibilidad desplaza hacia la izquierda la curva de respuesta a los estímulos, mientras que la hiperreactividad experimenta un desplazamiento hacia arriba. La respuesta asmática completa representa la combinación de la hipersensibilidad y la hiperreactividad. Tomado de: Smith, 1993

Pese a que las causas concretas del asma no se conocen con exactitud, una de las teorías sugiere que el asma surge como resultado de un desequilibrio inmunitario que favorece a los linfocitos  $T_H2$  desfavoreciendo la respuesta de los linfocitos  $T_H1$ .

La IgE (producida por la activación de células  $T_H2$  y posterior producción de IL-4) circula brevemente en el torrente sanguíneo antes de unirse a los receptores IgE de alta afinidad (FcεRI) en los mastocitos. En una reexposición, el alérgeno se une a la IgE unida al mastocito y entrecruza los receptores FcεRI, activando así al mastocito. El mastocito activado se desgranula, liberando los mediadores preformados de la inflamación (Figura 3). De forma inmediata, la desgranulación de los mastocitos, al igual que en los eosinófilos, produce **broncoconstricción e inflamación de las vías respiratorias**.

Los mastocitos también liberan proteasas y proteoglicanos que actúan sobre las estructuras de sostén de las vías respiratorias y producen cambios crónicos en éstas (lo que también se denomina **remodelación tisular** de las vías respiratorias). Estos cambios se caracterizan por hiperplasia e hipertrofia de las células de las vías aéreas. La remodelación de las vías respiratorias inducida por la inflamación crónica puede provocar un deterioro irreversible de la función pulmonar (3).

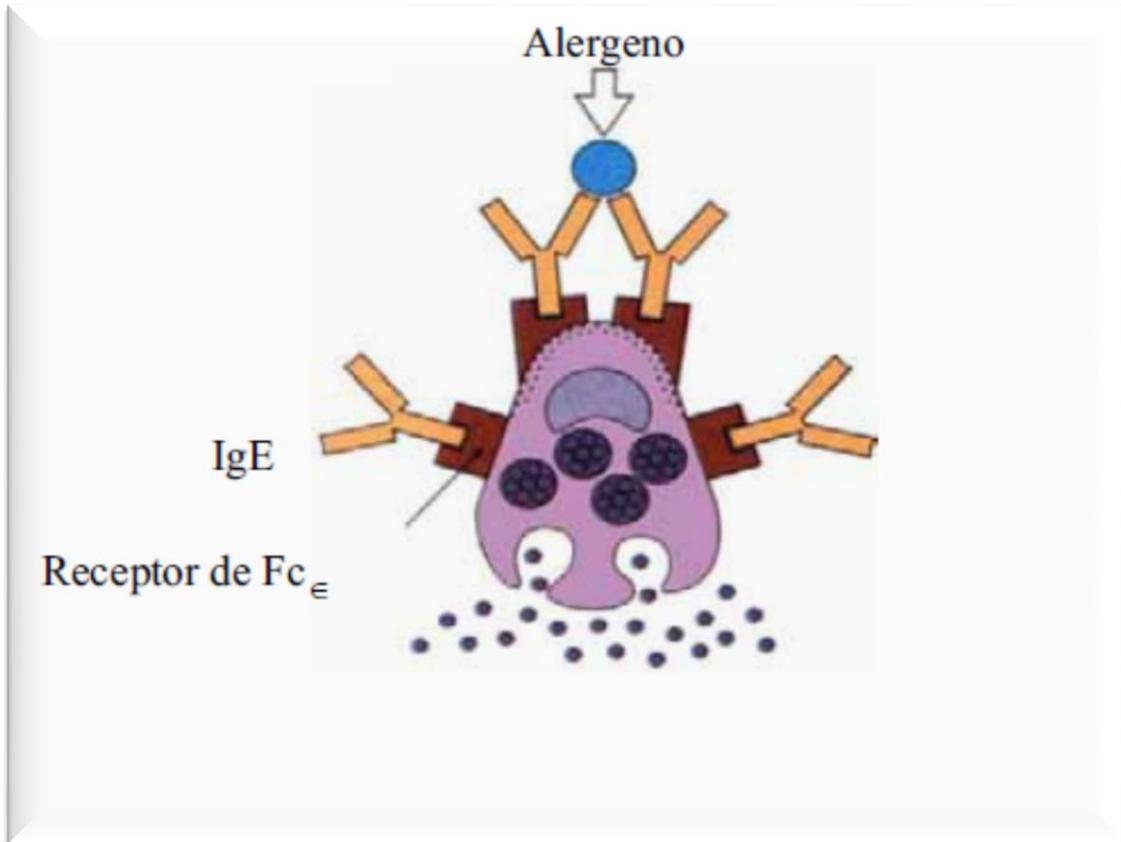


Figura 3. Desgranulación de los mastocitos y liberación mediadores. Tomado de: Galanter, 2012.

## EPIDEMIOLOGÍA

El número de personas con asma en Estados Unidos incrementó 2.9% en cada año en el periodo de tiempo de 2001 a 2010; a partir de 20.3 millones de personas en 2001 paso a 25.7 millones en 2010. La diferencia en prevalencia entre hombres y mujeres varía con el grupo de edad. Los niños varones tenían más alta prevalencia que las niñas (11.1% comparado con 7.8%) mientras que entre los adultos, los hombres tenían más baja prevalencia que las mujeres (5.7% comparado con 9.7%) (4).

En México el asma constituye la decimotercera causa de morbilidad para 2008. El análisis por grupo de edad, de acuerdo con los casos notificados por la secretaría de salud muestra que la tasa más alta la tiene el grupo de edad de 0-4 años (732.6 casos por 100 000 habitantes), seguida por el grupo de 5 a 9 años (540.8 casos por 100 000 habitantes). La prevalencia de asma en población adulta residente en la Ciudad de México y área metropolitana es de 5%, significativamente menor en hombres que en mujeres (5). La prevalencia de asma aguda en México se reporta entre 36.6 y 56.5 por mil pacientes pediátricos atendidos(6-7).

## **TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DEL ASMA**

Los fármacos empleados para tratar el asma pueden dividirse en dos amplias categorías: controladores (también llamados preventivos) y de rescate (también llamados sintomáticos). Por lo general los broncodilatadores se utilizan como tratamiento de rescate y los medicamentos antiinflamatorios se emplean como controladores, otros medicamentos como las xantinas comparten ambos efectos(8).

### **BRONCODILATADORES**

Los broncodilatadores afectan al tono del músculo liso de las vías respiratorias al actuar sobre los receptores del sistema nervioso y como vías de señalización. Los fármacos que se emplean como broncodilatadores comprenden los agonistas de los receptores adrenérgicos  $\beta$ , xantinas, antagonistas de los receptores de cistenil leucotrienos y antimuscarínicos (9).

## AGONISTAS $\beta_2$ ADRENÉRGICOS

Los  $\beta_2$  agonistas son los broncodilatadores más eficaces en el tratamiento del asma ya que al relajar el músculo liso actúan como antagonistas funcionales de las vías aéreas, cualquiera que sea el estímulo de constricción.

La ocupación de los receptores adrenérgicos  $\beta_2$  ( $AR_{\beta_2}$ ), por los agonistas, da como resultado la activación de adenilato ciclasa vía Proteína G estimulante (Gs) (fig. 4). Esto aumenta la cantidad de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) intracelular, lo que conduce a la proteína cinasa A (PKA) que fosforila varias proteínas diana dentro de la célula, conduciendo a la fosfatasa de cadena ligera de miosina y la inhibición de cinasa de cadena ligera de miosina y por lo tanto la relajación del músculo liso bronquial. Además los agonistas  $\beta_2$  abren canales de potasio de gran conductancia activados por calcio ( $BK_{Ca}$ ), los cuales causan la repolarización de las células de músculo liso, de modo que el  $Ca^{2+}$  permanece secuestrado en almacenes intracelulares. Los  $AR_{\beta_2}$  están también directamente acoplados a  $BK_{Ca}$  vía Gs, por lo que la relajación del músculo liso bronquial, puede ocurrir independientemente de un aumento de AMPc (10).

## ANTICOLINÉRGICOS

Los anticolinérgicos son antagonistas de los receptores muscarínicos, y su acción solo en dosis terapéuticas es para bloquear los efectos de la acetilcolina (ACh) endógena. La Atropina, el Ipratropio y el Tiotropio actúan en los receptores muscarínicos de manera competitiva principalmente sobre los receptores  $M_3$ . El receptor  $M_3$  esta acoplado a proteína Gq, el cual si es activado, en conjunto con la

fosfolipasa C, resulta en hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato y la generación de inositol 1,4,5-trifosfato, lo cual libera  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, resultando así, en contracción del músculo liso de las vías respiratorias y secreción de moco.(10)

## XANTINAS

La metilxantina más empleada desde hace mucho tiempo es la teofilina. Sin embargo la frecuencia de los efectos secundarios y su eficacia relativamente baja de teofilina han conducido al uso reducido de este medicamento.

El mecanismo de acción de la teofilina es todavía incierto. Se ha propuesto que el efecto broncodilatador visto a concentraciones plasmáticas altas (10-20 mg/L) es debido a la inhibición de las fosfodiesterasas (PDE) en el músculo liso bronquial, particularmente  $\text{PDE}_3$  lo que resulta en el aumento de las concentraciones de AMPc (11) (Figura 4).

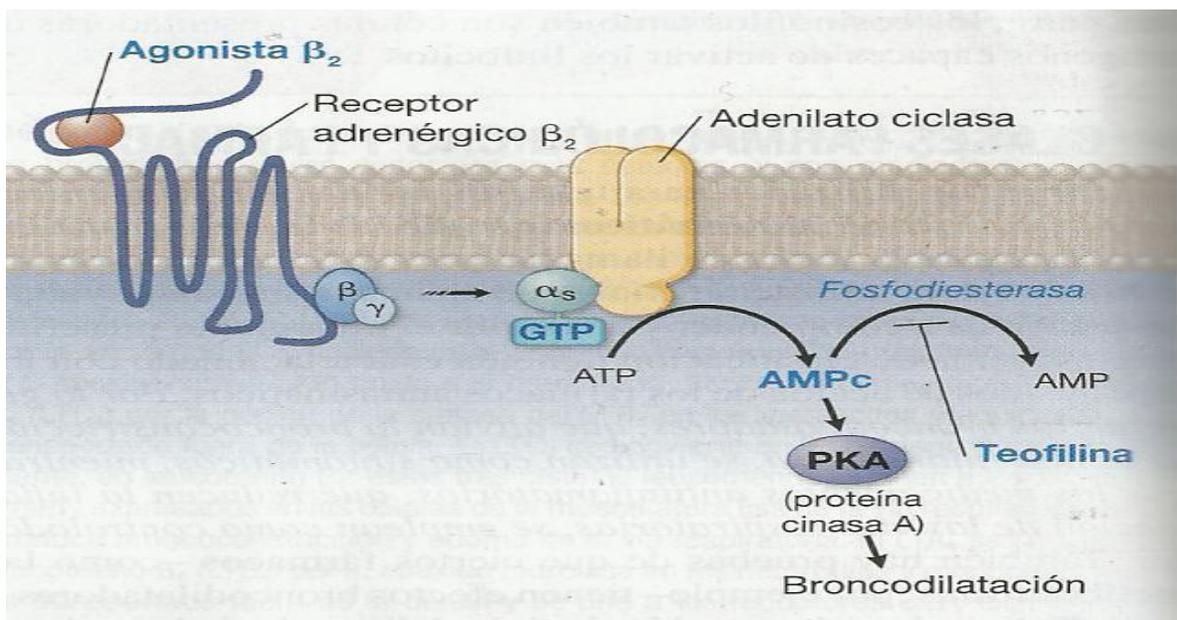


Figura 4. Mecanismos de los agonistas  $\beta_2$  y de la teofilina. Tomado de: Rang, 2004.

## ANTIINFLAMATORIOS

Los principales fármacos utilizados por su acción antiinflamatoria en el asma son los glucocorticoides. Cromoglicato y nedocromina también ejercen cierta acción antiinflamatoria (12-13).

Los corticoesteroides (o glucocorticoides) inhalados son el tratamiento preventivo principal de la mayoría de los pacientes con asma. Los corticoesteroides alteran la transcripción de muchos genes (Figura 5). En general aumentan la transcripción de los genes que codifican el receptor adrenérgico  $\beta_2$  y una serie de proteínas antiinflamatorias como IL-10, IL-12, y el antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1R $\alpha$ ). Los corticoesteroides disminuyen la transcripción de genes que codifican muchas proteínas proinflamatorias (y de otro tipo), como IL-4, IL-5, IL-13, IL-15, TNF- $\alpha$ , moléculas de adhesión endotelial, quimiocinas,

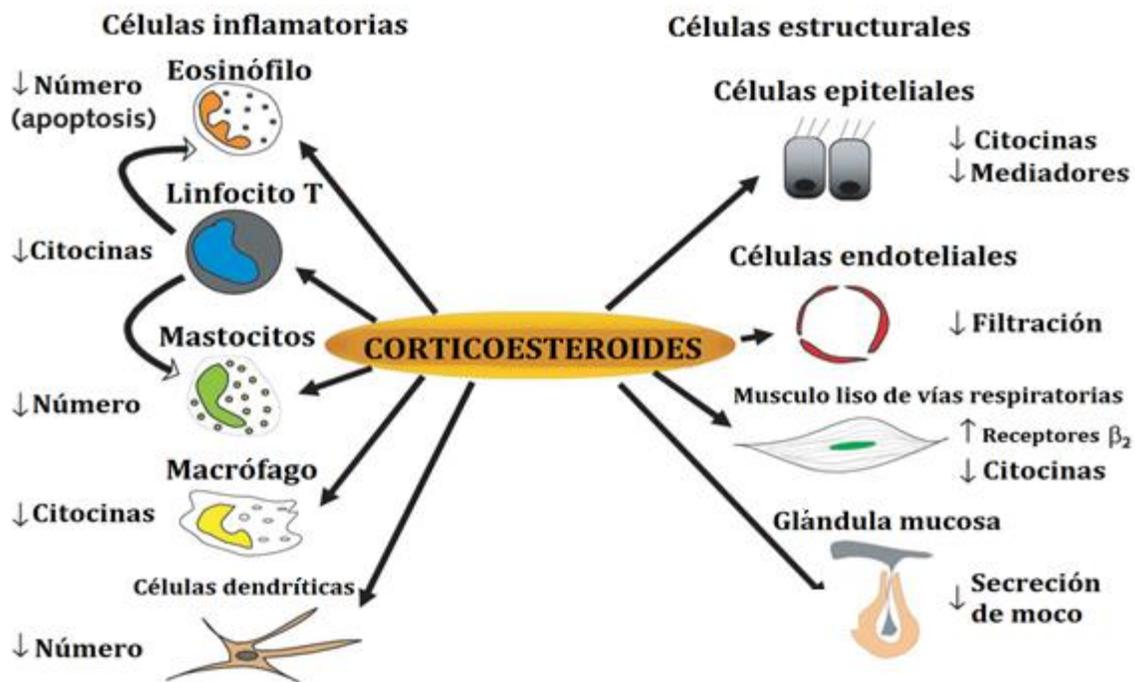


Figura 5. Efectos celulares de los corticoesteroides. Tomado de: Barnes, 2003.

ciclooxigenasa (COX), fosfolipasa A<sub>2</sub>, endotelina 1, entre otros. La inhibición principalmente de IL-4 e IL-5 reduce de forma importante la respuesta inflamatoria en el asma (14).

## **ASMA Y HORMONAS SEXUALES**

Las hormonas sexuales participan activamente en diversos procesos pulmonares dando lugar a diferencias de género. Por ejemplo, en neonatos prematuros se ha observado que las mujeres presentan un mayor desarrollo pulmonar que los varones. Otros ejemplos de regulación de las hormonas sexuales en procesos pulmonares son el caso de la fibrosis pulmonar donde la prevalencia es mayor en hombres que en mujeres, y la hiperreactividad pulmonar que está favorecida por el estradiol (15).

La relación entre el asma y las hormonas sexuales es muy clara desde la infancia ya que, cuando se presenta el aumento de testosterona durante la adolescencia, se invierte la prevalencia que hasta entonces era 70% varones y 30% mujeres (16).

En las mujeres la prevalencia de asma está relacionada con los niveles de estrógenos y progesterona. Durante la etapa reproductiva, los ataques asmáticos aumentan durante la fase lútea del ciclo menstrual, es decir, cuando existen altas concentraciones de estrógenos y progesterona. (17) En el embarazo, las mujeres que presentan un cuadro clínico leve antes del mismo mejoran su condición; mientras que las que presentan un cuadro clínico grave pueden aumentar su gravedad. En la posmenopausia, cuando los niveles de estrógenos y progesterona

son mínimos, algunas pacientes presentan una mejoría mientras que otras, que no habían presentado la enfermedad, comienzan a presentarla (18).

Hay escasos reportes de cómo afectan las hormonas sexuales el funcionamiento de las vías aéreas. Se sabe que la progesterona induce hiperventilación en humanos y ratas (19) e inhibe la contracción de la MLVA (20). Respecto a la presencia de receptores a hormonas sexuales en las vías aéreas se ha reportado un mayor contenido de las isoformas A y B del receptor a progesterona, así como del receptor beta a estrógenos en homogeneizado de pulmón de ratas hembras que de ratas macho (21). La expresión del ARNm del receptor a progesterona se incrementa por el tratamiento con estrógenos y disminuye por el tratamiento con progesterona en homogeneizados de pulmón de conejas hembras ovariectomizadas; asimismo, el ARNm del receptor a progesterona se incrementa durante el primer día de embarazo (22).

Se ha encontrado la presencia de los receptores a estrógenos ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y a progesterona (A y B) en músculo liso de las vías aéreas de ratas ovariectomizadas y tratadas con 17-beta estradiol o vehículo revelando los receptores con anticuerpos policlonales (23).

Algunos estudios enfocados en el comportamiento del musculo liso de vías aéreas han señalado que las hormonas sexuales influyen en la contracción y relajación del mismo. Se menciona que los andrógenos pudieran tener un efecto protector sobre la respuesta alérgica en vías aéreas, ya que se ha observado que en ratones macho hay menor severidad en la hiperrespuesta comparado con hembras, dicha diferencia desaparece después de la castración. Además de que

las ratas ovariectomizadas desarrollan menor inflamación en vías aéreas comparadas con ratas no ovariectomizadas, y el reemplazamiento de estrógenos desaparece esta diferencia. En tanto que la progesterona intensifica la alergia de vías aéreas en ratones. (24)

## **DIFERENCIAS SEXUALES EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE**

Se sabe que las hormonas sexuales juegan un papel importante en la regulación de la inmunidad, de manera que los niveles fisiológicos de estrógenos durante el ciclo estral/menstrual estimulan la respuesta inmune, mientras que niveles de estrógenos más altos como los que se presentan en el embarazo disminuyen la respuesta inmune celular. Los receptores a estrógenos se encuentran tanto en los órganos reproductivos, como en algunas células inmunes incluyendo células T, monocitos y macrófagos. La regulación de la actividad de células inmunes dependientes de estrógenos incluye cambios en la producción de citocinas además de la activación y proliferación de las células inmunes (25).

La testosterona y los estrógenos pueden regular positiva o negativamente la respuesta celular inmune. La diferencia en la producción de anticuerpos dependientes del sexo aparece después de la madurez sexual, sin embargo esta diferencia es reducida en gran medida después de la gonadectomía (26), por lo que las investigaciones que relacionan las hormonas sexuales con la inmunidad se realizan en animales gonadectomizados.

## **EL MODELO DE ASMA ALERGICA EN RATA**

Los modelos animales de asma más accesibles son generalmente ratas o cobayos, la exposición de estos animales a ovoalbúmina más un adyuvante (hidróxido de aluminio) induce alergia, en estos animales estimula la producción de inmunoglobulina E (IgE) e infiltración de células inflamatorias a las vías aéreas obteniendo así un modelo de asma alérgica (27). Los modelos en rata tienen características comparables al asma en humanos como son la broncoconstricción, infiltración eosinofílica y la hiperreactividad de las vías aéreas (28).

Entre las sustancias más usadas para estudiar la actividad contráctil de las vías aéreas está el carbacol o acetilcolina, histamina y serotonina. El carbacol es empleado en estos estudios por su estructura similar a la acetilcolina pero resistente a la hidrólisis por colinesterasa que actúa sobre receptores colinérgicos. En contraste, el salbutamol relaja las vías aéreas por su unión a los receptores beta-2 adrenérgicos, y constituye el clásico broncodilatador usado en el tratamiento del asma (29).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Existen claras evidencias de que las diferencias de género afectan la incidencia, susceptibilidad y severidad de varias enfermedades pulmonares. Estudios tanto en animales como en humanos indican que las hormonas sexuales participan de alguna manera en la fisiopatogénesis del asma. Pese a las evidencias clínicas que indican una relación entre las hormonas sexuales y el asma, sigue sin conocerse cómo éstas modifican la respuesta asmática pues la información obtenida hasta ahora no es concluyente. Recientemente se demostró la existencia de receptores a estrógenos y progesterona en el músculo liso de las vías aéreas. Sin embargo, aún no hay estudios que hayan abordado el análisis del mecanismo de regulación del asma por las hormonas sexuales. Por esta razón en el presente estudio se hace un abordaje del problema desde el punto de vista de la interacción de las hormonas sexuales sobre la actividad de contracción-relajación del músculo liso de las vías aéreas. Se analizará el efecto del tratamiento exógeno con hormonas sexuales sobre la contracción inducida por carbacol y la relajación inducida por salbutamol en los anillos de tráquea aislados de ratas macho gonadectomizadas no-sensibilizadas y sensibilizadas a ovoalbúmina como modelo experimental de asma alérgica

## **OBJETIVOS**

### **General**

Determinar el efecto de las hormonas sexuales sobre la contracción-relajación del músculo liso de tráquea aislado de ratas macho castradas o castradas y sensibilizadas a ovoalbúmina

### **Particulares**

- Determinar el efecto de estradiol, progesterona y testosterona sobre la contracción inducida por carbacol en músculo liso de tráquea de ratas macho castradas y no sensibilizadas
- Determinar el efecto de estradiol, progesterona y testosterona sobre la contracción inducida por carbacol en músculo liso de tráquea de ratas macho castradas y sensibilizadas a ovoalbúmina
- Determinar el efecto de estradiol, progesterona y testosterona sobre la relajación inducida por salbutamol en músculo liso de tráquea de ratas macho castradas y no sensibilizadas
- Determinar el efecto de estradiol, progesterona y testosterona sobre la relajación inducida por salbutamol en músculo liso de tráquea de ratas macho castradas y sensibilizadas a ovoalbúmina

## **HIPÓTESIS**

Las hormonas sexuales modulan la reactividad del músculo liso de la tráquea de manera diferente en animales sensibilizados con ovoalbúmina que en animales no sensibilizados.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### **Tipo de estudio:**

Experimental, prospectivo, longitudinal, comparativo

### **Criterios de inclusión exclusión y eliminación**

Criterios de inclusión: Ratas adultas, machos (210-230 g) de la cepa Sprague Dawley

Criterios de exclusión: Ratas que sufran daño o muerte después de la gonadectomía

Criterios de eliminación: Tejidos que no se contraigan con la solución Ringer–Krebs despolarizante

### **Variables independientes**

- Tratamiento hormonal
- Sensibilización con ovoalbúmina

### **Variables dependientes**

- Respuesta de contracción a carbacol  $\geq 1\%$  sobre la tensión basal
- Respuesta de relajación a salbutamol  $\geq 1\%$  sobre el plateau de contracción inducida por carbacol

### **Población de estudio.**

Se utilizaron 45 ratas adultas, machos (250-300 g) de la cepa Sprague Dawley con libre acceso a alimento y agua, con ciclos de 12h luz/obscuridad.

### **Gonadectomías**

*Castración bilateral*, se realizó por incisión media a través del escroto, bajo anestesia con xilacina (20 mg/Kg, i.m.) y ketamina (45 mg/Kg, i.m.) con un tiempo de recuperación de dos semanas.

### **Sensibilización y reto con ovoalbúmina**

El día 1 se inyectaron los animales con 20 mg de ovoalbúmina (OVA) y 100mg de Al(OH)<sub>3</sub> por vía intraperitoneal; a los 8 días se realizó un reto antigénico con 20 mg/mL de OVA por 20 minutos con un nebulizador; De igual manera se procedió los días 13 a 15. En estos grupos los tratamientos hormonales se dieron en los días 16, 17 y 18y los animales se sacrificaron el día 19, lo que se ha visto que induce la presencia de anticuerpos IgE (30). Los animales no sensibilizados recibieron manipulaciones similares con solución salina, en tiempos equivalentes.

### **Grupos experimentales.**

Los animales se asignaron al azar en alguno de los tratamientos hormonales resumidos en el siguiente cuadro:

<b>Machos (n=4 por cada grupo)</b>	
<b>No Sensibilizadas</b>	<b>Sensibilizadas</b>
Castrado + vehículo	Castrado + vehículo
Castrado + estradiol (50 µg/kg) 2 días	Castrado + estradiol (50 µg/kg) 2 días
Castrado + progesterona (4 mg/kg) 1 día	Castrado + progesterona (4 mg/kg) 1 día
Castrado + estradiol/progesterona 2 + 1 días	Castrado + estradiol/progesterona 2 + 1 días
Castrado + Testosterona (1.5 mg/kg) 3 días	Castrado + Testosterona (1.5 mg/kg) 3 días

Vehículo: aceite de maíz

Las hormonas se disolvieron en etanol + aceite de maíz, dejando evaporar totalmente el alcohol y se administraron por vía subcutánea. La selección de las dosis de estrógenos y progesterona usadas son similares a las halladas en el suero de ratas hembra en la fase proestro del ciclo estral de la rata (21). La dosis de testosterona se basa en los estudios de Leranthe et al. (22).

### **Obtención del tejido traqueal**

Las ratas (sensibilizadas y no sensibilizadas) se anestesiaron con pentobarbital sódico (95 mg/Kg) vía i.p. Se disecó la tráquea cuidando de no exponerla a la sangre y se limpió de tejido conectivo. Se obtuvieron preparaciones cilíndricas de cuatro anillos cartilaginosos cada una que se colocaron en baños para órganos aislados con 5 mL de Ringer Krebs-Bicarbonato (RKB) con la siguiente composición (mM): NaCl 120, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25,

CaCl<sub>2</sub> 2.5 y glucosa 11. Los tejidos se mantuvieron a 37°C con burbujeo continuo con 5% CO<sub>2</sub>-95% O<sub>2</sub>, pH=7.4.

La tensión isométrica se registró con un polígrafo Grass vía un transductor de tensión FTO3C (Grass Instruments). Los tejidos se estabilizaron a 1g de tensión durante 60 minutos, cada 15 minutos se lavaron con solución RKB fresca. Al final del período de estabilización los tejidos se estimularon con una solución de potasio 60 mM preparada a partir de RKB por sustitución equimolar de KCl por NaCl, así se valoraron la viabilidad del tejido y la reproducibilidad de la respuesta tisular y se seleccionaron para el estudio los tejidos que tuvieron dos respuestas consecutivas similares.

### **Curvas concentración-respuesta a carbacol**

A continuación se agregaron al baño de incubación concentraciones acumulativas de carbacol ( $1 \times 10^{-8}$  a  $1 \times 10^{-5}$ M) cada 10 minutos se agregó una nueva dosis. Cada anillo de tráquea se utilizó para una sola curva concentración-respuesta (29). Todos los experimentos se realizaron en presencia de indometacina ( $1 \times 10^{-6}$  M), que inhibe a la enzima ciclooxigenasa, que impide que la respuesta se vea alterada por la presencia de prostaglandinas (31-32).

### **Curvas concentración-respuesta a salbutamol**

A otra serie de tejidos se les añadió carbacol ( $1 \times 10^{-7}$  M concentración submáxima) para producir una contracción sostenida, sobre ésta se agregaron concentraciones acumulativas de salbutamol ( $1 \times 10^{-9}$  M a  $3.2 \times 10^{-5}$  M); cada 10

minutos se agregó una nueva dosis (27). Esta curva también se realizó en presencia de indometacina  $1 \times 10^{-6} \text{M}$ .

### **Análisis estadístico**

Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  error estándar de la media de 3 a 6 determinaciones. La respuesta inducida por KCl 60 mM se consideró la respuesta máxima estándar; las respuestas inducidas por carbacol y salbutamol se expresaron como porcentaje de la misma. La respuesta máxima ( $R_{\text{max}}$ ) y el logaritmo negativo de la concentración efectiva 50 ( $\text{CE}_{50}$ ) se calcularon por regresión lineal en base a las curvas concentración-respuesta individuales mediante el programa Sigma Plot versión 7. Los resultados se analizaron por análisis de varianza de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak. Una  $P < 0.05$  se consideró significativa.

## RESULTADOS

### *Curvas concentración respuesta a carbacol*

Al determinar la respuesta a carbacol en el músculo liso de tráquea de ratas sensibilizadas y no sensibilizadas y llevar a cabo el análisis estadístico se encontró solo diferencias estadísticamente significativas en la  $CE_{50}$  de los grupos de ratas sensibilizadas tratadas con progesterona comparándola con otros grupos incluyendo el control (cuadro 1).

Cuadro 1. Respuesta inducida por carbacol en músculo liso de tráquea de ratas no sensibilizadas que recibieron diferentes tratamientos hormonales.

TRATAMIENTO	$CE_{50}$ [ $\times 10^{-07}$ M]	Rmax (%KCl 60mM)
No Sensibilizadas		
• Vehículo	3.54± 0.55	205.94 ± 0.19
• 17 $\beta$ -Estradiol	2.48± 0.67*	195.83 ± 0.18
• Progesterona	3.31± 0.64	201.48 ± 0.19
• 17 $\beta$ -Estradiol + Progesterona	3.16± 0.33	177.80 ± 0.07
• Testosterona	3.46± 0.56	214.61 ± 0.30
Sensibilizadas		
• Vehículo	1.49± 0.38*	170.72 ± 0.06
• 17 $\beta$ -Estradiol	2.28± 0.90*	206.60 ± 0.16
• Progesterona	5.85± 0.95	180.68 ± 0.10
• 17 $\beta$ -Estradiol + Progesterona	3.21± 0.33	182.79 ± 0.08
• Testosterona	1.83 ± 0.18*	162.36 ± 0.04

Los valores presentados son la media  $\pm$  el error estándar ( $n=4-6$ ). \* ANOVA con prueba de Holm-Sidak como post hoc  $P<0.05$  con respecto al grupo de sensibilizadas + progesterona.

En la figura 6 se muestra el efecto de carbacol sobre el músculo liso de la tráquea de ratas no sensibilizadas:

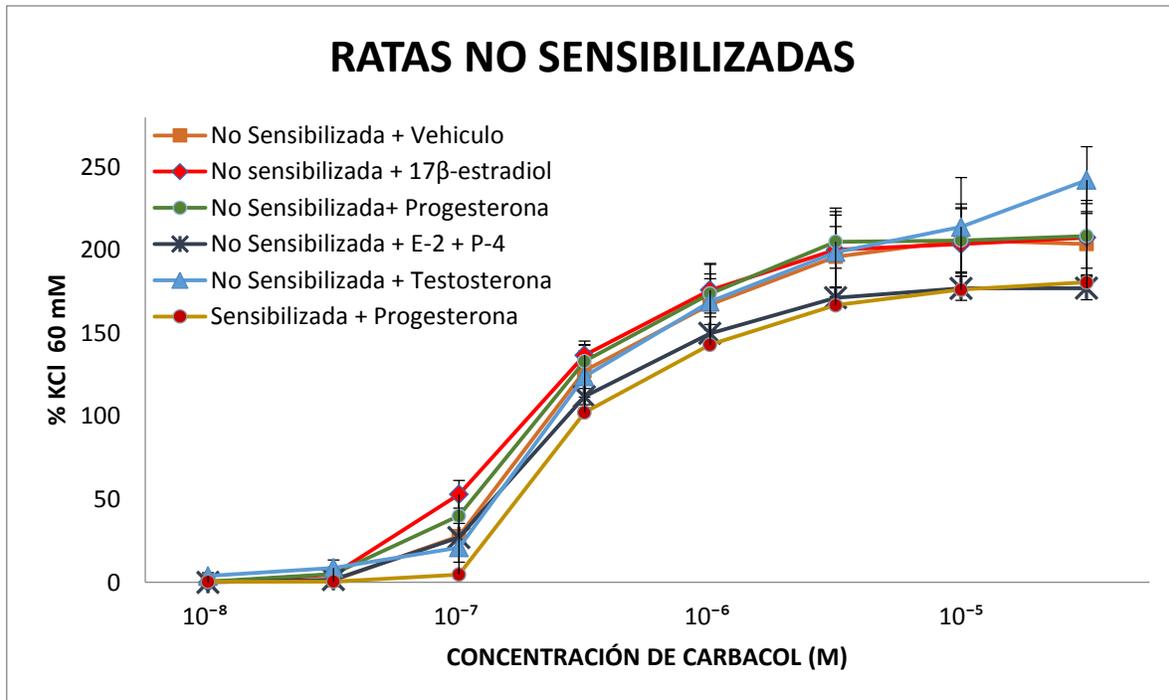


Figura 6. Curva concentración respuesta a carbacol en músculo liso de tráquea de ratas no sensibilizadas y con diferentes tratamientos hormonales. Los resultados son expresados como porcentaje de respuesta de KCl 60mM y son la media  $\pm$  error estándar (líneas verticales) de 4 a 6 observaciones

Como se puede observar, el comportamiento gráfico de las ratas sensibilizadas tratadas con progesterona es semejante al de las ratas no sensibilizadas tratadas con estradiol + progesterona (E-2 + P-4), la diferencia del porque una es significativa y la otra no, es porque en los primeros tres puntos de la curva de progesterona mostró una contracción mínima o nula a comparación de los grupos restantes de sensibilizadas y no sensibilizadas los cuales a la tercera concentración de carbacol ( $10^{-7}M$ ) ya mostraban una respuesta evidente. El comportamiento gráfico de las tráqueas de ratas sensibilizadas se puede observar en la figura 7.

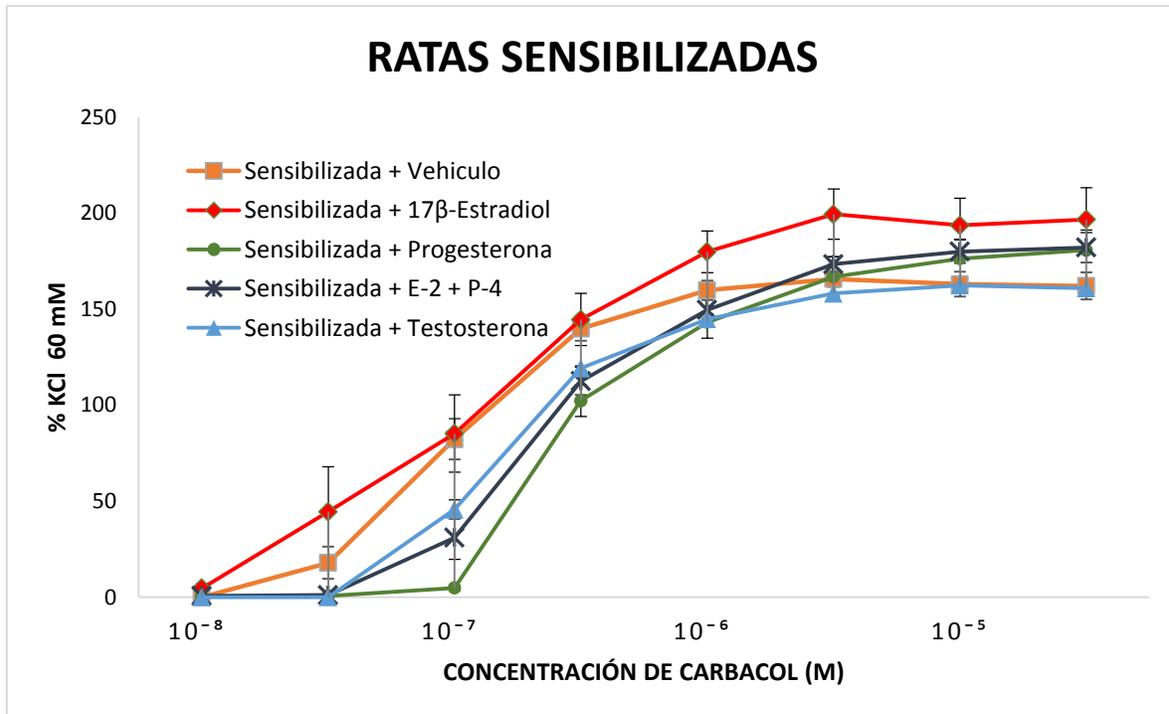


Figura 7. Curva concentración respuesta a carbacol en músculo liso de tráquea de ratas sensibilizadas y con diferentes tratamientos hormonales. Los resultados son expresados como porcentaje de respuesta de KCl 60mM y son la media  $\pm$  error estándar (líneas verticales) de 4 a 6 observaciones

A pesar de que en el comportamiento gráfico de las ratas sensibilizadas tratadas con estradiol se encuentre un poco distanciado del comportamiento de las ratas restantes, este tiene diferencia significativa solo con las ratas tratadas con progesterona.

#### *Curvas concentración respuesta a salbutamol*

El efecto ejercido por el salbutamol en el músculo liso de la tráquea mostró diferencias significativas por análisis estadístico en sus respuestas máximas, tanto en grupos sensibilizados como no sensibilizados con respecto al grupo de ratas no sensibilizadas + testosterona (cuadro 2).

Cuadro 2. Respuesta inducida por salbutamol frente a la contracción inducida por carbacol en músculo liso de tráquea de ratas no sensibilizadas o sensibilizadas que recibieron diferentes tratamientos hormonales.

TRATAMIENTO	CE <sub>50</sub> [x10 <sup>-07</sup> M]	Rmax (porcentaje de relajación)
No Sensibilizada		
• Vehículo	3.49 ± 1.09*	58.35 ± 0.14
• 17β-Estradiol	12.79 ± 9.99	26.80 ± 0.02**
• Progesterona	4.35± 1.30	54.80 ± 0.05
• 17β-Estradiol + Progesterona	7.61± 3.24	51.35 ± 0.04
• Testosterona	10.83± 2.60	66.50 ± 0.06
Sensibilizada		
• Vehículo	11.60± 4.14	30.68 ± 0.07**
• 17β-Estradiol	4.26± 1.60	40.44 ± 0.07
• Progesterona	3.87± 0.53*	45.13 ± 0.06
• 17β-Estradiol + Progesterona	6.37± 0.79	36.05 ± 0.01
• Testosterona	36.29± 17.17	34.23 ± 0.07

Los valores presentados son la media ± el error estándar (n=4).\*ANOVA con prueba de Holm-Sidak como post hoc  $P < 0.05$  con respecto al grupo de sensibilizadas + testosterona. \*\*  $P < 0.05$  con respecto al grupo de no sensibilizadas + testosterona

A pesar de que el comportamiento que tienen las tráqueas de ratas no sensibilizadas tratadas con estradiol es similar al de las ratas sensibilizadas tratadas con testosterona, el estradiol no es significativo con respecto a los grupos restantes debido a que tiene un error estándar grande y por consiguiente desviación estándar mayor a la media de concentración efectiva 50 (Figura 8).

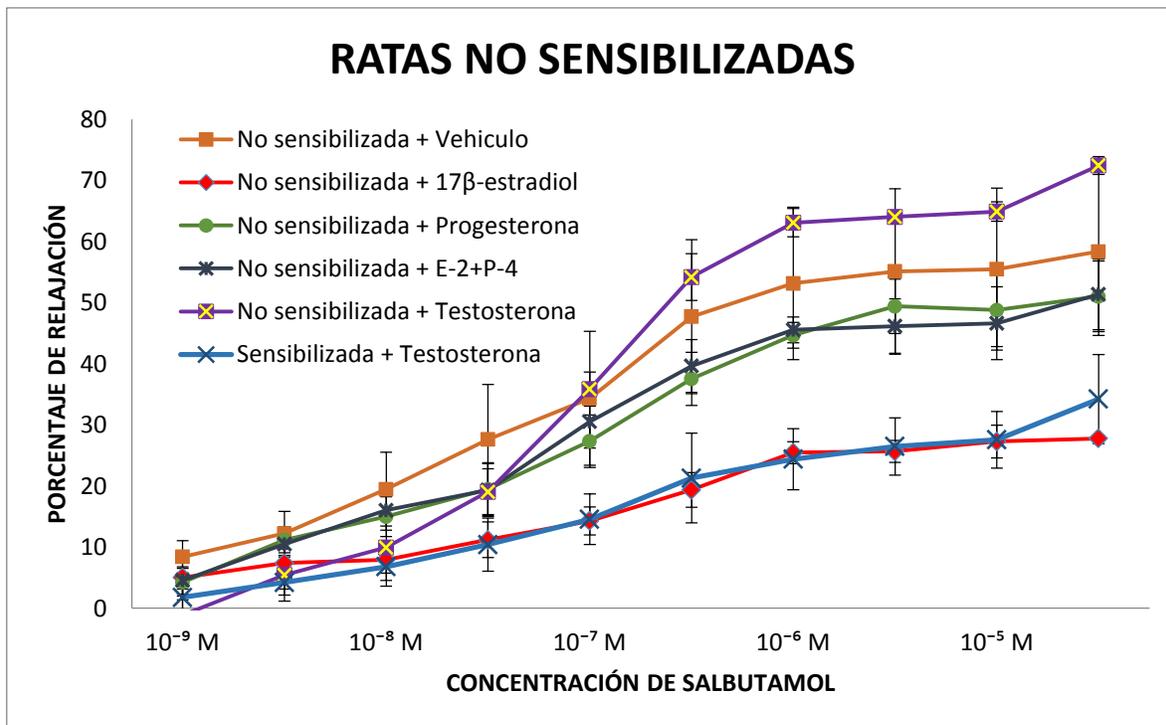


Figura 8. Curva concentración respuesta a salbutamol en músculo liso de tráquea de ratas no sensibilizadas y con diferentes tratamientos hormonales. Los resultados son expresados como porcentaje de relajación con respecto a la contracción inducida por carbacol y son la media  $\pm$  error estándar (líneas verticales) de 4 observaciones.

El comportamiento de la tráquea de ratas sensibilizadas se puede observar en la figura 9, en la cual las ratas no sensibilizadas tratadas con testosterona muestran una diferencia grafica evidente con respecto a los grupos restantes, además de mostrar un nivel de significancia menor de 0.05.

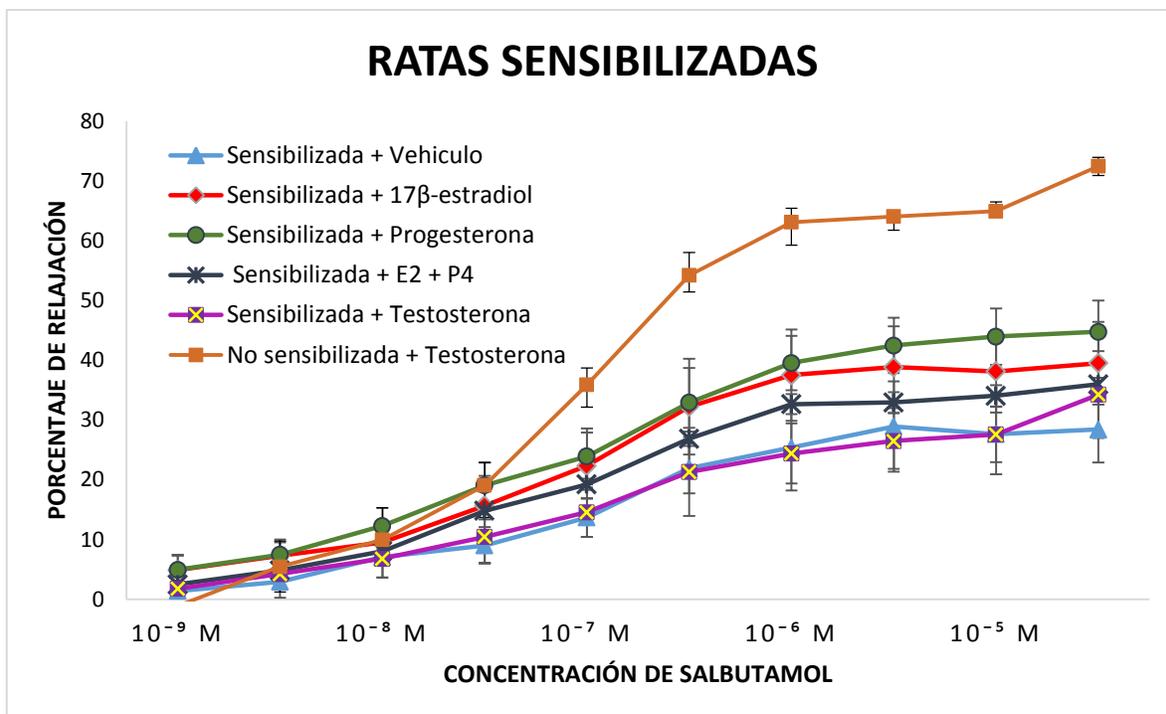


Figura 9. Curva concentración respuesta a salbutamol en músculo liso de tráquea de ratas sensibilizadas y con diferentes tratamientos hormonales. Los resultados son expresados como porcentaje de relajación con respecto a la contracción inducida por carbacol y son la media  $\pm$  error estándar (líneas verticales) de 4 observaciones.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se encontraron diferencias significativas en cuanto al efecto que ejerce la progesterona en ratas sensibilizadas, determinándose una menor contracción de la MLVA. También se hallaron diferencias significativas en ratas no sensibilizadas y sensibilizadas tratadas con testosterona en la relajación con salbutamol. Es decir, en las ratas no sensibilizadas, la testosterona produjo una mayor relajación, mientras que en las sensibilizadas ocurre lo contrario (menor relajación).

Al llevar a cabo las curvas concentración respuesta a carbacol en tráqueas de ratas sensibilizadas y no sensibilizadas se esperaba que todos los tratamientos hormonales influyeran en la contracción ya que diferentes autores han reportado influencia de las hormonas sexuales en la contracción de músculo liso de vías aéreas (32-34). Sin embargo, la mayoría de ellos trabajaron con ratas, ratones o cobayos hembras, lo que pudiera explicar la diferencia entre los resultados obtenidos y los reportados ya que posiblemente las hembras tengan mayor cantidad de receptores (principalmente receptores a estrógenos y progesterona) en vías aéreas que los animales machos. Asimismo, en esos trabajos no se detalla cómo se controlaron las variaciones de los niveles hormonales plasmáticos propios del ciclo estral.

En el caso de las ratas macho sensibilizadas tratadas con progesterona se determinó que posiblemente la progesterona tenga un efecto protector sobre las vías aéreas, ya que la  $CE_{50}$  fue mayor con respecto a los grupos restantes de sensibilizadas y no sensibilizadas, lo cual indica que para que el carbacol ejerza efecto en las vías aéreas se necesita una mayor concentración de la que se usaría

en condiciones normales. Estos resultados concuerdan con los hallados por Perusquía et al (20), donde atribuyeron el efecto protector de la progesterona a un efecto antagonista dependiente de concentración, en el cual existe un bloqueo de flujo de calcio a la membrana de las células del músculo liso (mecanismo no genómico). Este efecto no se observa en las ratas no sensibilizadas tratadas con progesterona, posiblemente debido a que la sensibilización de la rata ayuda a una mayor expresión de los receptores de progesterona en el músculo liso de vías aéreas, similar a este comportamiento en las no sensibilizadas las halló Hellings et al. (35) al comparar la respuesta de sensibilizadas y no sensibilizadas tratadas con progesterona frente a un control en el que determinó que no había diferencias en las no sensibilizadas tratadas con progesterona frente al control.

En cuanto a las ratas tratadas con estradiol sensibilizadas y no sensibilizadas no mostraron diferencia significativa con respecto a los controles (ratas sensibilizadas y no sensibilizadas tratadas con vehículo) sin embargo si lo mostraron con respecto a la progesterona (sensibilizadas) y el resultado de la  $CE_{50}$  fue menor, lo que indica que tiene una mayor respuesta a carbacol y por lo tanto una broncoconstricción a dosis más baja que en presencia de progesterona, lo que es contradictorio a lo que reportan varios autores ya señalan que el estradiol ayuda a una menor contracción de la MLVA (32,33,34,36), sin embargo como se explicó anteriormente, esto lo llevaron a cabo en animales hembra, los cuales tienen una mayor expresión de receptores a estrógenos que los macho, por esta razón puede que el efecto sea distinto a las mismas dosis. Otros autores sugieren que el estradiol genera una mayor broncoconstricción desde el punto de vista inmunológico ya que puede actuar como proinflamatorio (37), e incluso puede

favorecer la producción de células del tipo Th2, característica del asma (38), además también señalan que los estrógenos están asociados a una mayor tasa de diagnóstico de asma en mujeres menopaúsicas (39). Sin embargo otros estudios son necesarios para mostrar el papel del estradiol en el asma.

En cuanto a los andrógenos ocurre algo similar a los estrógenos, ya que algunos autores señalan su efecto protector (24,40), en la respuesta inmune disminuyendo o evitando la inflamación, pero no mencionan la contracción de la MLVA. Otros autores mencionan que la testosterona aumenta la broncoconstricción en presencia de metacolina o LPS (41), lo que sugiere que la testosterona si influye en la hipersensibilidad de la MLVA, lo cual coincide con los resultados aquí obtenidos ya que la testosterona tiene una  $CE_{50}$  menor a la de progesterona lo que evidenciando que responde a una menor dosis al carbacol.

En cuanto a la curva de salbutamol se observó un efecto opuesto en las ratas sensibilizadas y no sensibilizadas tratadas con testosterona, ya que, mientras en ratas no sensibilizadas se presentaba una mayor relajación de la MLVA, en ratas sensibilizadas había una menor respuesta a salbutamol. El efecto sinérgico en la relajación con testosterona coincide con lo que señalan otros trabajos (24, 42,44), en el que proponen que la testosterona bloquea la entrada de calcio. Otros autores (41) señalan una menor relajación del MLVA en presencia de testosterona aunque no explican un posible mecanismo, la posible razón por la cual presente este efecto probablemente se deba a que la testosterona induzca una menor expresión de los receptores adrenérgicos  $\beta_2$ , específicamente en ratas no sensibilizadas (efecto genómico), aunque se necesitan más investigaciones para dilucidar este mecanismo.

## **CONCLUSION**

A partir de ratas macho sensibilizadas y no sensibilizadas se determinó el efecto que ejercen las hormonas sexuales estradiol, progesterona y testosterona en la contracción y relajación del músculo liso de tráquea; llevando a cabo, para esto, curvas concentración respuesta a carbacol y a salbutamol

Las hormonas sexuales influyen en la contracción y relajación del músculo liso de las vías aéreas, y las que tienen mayor influencia son la progesterona y la testosterona. La progesterona, en el modelo asmático (sensibilizado), produce relajación al igual que la testosterona en el modelo no sensibilizado. En modelos asmáticos tratados con testosterona se presentó una menor relajación de la MLVA. Estos resultados pueden ayudar a una visión más integral de la importante participación de las hormonas sexuales en el asma y promover mayor investigación de un posible tratamiento que involucre a las hormonas sexuales.

## REFERENCIAS

1. Galanter JM, Lazarus S. Farmacología integrada de la inflamación: asma. En: Golan DE, editor en jefe. Principios de farmacología. 3ª ed. Filadelfia: Wolster Kluwe; 2012. p. 820-36.
2. National Asthma Education and Prevention Program. Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the diagnosis and management of asthma. Summary Report 2007. J Allergy Clin Immunol 2007; 120(5):s94-s138.
3. Smith CM, Reynard AM. Farmacología. Argentina: Panamericana; 1993. p. 985-90
4. Moorman JE, Rudd RA, Johnson CA, King M, Minor P, Bailey C, et al. National surveillance for asthma: United States, 2001-2010. National Center for Health Statistics. Vital Health Stat 2012; 3(35).
5. Sancho CG, Plata RF, Briseño DM, Marina FF, Padilla JR. Prevalencia y riesgos asociados con pacientes adultos con asma de 40 años o más de la Ciudad de México: estudio de base poblacional. Salud Publica Mex 2012; 54: 425-32
6. Ceballos Martínez ZI, Peralta Bahena ME, Sandoval Jurado L, Contla-Hosking JE. Costo directo de la atención por crisis aguda de asma en el servicio de urgencia pediátrica. Rev Alergia Mex. 2005; 51(4): 134-48
7. Martínez VM, Torres MM. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Asma y estado asmático. Sistema único de información, Secretaria de Salud 2004; 21(30): 1-3
8. Guía de práctica clínica. Diagnóstico y tratamiento del asma en mayores de 18 años, México; Instituto Mexicano del Seguro Social. 2009
9. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmacología. 5ª ed. España: Elsevier; 2004. P. 340-51
10. Barnes P. Biochemical basis of asthma therapy. J Biol Chem. 2011; 38: 32899-905

11. Benyahia C, Gomez I, Kanyinda L, Boukais K, Danel C, Leséche G, et al. PGE<sub>2</sub> receptor (EP<sub>4</sub>) agonists: potent dilators of human bronchi and future asthma therapy?. *Pulm Pharmacol Ther.* 2012; 25: 115-8.
12. Yazid S, Solito E, Christian H, McArthur S, Goulding N, Flower R. Cromoglycate drugs suppress eicosanoid generation in U937 cells by promoting the release of Anx-A1. *Biochem Pharmacol.* 2009; 77: 1814-26.
13. Holgate ST. Pathophysiology of asthma: What has our current understanding taught us about new therapeutic approaches? *J Allergy Clin Immunol.* 2011; 128: 495-505
14. Barnes PJ, Adcock IM. How do corticosteroids work in asthma? *Ann Intern Med.* 2003; 139(5 pt 1): 359-70.
15. Carey MA, Card JW, Voltz JW, Arbes SJ, Germolec DR, Korach KS, Zeldin DC. It's all about sex: gender, lung development and lung disease. *Trends Endocrinol Metab.* 2007; Oct; 18(8): 308-13.
16. Ostrom N. Women with asthma: a review of potential variables and preferred medical management. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2006; 96(5): 655-65.
17. Townsend EA, Miller VM, Prakash YS. Sex differences and sex steroids in lung health and disease. *Endocr Rev.* 2012; 33(1): 1-47
18. Balzano G, Fuschillo S, Melillo G, Bonini S. Asthma and sex hormones. *Allergy.* 2001; 56(1): 13-20.
19. Regensteiner JG, McCullough RG, McCullough RE, Pickett CK, Moore LG. Combined effects of female hormones and exercise on hypoxic ventilator response. *Respir Physiol.* 1990; 82(1): 107-14.
20. Perusquia M, Hernandez R, Montaña L, Villalon C, Campos MG. Inhibitory effect of sex steroids on guinea pig airway smooth muscle contraction. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 1997; 118(1): 5-10.
21. González-Arenas A, Neri-Gómez T, Guerra-Araiza C, Camacho-Arroyo I. Sexual dimorphism in the content of progesterone and estrogen receptors, and their cofactors in the lung of adult rats. *Steroids.* 2004; 69(5): 351-6.
22. Camacho-Arroyo I, Méndez-Cruz ST, Guerra-Araiza C, Cerbón MA. Changes in progesterone receptor mRNA content in rabbit lung during early

- pregnancy and after sex steroid hormone treatment. *J Endocrinol.* 1998; 157(1): 71-4.
23. Zarazua A, Arriaga-Pizano L, Guerra C, Oropeza M, Campos M. Expression and regulation of estrogen, progesterone and androgen receptors in airway smooth muscle cells in an allergic asthma rat model. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 183: A3651
  24. Carey M, Card J, Voltz J, Germolec D, Korach K, Zeldin D. The impact of sex and sex hormones on lung physiology and disease: lessons from animal studies. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007; 293: L272–8
  25. Bird M, Karivitis J, Kovacs E. Sex differences and estrogen modulation of the cellular immune response after injury. *Cell Immunol.* 2008; 252 (1-2): 57-67
  26. Silva J. Sex hormones, glucocorticoids and autoimmunity: facts and hypotheses. *Ann Rheum Dis.* 1995; 54: 6-16.
  27. Carpe N, Mandeville I, Ribeiro L, Ponton A, Martin J, Kho A, et al. Genetic influences on asthma susceptibility in the developing lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010; 43: 720-30.
  28. Murai A, Abe M, Hayashi Y, Sakata N, Katsuragi T, Tanaka K. Comparison study between the mechanisms of allergic asthma amelioration by cysteinyl-leukotriene type 1 receptor antagonist montelukast and methylprednisolone. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 312 (2): 432-40.
  29. Montalvo F, Cantres-Fonseca O, Santos G, Vega M, Torres I, Carmona J, et al. Nitric oxide is involved in the response of the isolated intact and epithelium-denuded rat trachea to the  $\beta_2$  adrenergic receptor agonist salbutamol. *Respiration* 2010; 80: 426-432.
  30. de Sousa AA, Soares PM, Almeida AN, Maia AR, de Souza EP, Assreuy AM, et al. Antispasmodic effect of menthe piperita essential oil on tracheal smooth muscle of rats. *J Ethnopharmacol.* 2010; 130(2): 433-6.
  31. Fernandez J, Reyes R, Ponce H, Oropeza M, Van Calsteren M, Jankowski C, Campos M. Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D<sub>4</sub>-induced contraction in guinea-pig airways. *Eur J Pharmacol.* 2005; 522: 108-15.
  32. Dimitropoulou C, White RE, Ownby DR, Catravas JD. Estrogen reduces carbachol-induced constriction of asthmatic airways by stimulating large-conductance voltage and calcium-dependent potassium channels. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005; 32(3): 239-47

33. Dimitropoulou C, Drakopaganiotakis F, Chatterjee A, Snad C, Catravas JD. Estrogen replacement therapy prevents airway dysfunction in a murine model of allergen-induced asthma. *Lung*. 2009;187(2): 116-27
34. Lino-dos-Santos-Franco A, Amemiya RM, Ligeiro de Oliveira AP, Breithaupt-Faloppa AC, Damazo AS, Oliveira-Filho RM, Tavares-de-Lima W. Differential effects of female sex hormones on cellular recruitment and tracheal reactivity after formaldehyde exposure. *Toxicol Lett*. 2011; 205(3): 327-35
35. Hellings PW, Vandekerckhove P, Claeys R, Billen J, Kasran A, Ceuppens JL. Progesterone increases airway eosinophilia and hyper-responsiveness in a murine model of allergic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2003; 33(10):1457-63.
36. Dimitropoulou C, Richard W, Ownby D, Catravas J. Estrogen reduces carbachol-induced constriction of asthmatic airways by stimulating large conductance voltage and calcium-dependent potassium channels. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005; 32: 239-47.
37. Ligeiro de Oliveira AP, Oliveira-Filho RM, da Silva ZL, Borelli P, Tavares de Lima W. Regulation of allergic lung inflammation in rats: interaction between estradiol and corticosterone. *Neuroimmunomodulation*. 2004; 11(1): 20-7.
38. Tam A, Morrish D, Wadsworth S, Dorscheid D, Paul Man S, Sin D. The role of female hormones on lung function in chronic lung diseases. *BMC Womens Health*. 2011; 11: 24
39. Romieu I, Fabre A, Fournier A, Kauffmann F, Varraso R, Mesrine S, et al. Postmenopausal hormone therapy and asthma onset in the E3N cohort. *Thorax*. 2010; 65(4): 292-7.
40. Hayashi T, Adachi Y, Hasegawa K, Morimoto M. Less sensitivity for late airway inflammation in males than females in balb/c mice. *Scan J Immunol*. 2003; 57: 562-7.
41. Card J, Voltz J, Ferguson C, Carey M, DeGraff L, Peddada S, Et al. Male sex hormones promote vagally mediated reflex airway responsiveness to cholinergic stimulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 292: L908-14
42. Suárez L, Pipa M, Granda J, Coto A, Bordallo J, Cantabrana B, García de Boto MJ, Sánchez M. Sex hormones modulate salbutamol-elicited long-term

relaxation in isolated bovine tracheal strips. *Pharmacol.* 2011; 87(5-6): 249-56.

43. Kouloumenta V, Hatzieffhimiou A, Paraskeva E, Gourgoulisanis K, Molyvdas PA. Non-genomic effect of testosterone on airway smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 2006;149: 1083-91.
44. Bordallo J, de Boto MJ, Meana C, Velasco L, Bordallo C, Suárez L, et al. Modulatory role of endogenous androgens on airway smooth muscle tone in isolated guinea-pig and bovine trachea; involvement of beta2-adrenoceptors, the polyamine system and external calcium. *Eur J Pharmacol.* 2008; 28; 601(1-3):154-62.