



CUADERNO DE PRÁCTICAS DE FARMACOLOGÍA III

Grado en Farmacia



Autor: Dr. Manuel Sánchez Santos

Departamento de Farmacología
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada



Estas prácticas se dividen en varias partes:

1) El 1^{er} y el 2^o día se recordará y profundizará lo estudiado en las prácticas de Farmacología I y Farmacología II. Veremos cómo se trabaja en farmacología y utilizaremos, de forma virtual, algunos de los métodos usados para investigar y conocer las acciones de los fármacos, así como el mecanismo de acción mediante el que actúan. Para ello usaremos un programa informático que simula un experimento con un órgano aislado, "Organ Bath Simulation", creado por John Dempster de la Universidad de Strathclyde (2009-16 V2.8). Con él estudiaremos **fármacos que modifican la motilidad intestinal en íleon aislado de cobaya (o conejillo de indias)**.

2) El 3^{er} día se estudiará la respuesta inflamatoria. Mediante experimentos virtualizados se analizará el efecto de distintos mediadores inflamatorios y el efecto sobre la respuesta a estos de diversos productos farmacológicos. Para ello se utilizará el software "Inflammation Pharmacology".

3) El 4^o día se estudiará la fisiología y función de las vías respiratorias así como la función pulmonar. Se analizará cómo diversos mediadores endógenos y productos farmacológicos son capaces de modificarlas. Para ello, de nuevo gracias a experimentos virtualizados, utilizaremos el software "Respiratory Pharmacology".

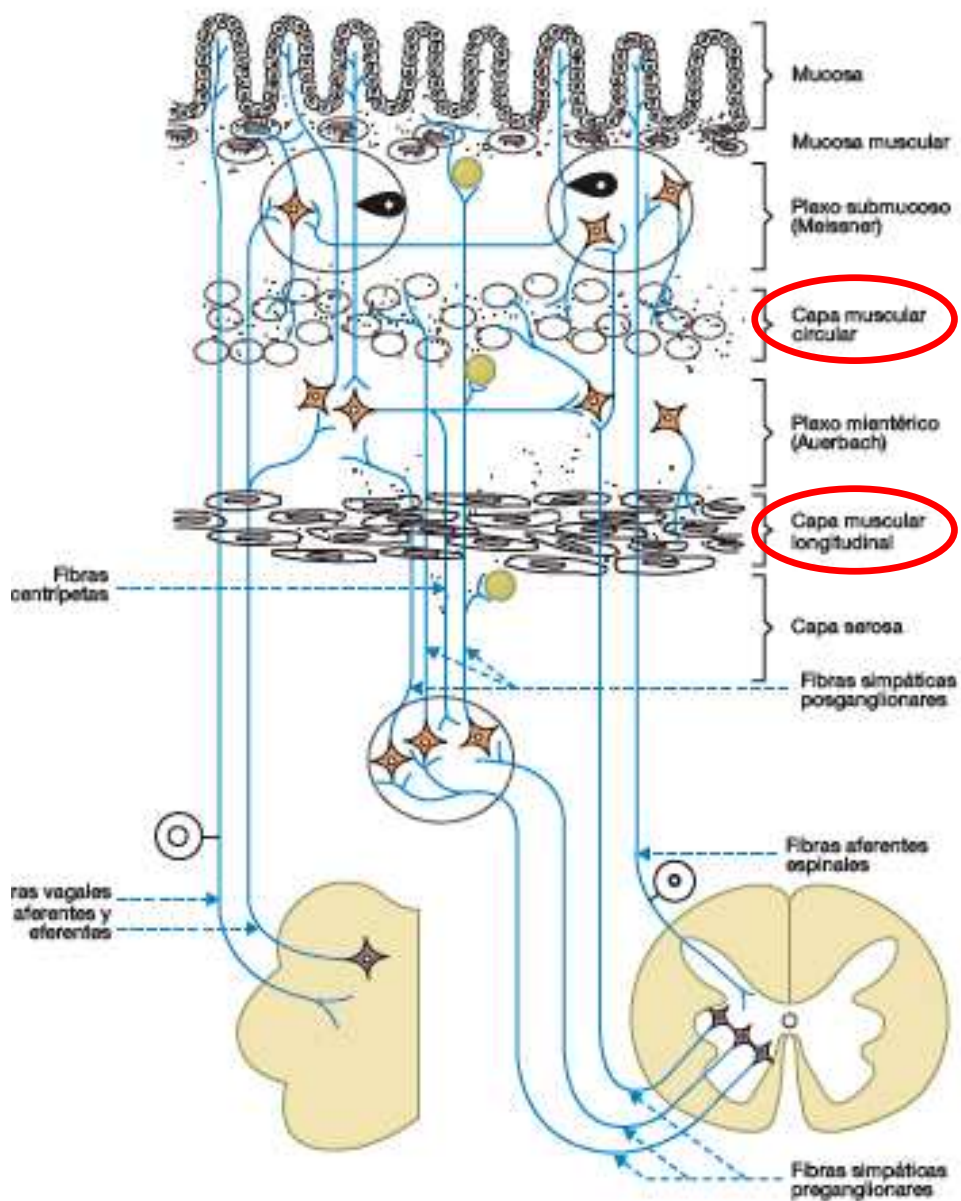
4) El 5^o día se realizará el **examen** de las prácticas.

Días 1 y 2. ESTUDIO DE FÁRMACOS QUE MODIFICAN LA MOTILIDAD INTESTINAL

1er día: En estas prácticas vamos a estudiar el efecto y el mecanismo de acción de fármacos que modifican la motilidad intestinal.

El tubo intestinal posee dos tipos de fibras musculares, responsables de la motilidad y del tránsito intestinal:

- Músculo circular, que interviene en los movimientos de mezcla o amasamiento.
- Músculo longitudinal, que determina los movimientos propulsivos o peristálticos.



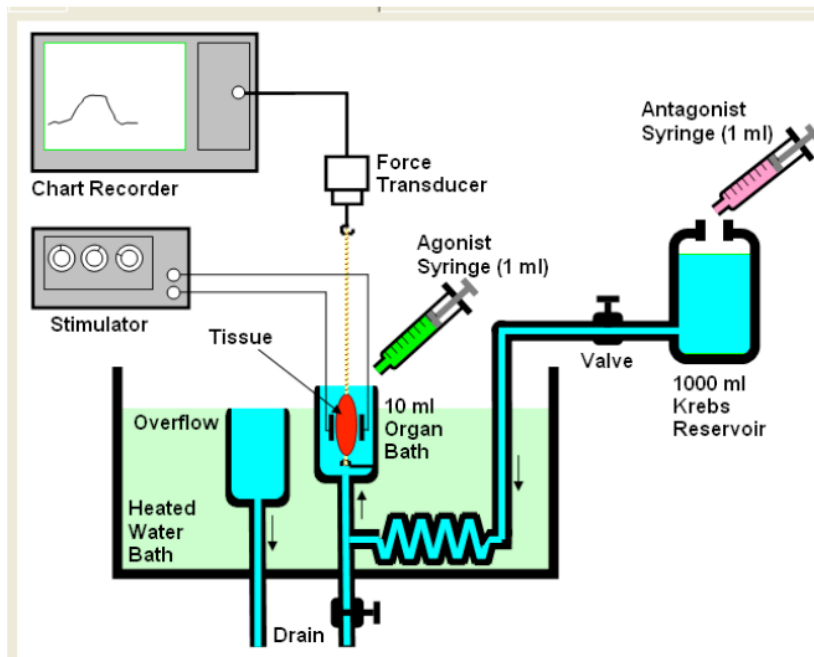
Los movimientos propulsivos se pueden alterar y originar situaciones de:

- Disminución de motilidad, lo cual origina **estreñimiento**.
- Aumento de motilidad, lo cual causa **diarrea**, con o sin espasmos (retortijones).

Los fármacos que vamos a estudiar son de dos tipos: **procinéticos**, que aumentan la motilidad y **espasmodícos**, que la disminuyen.

Para investigar, tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo, el efecto de estos fármacos sobre la motilidad intestinal, vamos a utilizar un programa que simula el montaje de **íleon aislado de cobaya (o conejillo de indias)** en un baño de órganos.

SISTEMA DE BAÑO DE ÓRGANOS



Tras el sacrificio de los animales y su posterior exanguinación, se extrae cuidadosamente una porción del íleon y se deposita en una placa Petri que contiene una solución nutritiva que permite mantener el órgano vivo (solución Krebs- Henseleit, con Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , CO_3HNa , $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, glucosa y Na_2EDTA). Seguidamente, se eliminan los restos de tejido conjuntivo y adiposo adheridos al íleon y se divide en tiras de unos 3 cm de longitud para proceder a su montaje en el sistema de baño de órganos: uno de los extremos de la tira queda fijado a la pared del baño y el otro se conecta a un transductor isométrico de fuerza-desplazamiento.

El baño de órganos contiene 10 ml de la solución Krebs, mantenida a 37^o C y constantemente burbujeadada con O₂ al 95% y CO₂ al 5% (gas carbógeno) para mantener un pH comprendido entre 7,3 y 7,4. La tira de íleon se somete a una tensión de 1 g y se deja estabilizar durante 30-60 minutos antes de la adición de los fármacos.

A) ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS SOBRE EL TONO INTESTINAL

Experimento 1. Estudio del efecto de la histamina, el carbacol, la morfina y la loperamida sobre el tono intestinal

1.1. Obtener la ecuación de la curva concentración - respuesta de cada uno de estos compuestos (10^{-9} M - 10^{-5} M)

Para calcular la relación entre la concentración de agonista añadido al baño y la respuesta obtenida se van añadiendo al baño concentraciones de agonista sucesivamente crecientes en progresión geométrica ($1 \cdot 10^{-9}$ M, $5 \cdot 10^{-9}$ M, $1 \cdot 10^{-8}$ M, $5 \cdot 10^{-8}$ M, $1 \cdot 10^{-7}$ M, $5 \cdot 10^{-7}$ M, $1 \cdot 10^{-6}$ M, $5 \cdot 10^{-6}$ M, $1 \cdot 10^{-5}$ M).

Para conseguir las distintas concentraciones de cada agonista en el baño de órganos, se considera que la concentración molar final del baño (CFB) está relacionada con la concentración molar de solución madre [C], el volumen de ésta añadido al baño (en ml) y el volumen del baño de órganos (ml) mediante la fórmula:

$$[\text{CFB}] \times \text{Volumen del baño} = [\text{C}] \times \text{Volumen añadido}$$

El volumen del baño es de 10 ml. Por lo tanto, para conseguir en el baño una concentración inicial de $1 \cdot 10^{-9}$ M, tenemos que añadir un volumen conocido (0,01 ml) de una solución madre cuya concentración podemos calcular con la fórmula anterior y que resulta ser $1 \cdot 10^{-6}$.

El resto de concentraciones se consiguen añadiendo un volumen mayor de la solución madre inicial o bien partiendo de soluciones madre más concentradas (cuando el volumen añadido pueda modificar el volumen final del baño). La magnitud de cada respuesta se obtiene midiendo la amplitud del pico de las contracciones del tejido.

Con los resultados obtenidos, se confecciona **una tabla con varias columnas:**

Dosis, logaritmo de la dosis de cada agonista (log), efecto obtenido (en g), % de efecto en relación al efecto máximo (E/Emax).

Estos datos permiten conocer el comportamiento de los fármacos ensayados y responder a las siguientes preguntas:

- ¿Qué fármacos son procinéticos?
- ¿Cuál es más eficaz?
- ¿Cuál es más potente? En relación a esta cuestión, se puede valorar la potencia de un fármaco calculando su pD_2 :

pD_2 es el logaritmo negativo (- log) de la concentración molar de agonista necesaria para obtener la mitad del efecto máximo.

Concentración agonista	Log concentración	Efecto	% Efecto/Emáx

Para conocer el pD_2 hay que calcular la ecuación de la curva dosis-respuesta o concentración-respuesta (CR) de los agonistas ensayados que modifican la motilidad intestinal.

1.2. Obtener la ecuación de la curva concentración-respuesta de relajación de diversos antagonistas (10^{-9} M - 10^{-5} M) tras precontracción con histamina o carbacol (10^{-6} M).

Los antagonistas usados son: Atropina, Mepiramina, Tubocurarina y Naloxona, que permitirán deducir qué receptores están implicados en la actuación de los dos agonistas ensayados. Deberán realizarse por tanto, en total, 8 curvas dosis-respuesta.

Para cada curva se calculará la **Concentración Inhibitoria 50 (IC_{50})**, que es “la concentración molar de antagonista que se necesita para reducir el efecto del agonista a la mitad” y que está relacionada con la potencia antagonista de cada compuesto.

De forma similar, aunque no igual, a como se calculó el pD_2 para un fármaco agonista, se puede valorar la potencia de un fármaco antagonista calculando su pA_2 .

pA_2 es el logaritmo negativo (-log) de la concentración molar de antagonista en presencia de la cual es necesario duplicar la concentración de agonista para obtener el efecto original. Dicho de otro modo, es la concentración molar de antagonista que reduce por 2 el efecto del agonista. O lo que es lo mismo:

$$pA_2 = -\log [IC_{50}].$$

Para calcularlo, se confecciona la siguiente tabla:

Concentración antagonista	Log concentración	Efecto	% Efecto/Emáx

Experimento 2. Estudio del efecto de la morfina y la loperamida (10^{-9} M - 10^{-5} M) en la contracción provocada por carbacol (10^{-6} M) o histamina (10^{-6} M).

Se añaden al baño concentraciones crecientes del agonista en estudio (1. Morfina, 2. loperamida) tras realizar una precontracción en el íleon con a) carbacol o con b) histamina, a las dosis arriba indicadas, y se observa si la contracción que éstos originan se modifica. Se realizarán así 4 curvas en total.

2º día:

B) ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA SOBRE EL TONO INTESTINAL:

Experimento 3

3.1. Observar los efectos de la estimulación eléctrica sobre el tono intestinal

Si se estimula eléctricamente el íleon montado en el baño de órganos con una determinada frecuencia (hercios, Hz) e intensidad (voltios,V), se produce la liberación de algunos neurotransmisores. Concretamente, **si se estimula a baja frecuencia (0,1 Hz)**, se produce la **liberación de acetilcolina (Ach)** de las neuronas del sistema nervioso entérico (neuronas intrínsecas), Ach que se une a receptores M₃ del músculo liso intestinal y origina, así, una determinada contracción del mismo. La frecuencia y la intensidad están fijadas en el programa para que se libere precisamente Ach. Se obtienen una serie de contracciones seguidas. Cada contracción se corresponde con un pulso de corriente aplicado al tejido.

3.2. Estudiar el efecto de algunos fármacos en la respuesta obtenida por estimulación eléctrica.

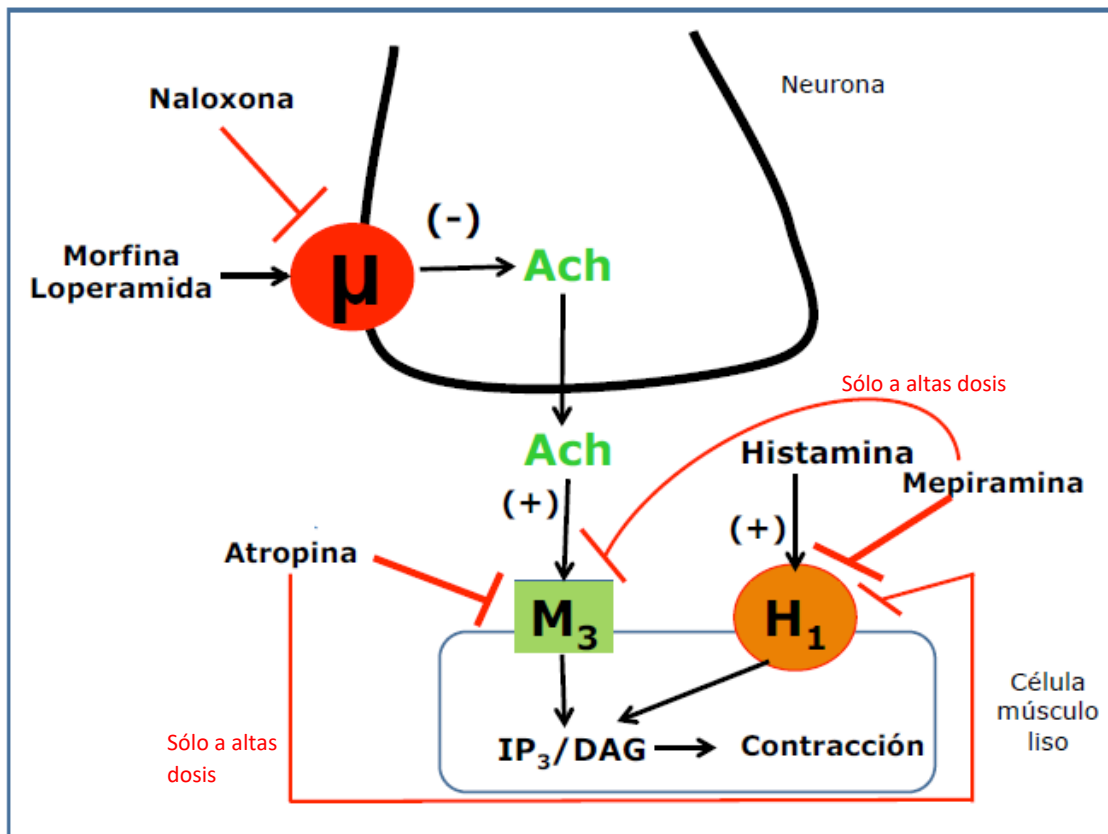
Una vez que hemos estimulado eléctricamente, se añaden dosis crecientes de los siguientes fármacos:

- 1) Atropina (10^{-9} M - 10^{-7} M)
- 2) Mepiramina (10^{-9} M - 10^{-4} M)
- 3) Morfina (10^{-9} M - 10^{-5} M)
- 4) Loperamida (10^{-9} M - 10^{-5} M)

Se observa, para cada uno de ellos, si la adición del fármaco al baño modifica la respuesta obtenida por estimulación eléctrica. En caso de existir modificación, se puede deducir qué mecanismo está implicado en la respuesta a la estimulación eléctrica.

3.3. Investigar el efecto de la naloxona (10^{-5} M) en las respuestas obtenidas por estimulación eléctrica y adición de cada uno de los fármacos anteriormente ensayados (atropina, mepiramina, morfina y loperamida).

Esquema resumen de los mecanismos farmacológicos observados:



Día 3. Farmacología de la inflamación.

Cómo utilizar el programa

Bienvenido a 'La farmacología de la inflamación'. Utilice las secciones iniciales de este programa para obtener una visión global del tema y después continúe realizando experimentos simulados para investigar la farmacología de la inflamación en la sección "Experimentos". El programa se divide en cuatro secciones principales, incluida esta.

Sobre

Esta sección informa sobre el programa y sus objetivos.

Introducción

Esta sección le permitirá conocer la farmacología de la inflamación.

Métodos

Esta sección ayudará a comprender la preparación y la experimentación en conejos (*in vivo*).

Experimentos

Esta sección presenta datos, en forma gráfica, de experimentos para estudiar los efectos de diversos fármacos en la formación de edemas y la acumulación de neutrófilos *in vivo* tanto en **conejos normales** anestesiados como en **conejos sensibilizados** por la administración previa de alérgenos (**conejos alérgicos**). Se presentan datos de experimentos con fármacos que afectan a mediadores de la formación de edemas, que afectan a la acumulación de neutrófilos o que tienen acciones antiinflamatorias. Para cada conjunto de datos hay preguntas de autoevaluación que requieren que se interpreten los datos presentados.

Además de las secciones principales, el programa tiene un **glosario**, **preguntas de autoevaluación** y **archivos de ayuda**. El glosario le ayudará a comprender los nombres de medicamentos y los términos científicos desconocidos. Los archivos de ayuda contienen información sobre cómo navegar por el programa.

Objetivos del programa

El objetivo de este programa informático es familiarizar al estudiante con las características de la respuesta inflamatoria y examinar las formas en que los eventos inflamatorios pueden ser modulados mediante mediadores inflamatorios y fármacos.

Los signos principales de la inflamación son **rubor** (enrojecimiento debido al aumento del flujo sanguíneo), **tumor** (hinchazón o edema), **calor** (en el lugar de la inflamación), **dolor** y **pérdida de función**. Existe clara evidencia de que el inicio de la enfermedad inflamatoria está asociado con eventos vasculares de la microcirculación. El programa está diseñado para demostrar la acción de varios agentes sobre la microvasculatura cutánea en el conejo anestesiado.

Se utiliza este lecho vascular porque es relativamente fácil medir los cambios en el flujo sanguíneo microvascular, la formación de edemas y la acumulación de células y así demostrar las bases inmunofarmacológicas de la inflamación.

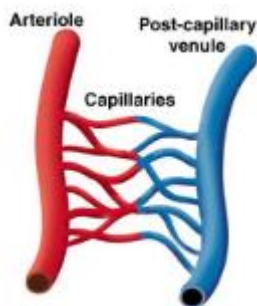
Se mostrarán las acciones e interacciones de varios **mediadores inflamatorios** y se evaluarán los efectos de los fármacos **antiinflamatorios no esteroideos (AINES)** y de los **esteroides**. Un tipo común de fármacos utilizados en el tratamiento de enfermedades inflamatorias agudas como la rinitis alérgica (o fiebre del heno) y la urticaria son los **antihistamínicos**.

Otros fármacos antiinflamatorios, tanto esteroideos como no esteroideos, con múltiples acciones antiinflamatorias se utilizan para una variedad de enfermedades tanto agudas como crónicas. Hoy en día hay mucho interés en desarrollar nuevos fármacos para las enfermedades inflamatorias crónicas, como la artritis, que inhiban el progreso de la enfermedad además de reducir la inflamación aguda y el dolor.

Introducción:

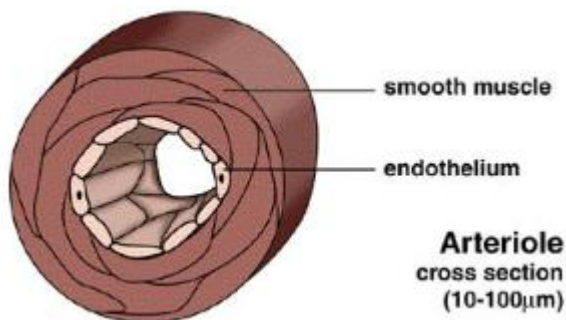
El sitio de los eventos inflamatorios: la microcirculación

La microcirculación es esencial para el transporte de nutrientes a los tejidos, la eliminación de productos de desecho, la regulación del flujo sanguíneo y la presión. Nos centraremos en las acciones de la microcirculación relevantes para la inflamación. La microcirculación comprende arteriolas, capilares y vénulas. Una monocapa continua de células endoteliales recubre el lumen de todos los vasos sanguíneos, tanto microvasculares como más grandes. Estas células poseen una amplia gama de acciones que dependen del tipo de vaso en el que se encuentran y también de la ubicación anatómica del vaso.



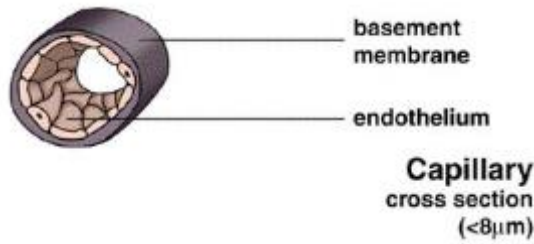
Arteriolas

Las arteriolas, junto con las arterias pequeñas, forman los **vasos de resistencia** y son importantes en la regulación del flujo sanguíneo. Los esfínteres precapilares, además de las arteriolas, son también importantes para controlar el flujo a través de los capilares. Las arteriolas (10-100 μm) se caracterizan por tener generalmente en una a tres capas de células de músculo liso.



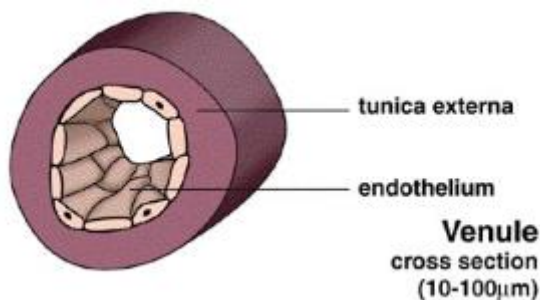
Capilares

Los capilares (<8 μm de diámetro) son esenciales para el intercambio de nutrientes y desechos de los tejidos. Consisten en una monocapa endotelial en ausencia de una capa de músculo liso circundante. Los capilares no se consideran un sitio activo para el control del flujo sanguíneo o para eventos involucrados en el proceso inflamatorio. Sin embargo, que ha visto que los capilares pueden tener un papel en la exposición de las células inflamatorias a los mediadores y, por lo tanto, preparan estas células para cuando lleguen a las vénulas postcapilares.



Vénulas poscapilares

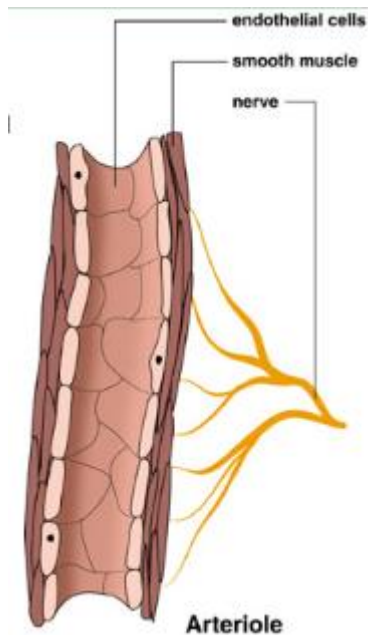
Las vénulas poscapilares son el lugar de control del proceso inflamatorio. Aquí es donde las células endoteliales actúan, dependiendo del estímulo, aumentando la permeabilidad microvascular, lo que lleva a la formación de edemas en los tejidos y a iniciar eventos que conducen a la acumulación de células inflamatorias en estos tejidos. Las vénulas poscapilares contienen poco músculo liso, en comparación con las arteriolas, pero están unidas a una capa discontinua de pericitos perivasculares. Se ha debatido el papel de los pericitos y los datos más recientes sugieren que pueden estar involucrados en la modulación de eventos en la vénula postcapilar y en el desarrollo/crecimiento de los vasos sanguíneos (un proceso conocido como **angiogénesis**).



Cambios en el flujo sanguíneo

Los cambios en el flujo sanguíneo microvascular, como se vio anteriormente, ocurren principalmente a nivel de los vasos de resistencia. Un problema es que la mayor parte de lo que sabemos se ha obtenido de estudios llevados a cabo en grandes vasos *in vitro* o de estudios de cambios en la presión arterial *in vivo*. Los resultados no siempre se correlacionan con las respuestas observadas cuando se estudia directamente el lecho microvascular. Los vasodilatadores producidos localmente, al aumentar el flujo sanguíneo en el área inflamada, aumentan el potencial de otros mediadores para inducir la formación de edemas y la acumulación de células.

Los vasodilatadores microvasculares potentes incluyen óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PG), especialmente PGI₂ (prostaciclina) o PGE₂, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), sustancia P y péptidos intestinales vasoactivos (VIP).



Métodos utilizados para medir el flujo sanguíneo microvascular

Hay una serie de técnicas que incluyen las siguientes:

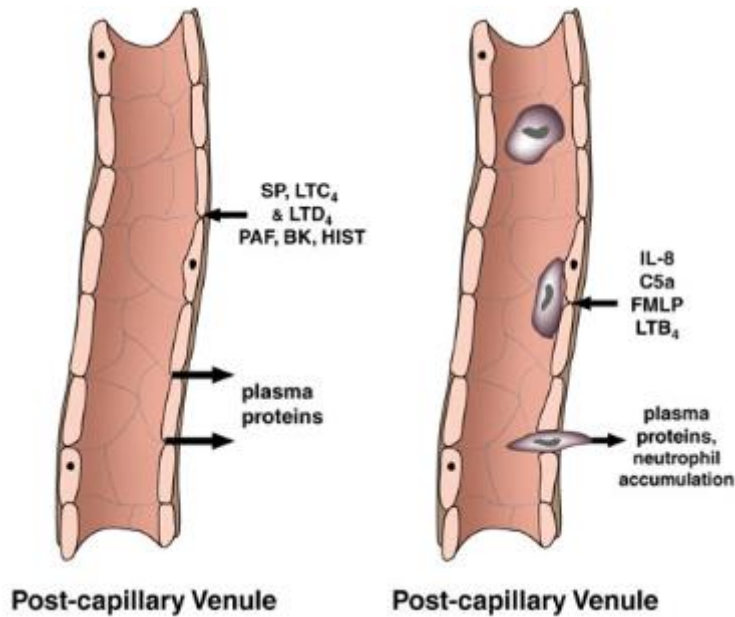
1. Se inyectan vía intravenosa microesferas radiomarcadas (marcadas radiactivamente) y luego se mide la radioactividad en el lugar u órgano deseado.
2. Otro método que se usa también como una indicación del flujo sanguíneo local es la medición del lavado de isótopos radiactivos inyectados. Se puede utilizar un isótopo radioactivo del xenón, ^{133}Xe . Este isótopo se inyecta directamente en el tejido y se evalúa el aclaramiento (eliminación) midiendo la radioactividad en el tejido después de un tiempo establecido; también puede determinarse el aclaramiento de forma continua (en tiempo real) utilizando sondas externas. Esto se debe a que el aclaramiento del isótopo radiactivo es proporcional al flujo sanguíneo a través del lugar de inyección.
3. Usando un medidor de flujo sanguíneo láser Doppler. Se ha vuelto cada vez más común, especialmente en la piel. La razón principal es que la técnica no es invasiva y permite la evaluación continua de los cambios en el flujo sanguíneo. Las principales desventajas de la técnica son que el flujo sanguíneo solo se evalúa en un área pequeña ($1\text{-}2\text{ mm}^3$) y que no es posible obtener una medición directa del flujo sanguíneo, aunque los cambios en las unidades de flujo obtenidas son directamente proporcionales a los cambios en flujo sanguíneo.

Cambios en la permeabilidad microvascular

En las vénulas poscapilares se produce de forma selectiva un aumento de la permeabilidad microvascular. Las células endoteliales pueden contraerse o sufrir cambios conformacionales que producen a una fuga a través de las uniones entre las células endoteliales adyacentes.

Potentes **mediadores del aumento de la permeabilidad** microvascular son la **histamina (HIST)**, **bradicinina (BK)**, **sustancia P (SP)**, **factor de activación plaquetario (PAF)**, **leucotrieno C4 (LTC4)** y **leucotrieno D4 (LTD4)**. Estos mediadores actúan **a través de receptores específicos** en las células endoteliales.

Otro conjunto de mediadores actúa a través de un mecanismo (aún poco conocido) dependiente de neutrófilos. Estos incluyen todos los **factores quimiotácticos** conocidos hasta el momento, como el **leucotrieno B₄** (LTB₄), el **péptido bacteriano f-metil-leucil-fenilalanina** (FMLP), el **factor del complemento C5a** o la citocina **interleucina-8** (IL-8).



Acumulación de células inflamatorias

Las interacciones entre neutrófilos y células endoteliales se han estudiado ampliamente *in vivo*, así como la acumulación extravascular de otros leucocitos. Estas células se adhieren unas a otras como consecuencia de interacciones entre glicoproteínas adhesivas, que pueden expresarse tanto en la célula endotelial como en el propio leucocito.

Como vimos anteriormente, los factores quimiotácticos (IL-8, C5a, FMLP y LTB₄) inducen la formación de edema de forma dependiente de neutrófilos. Estos factores actúan principalmente a través de receptores específicos en los neutrófilos para activar integrinas (glicoproteínas adhesivas, como por ejemplo CD18 en los neutrófilos). También existen otras glicoproteínas adhesivas (como L-selectina) que juegan un importante papel en el proceso de rodar/adhesión.

Se cree que la formación del edema se produce en las fases iniciales del proceso de adhesión / migración. Ciertos agentes, como la interleucina-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF) actúan estimulando las células endoteliales para que expresen glicoproteínas adhesivas (como por ejemplo moléculas de adhesión intercelular (ICAMs) o la E-selectina). Esta expresión de glicoproteínas depende de la síntesis de nuevas proteínas, por lo que es un proceso de inicio lento. Esto causa una lenta acumulación de neutrófilos *in vivo*, con menos formación de edema. Sin embargo, en los ensayos *in vitro* de movimiento estimulado de neutrófilos, donde las células endoteliales están ausentes (por ejemplo, el ensayo de quimiotaxis en cámara de Boyden), estos están inactivos.

Métodos

1. Medición de la formación de edema

Todos los experimentos deben llevarse a cabo de acuerdo con las normas éticas y de bienestar animal de los centros de investigación, siendo aprobados previamente por el comité de ética de la organización. Además, deben cumplir con la legislación vigente, actualmente con lo establecido en el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

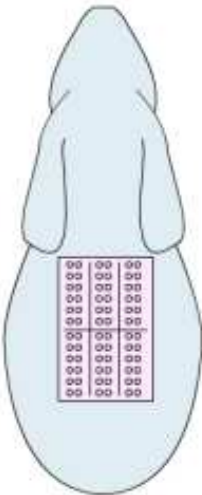
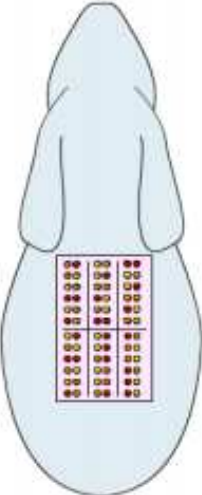
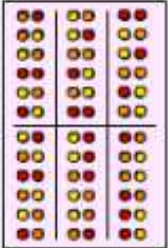

El procedimiento se realiza bajo anestesia y, por lo tanto, no se causa dolor al animal. En estos experimentos conejos blancos machos de Nueva Zelanda (2-3 kg) se anestesiaron con pentobarbital sódico (30-40 mg / kg i.v.).

Se afeitó la piel dorsal y se marcó un patrón de lugar con hasta 12 sitios de inyección en cada sección. Los compuestos a estudiar se aleatorizaron y posteriormente se asignaron de acuerdo con un patrón de lugar equilibrado, para permitir que cada combinación de agentes se inyectara una vez en cada bloque.

Se inyectaron por vía intravenosa ^{125}I -albúmina (1,5 Ci / kg)* y azul de Evans (0,5 ml / kg de 2,5% p / v). * Ci=Curios; unidad de medida de radioactividad.

Los compuestos objeto de estudio se prepararon en solución salina y se inyectaron en volúmenes de 0,1 ml en la piel dorsal afeitada de acuerdo con el patrón equilibrado, con seis repeticiones por dosis. Tras 30 minutos, cada conejo fue sacrificado mediante una sobredosis de barbitúricos.

La piel dorsal fue extraída y se perforaron los lugares de inyección. Las respuestas al edema se expresaron como volúmenes equivalentes de plasma, dividiendo cada recuento en muestra de piel por el recuento en 1 μl de plasma.

Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Se rasura a un conejo anestesiado y se marca un sitio patrón.	Los fármacos a evaluar se inyectan en los sitios marcados y se espera 30 minutos	Se sacrifica al conejo con una sobredosis de barbitúricos y se remueve la piel en donde se hizo la prueba	Se sacan de la piel de cada sitio de inyección y se colocan en un contador gamma para su análisis
			
Pulse en el conejo para continuar al paso 2	Pulse en el conejo para continuar al paso 3	Pulse en la imagen para continuar al paso 4	

Existen otros métodos para medir la formación de edemas:

1. En estudios donde la microcirculación se observa directamente (microscopía intravital) se pueden usar dextrans fluorescentes para estudios cuantitativos. También se puede usar negro de carbón para determinar el sitio de extravasación, como originalmente lo llevó a cabo Majno.
2. En algunos estudios, como el de la pata de rata o la piel humana, el volumen o el grosor de la hinchazón (o edema) se pueden medir directamente.
3. Se están desarrollando métodos como las técnicas de escaneo magnético y ultrasónico.

2. Medición de la acumulación de neutrófilos

Preparación de neutrófilos ^{111}In (radioactivos)

Se anestesió a los conejos y se les extrajo sangre mediante una cánula en la arteria carótida con un anticoagulante (citrato dextrosa ácido). Los neutrófilos se purificaron eliminando en un primer momento los glóbulos rojos con hidroxietil-almidón al 3% y posterior por centrifugación en un gradiente de densidad discontinuo de percoll de dos fases (50% y 70%). Los neutrófilos purificados (aproximadamente 37 en 1-2 ml) se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con $^{111}\text{InCl}_3$ (50-100 μCi en 10-15 μl) quelado a 2-mercaptopyridina-N-óxido (40 mg / μl). Los neutrófilos marcados con ^{111}In se lavaron dos veces antes de ser posteriormente suspendidos en plasma.

Medición de la acumulación de neutrófilos de ^{111}In en la piel

El conejo receptor se anestesia y se prepara para el experimento exactamente como se describió previamente para medir la formación del edema. De hecho, para los experimentos mostrados, la formación de edema se midió al mismo tiempo que la acumulación de neutrófilos ^{111}In . Así, además de ^{125}I -albúmina, se inyectaron neutrófilos ^{111}In vía intravenosa y a continuación se inyectaron mediadores inflamatorios por vía intradérmica, siendo el procedimiento el mismo que para la formación de edema. El período de acumulación para los experimentos con neutrófilos fue normalmente de 4 h. La acumulación de células se expresó como el número de neutrófilos ^{111}In por lugar en la piel, mediante la división de los recuentos de ^{111}In de la muestra de piel entre los recuentos de ^{111}In por neutrófilos.

3. Modelos de respuestas alérgicas

Respuestas de tipo anafiláctico agudo

Mediada por IgE: anafilaxia cutánea pasiva (PCA en inglés): el antisuero se obtiene de un conejo donante y posteriormente se inyecta (diluido según sea necesario, generalmente 1/3 - 1/10) vía intradérmica en un conejo receptor (de prueba) como pretratamiento (-72 h). El pretratamiento es necesario para permitir que la IgE se fije a las células. A diferencia de lo que ocurre en roedores y en el hombre, en el conejo no hay mastocitos cutáneos. Por tanto, la IgE probablemente se una a los basófilos cutáneos del conejo. Se administra el antígeno, generalmente gammaglobulina bovina (ya sea 5 mg / kg por vía intravenosa o 1 μg / 0,1 ml vía intradérmica) y a continuación se mide la formación de edema durante los siguientes 30 minutos. Los mediadores que intervienen en la inducción de la formación de edema no se conocen completamente, aunque se sabe que intervienen la histamina y las prostaglandinas.

Respuesta de hipersensibilidad tipo III

Mediada por IgG: Reacción de Arthus pasiva inversa (RPA en inglés): el antisuero se obtiene de un conejo donante y luego se inyecta (diluido según sea necesario, generalmente 1/2 - 1/8) vía intradérmica en un conejo receptor (de prueba). El antígeno (gammaglobulina bovina, 5 mg / kg) se administra posteriormente vía intravenosa y se mide la formación de edema durante las siguientes 4 h. La respuesta depende del complemento y, además, los neutrófilos desempeñan un papel fundamental. Otros mediadores que se cree que están involucrados son las prostaglandinas y el PAF.

Experimentos

Presentación de los resultados

La sección de 'experimentos' se divide en 2 áreas: presentación de los resultados y diseño de los experimentos (Set up).

En el apartado de diseño se pueden seleccionar varios parámetros de un experimento, como por ejemplo un conejo normal o alérgico; el tipo de compuesto a utilizar, por ejemplo, un mediador directo o mediadores que actúen a través de neutrófilos o fármacos antiinflamatorios. Para cada tipo de compuesto existen fármacos específicos, por ejemplo, mediadores directos: histamina; bradicinina, PAF, sustancia P o LTD4.

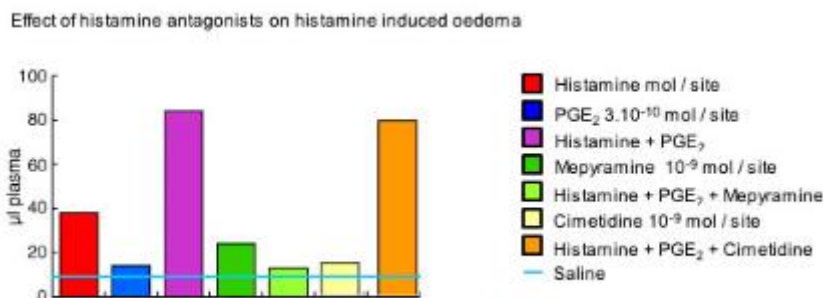
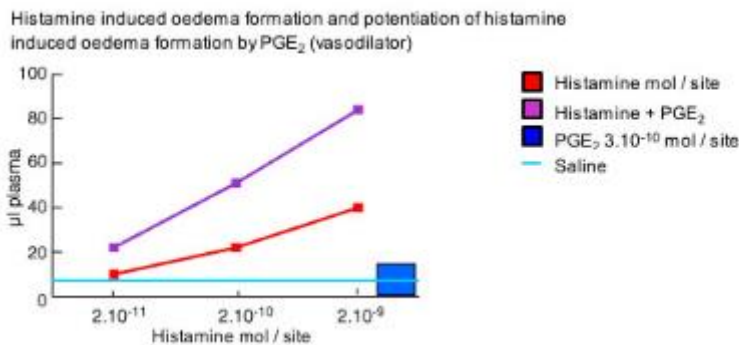
Una vez que haya seleccionado los parámetros se mostrarán los datos relacionados con ese experimento en forma de gráfico. Debe analizar esos datos y a continuación responder las preguntas de autoevaluación sobre ellos. Hay conjuntos de preguntas, que se relacionan con 4 grupos de experimentos: mediadores (directos), mediadores (dependientes de neutrófilos), agentes antiinflamatorios y conejo alérgico. Las respuestas a las preguntas se pueden averiguar interpretando los resultados de todos los experimentos dentro de cada grupo. (No es necesario que responda todas las preguntas a la vez, ya que el programa recuerda cuáles ha completado).

Realización de los experimentos

A) Conejo normal:

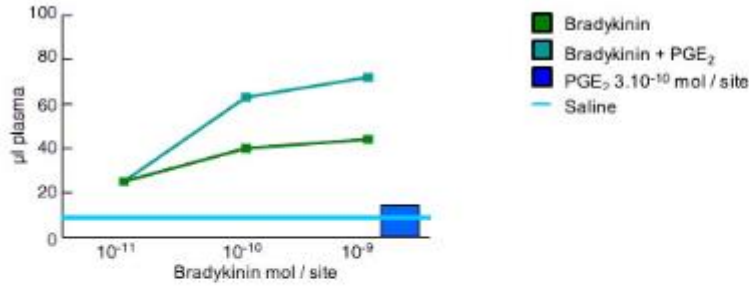
1) Mediadores (directos):

I. Histamina:

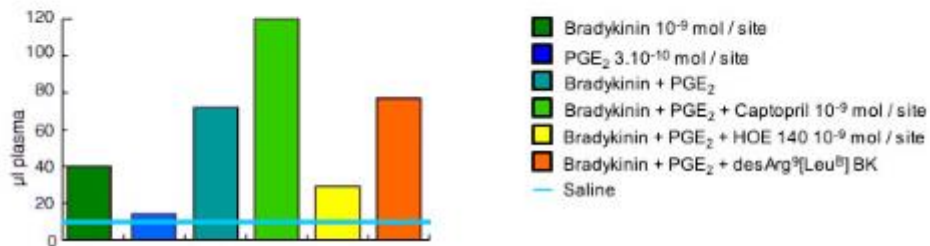


II. Bradikina:

Bradykinin induced oedema formation and potentiation of bradykinin induced oedema formation by PGE₂

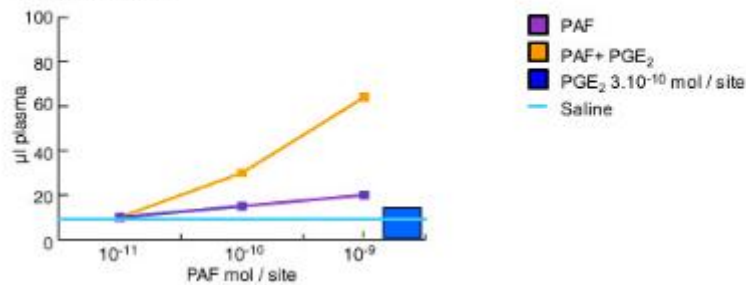


Effect of drugs on bradykinin induced oedema formation

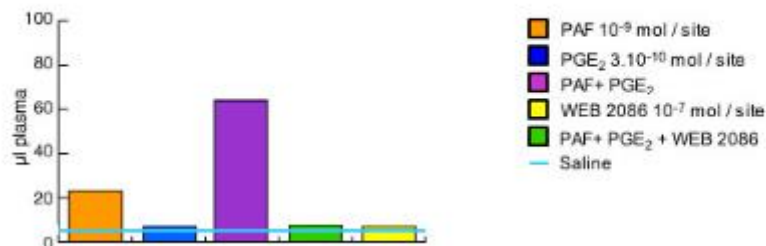


III. PAF:

PAF induced oedema formation and potentiation of PAF induced oedema formation by PGE₂ (vasodilator)

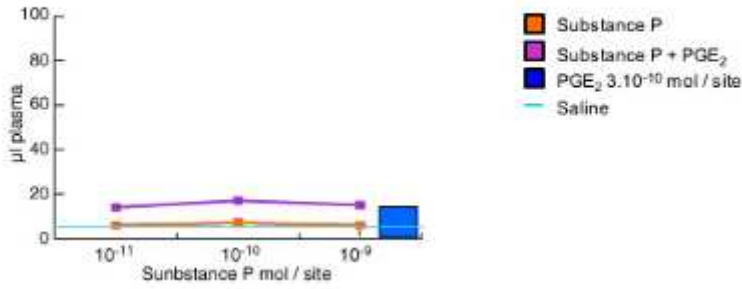


Effect of PAF antagonists



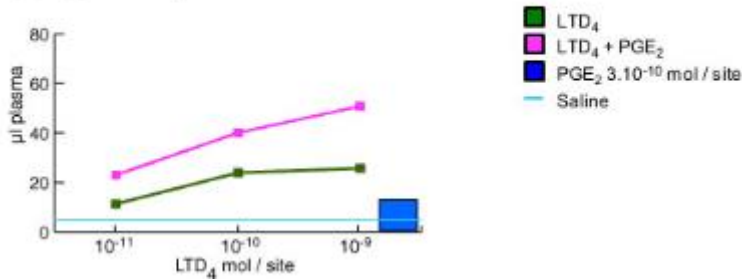
IV. Substancia P:

Substance P induced oedema formation and potentiation of Substance P induced oedema formation



V. LTD₄:

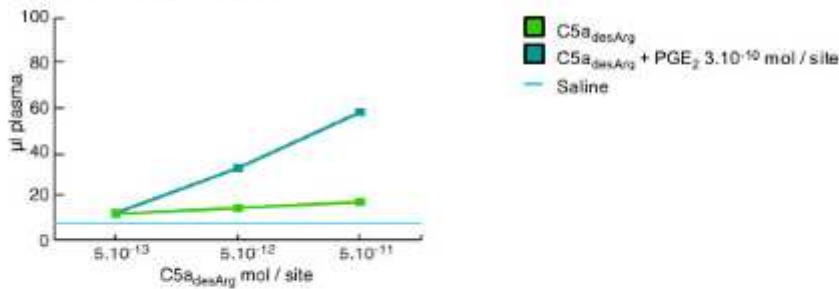
LTD₄ induced oedema formation and potentiation of LTD₄ induced oedema formation by PGE₂ (vasodilator)



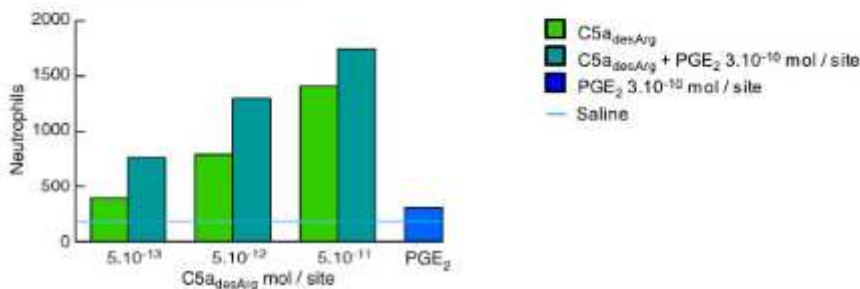
2) Mediadores (dependientes de neutrófilos):

I. C5a:

C5a_{desArg} induced oedema formation and potentiation of C5a_{desArg} induced oedema formation by PGE₂ (vasodilator)

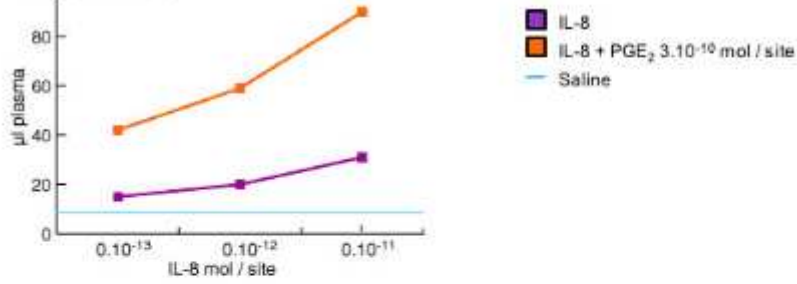


C5a_{desArg} induced neutrophil accumulation and its potentiation by PGE₂

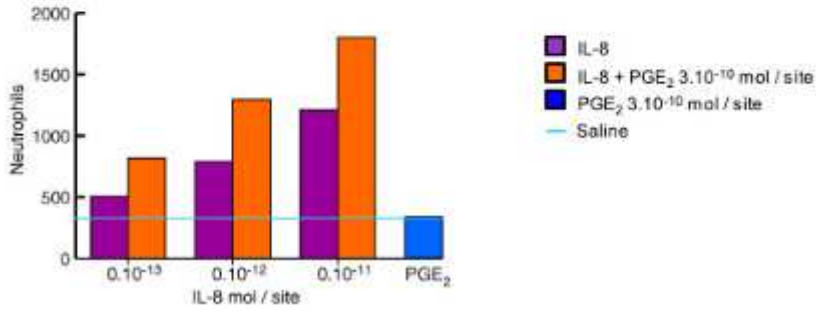


II. IL-8:

IL-8 induced oedema formation and potentiation of IL-8 induced oedema formation by PGE₂ (vasodilator)

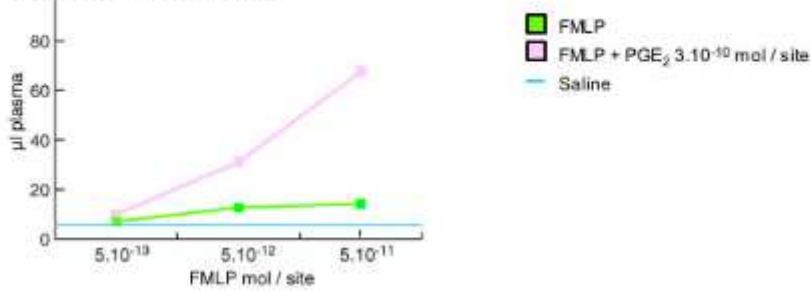


IL-8 induced neutrophil accumulation and its potentiation by PGE₂

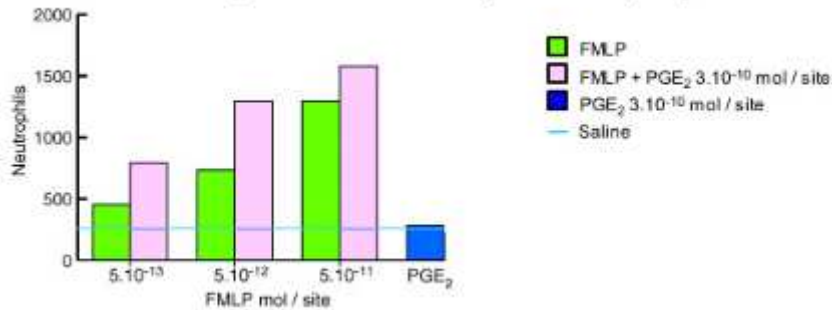


III. FMLP:

FMLP induced oedema formation and potentiation of FMLP induced oedema formation by PGE₂ (vasodilator)

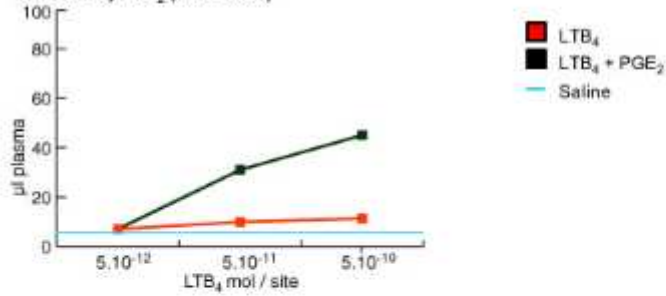


FMLP induced neutrophil accumulation and its potentiation by PGE₂

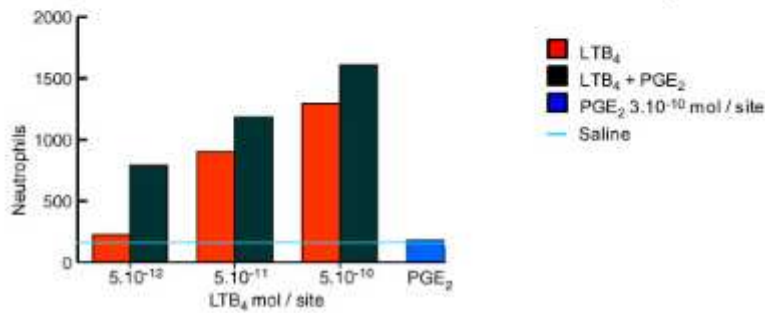


IV. LTB₄:

LTB₄ induced oedema formation and potentiation of LTB₄ induced oedema formation by PGE₂ (vasodilator)

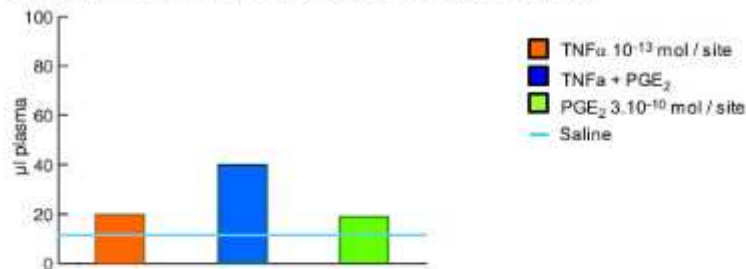


LTB₄ induced neutrophil accumulation and its potentiation by PGE₂

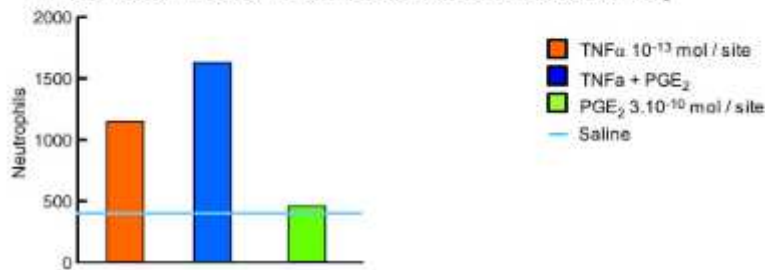


V. TNF:

TNF α effect on oedema formation and potentiation by PGE₂

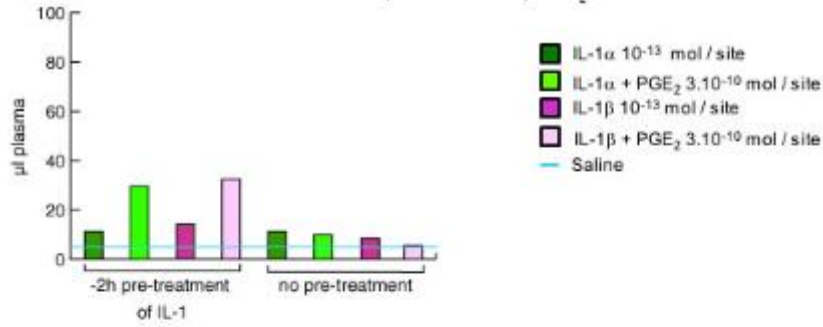


TNF α effect on neutrophil accumulation and potentiation by PGE₂

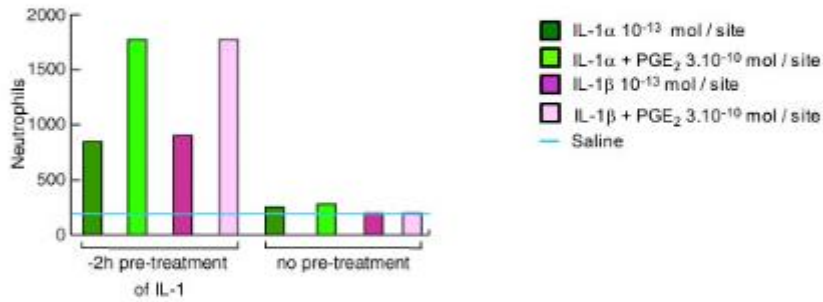


VI. IL-1:

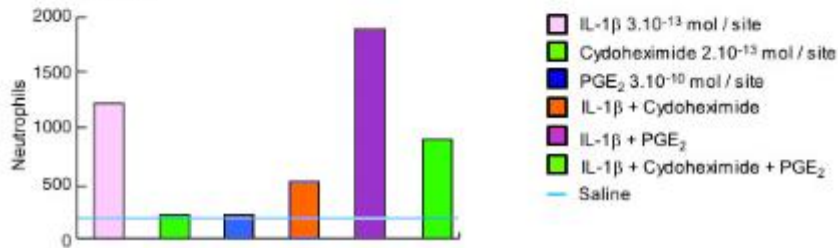
IL-1 effect on oedema formation and potentiation by PGE₂



IL-1 effect on neutrophil accumulation and potentiation by PGE₂

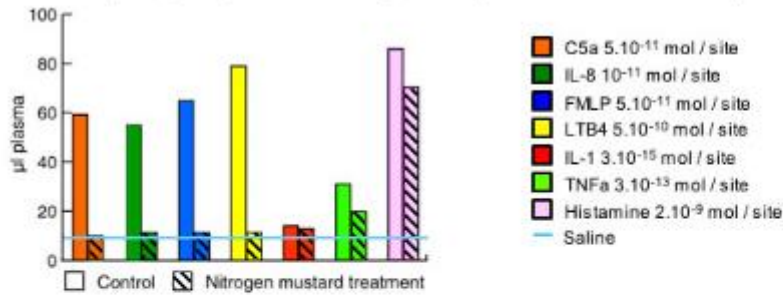


Effect of protein synthesis inhibitor (cyclohexamide) on IL-1β induced neutrophil accumulation

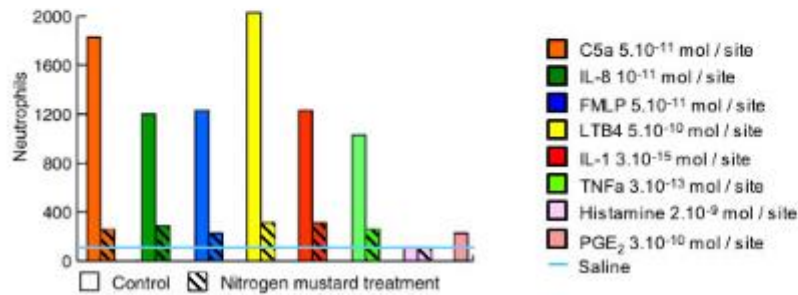


VII. Agotamiento de Neutrófilos:

Effect of neutrophil depletion (treatment with nitrogen mustard) on oedema formation induced by a variety of agents.

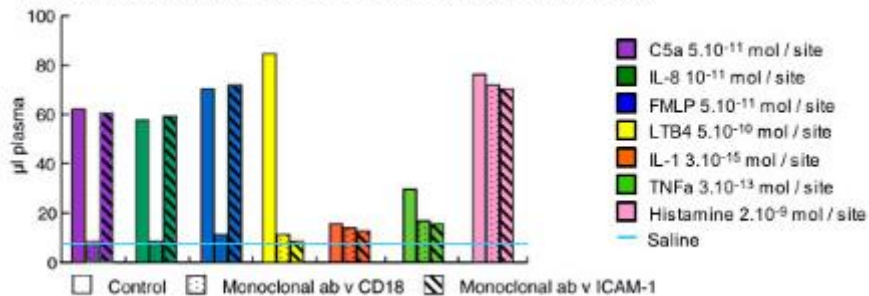


Effect of neutrophil depletion (treatment with nitrogen mustard) on neutrophil accumulation induced by a variety of agents

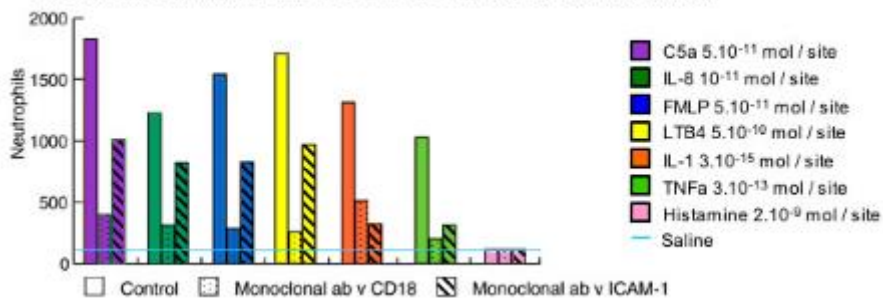


VIII. Inhibición de la adhesión:

Effect of adhesion inhibitors anti-CD18 and anti-ICAM-1 on oedema formation



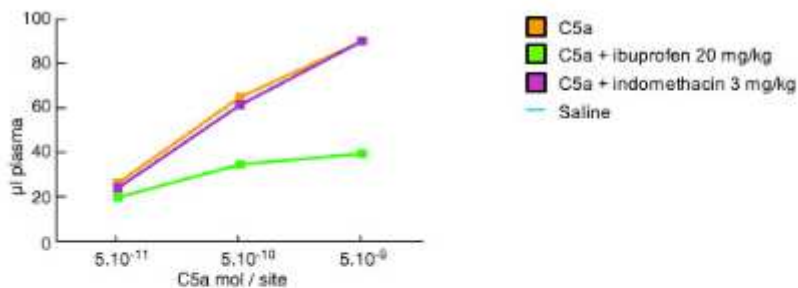
Effect of adhesion inhibitors anti-CD18 and anti-ICAM-1 on neutrophil accumulation



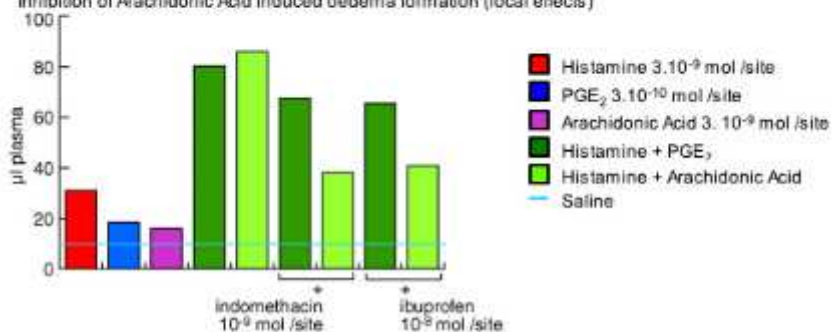
3) Agentes Antiinflamatorios:

I. AINEs:

The effect of NSAIDS on C5a induced oedema formation

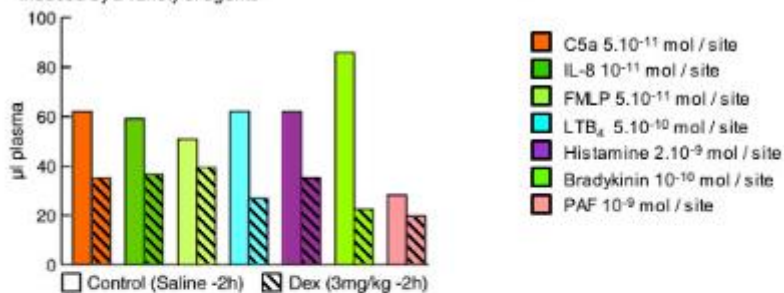


Inhibition of Arachidonic Acid induced oedema formation (local effects)

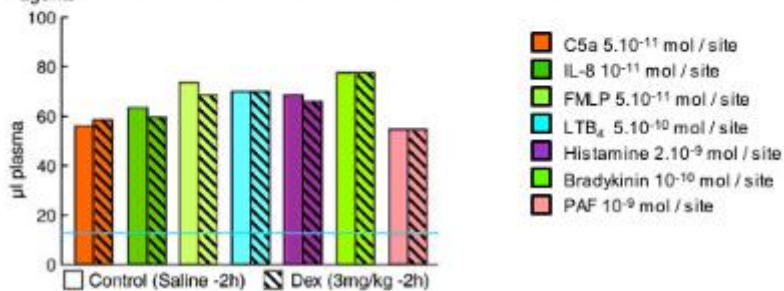


II. Corticoides (Esteroides):

Effect of pre-treatment with dexamethasone on oedema formation induced by a variety of agents



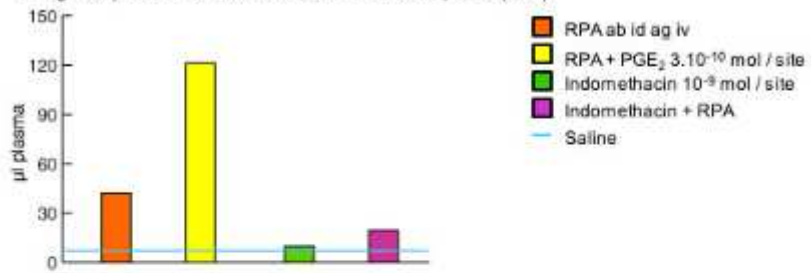
Effect of dexamethasone on oedema formation induced by a variety of agents



B) Conejo alérgico:

1) RPA:

Oedema formation in IgG sensitised rabbits treated with antigen to produce an allergic response – the Reverse Passive Arthus response (RPA).



Oedema formation in allergic rabbits (treated with IgG) pre-treated (3 days) with nitrogen mustard to cause neutrophil depletion.



2) PCA:

Oedema formation in rabbits pre-treated (72 hours) with IgE and then given antigen to produce an allergic response – Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA).



Glosario:

Agotamiento de neutrófilos

La mostaza nitrogenada actúa evitando la maduración de los neutrófilos en la médula ósea. Actúa de forma selectiva en el conejo, dejando niveles circulantes normales de otros tipos de células, mientras que los niveles circulantes de neutrófilos se reducen a aproximadamente un 5%. El metotrexato se usa a veces en ratas. También se utiliza antisuero anti-neutrófilos.

Antiinflamatorios esteroideos

Los efectos de los esteroides antiinflamatorios dependen de la síntesis de proteínas *de novo*, por lo que es necesario un tratamiento previo (2 h es lo ideal) antes de que se observe una inhibición del edema en el conejo. Los esteroides inhiben el metabolismo del ácido araquidónico mediante la producción de lipocortina, que inhibe la fosfolipasa A2. Se ha sugerido que se produce otra proteína, vasocortina, que actúa inhibiendo la formación de edemas. Los esteroides pueden suprimir la respuesta inflamatoria a través de una variedad de mecanismos. Tienen poco efecto sobre el componente vasodilatador de la inflamación, aunque inhiben la expresión de glicoproteínas adhesivas en las células endoteliales.

Antiinflamatorios no esteroideos, AINE

Existe una amplia gama de fármacos antiinflamatorios no esteroideos que actúan inhibiendo la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos mediante la inhibición de la enzima ciclooxigenasa. El ácido araquidónico se convierte en prostaglandinas vasodilatadoras cuando se inyecta en la piel del conejo y, por tanto, potencia la formación de edemas. En los experimentos mostrados, la indometacina y el ibuprofeno inhiben la capacidad del ácido araquidónico, pero no de la PGE₂ ya sintetizada, para potenciar la formación de edema. Los AINE también tienen otros efectos y se ha demostrado que el ibuprofeno, cuando se administra por vía sistémica en el conejo, puede inhibir la acumulación de neutrófilos.

Bradicinina

Fuente principal: a través de la activación de la vía de las cininas plasmáticas. Receptores: B₁ + B₂. El receptor B₁ es inducible (nótese que el edema es inhibido por el antagonista B₂ **HOE 140**, pero no por el antagonista B₁ **desArg9 [Leu8] Bk** en piel normal no inflamada). Papel patológico: en estudio, evidencia de papel en la alergia y el dolor. Metabolismo: el captopril, al inhibir la enzima convertidora de angiotensina (ECA), que es una quinasa, previene la pérdida de los dos aminoácidos terminales de la bradicinina. Esto prolonga la actividad de la bradicinina, que se observa en forma de una potenciación de la formación de edema.

C5a

Fuente principal: a través de la activación de la vía del complemento plasmático. Potente agente quimioatrayente (quimiotáctico) de neutrófilos. Papel patológico: en estudio, evidencia de presencia en enfermedades inflamatorias, incluida la artritis reumatoide.

Captopril

Un inhibidor, activo por vía oral, de la enzima convertidora de angiotensina (IECA). Reduce la presión arterial elevada al inhibir el sistema renina-angiotensina. También inhibe los efectos en la presión a la angiotensina I exógena. También potencia la presencia y, por lo tanto, la actividad de la bradicinina, que normalmente es metabolizada por la ECA.

Cimetidina

Medicamento antiulceroso que actúa inhibiendo la secreción de ácido gástrico basal y nocturna mediante la inhibición competitiva de la acción de la histamina en los receptores H₂ de la histamina en las células parietales del estómago. También bloquea el receptor H₂ en el tejido vascular.

Edema

La presencia de cantidades anormalmente grandes de líquido en los espacios de tejido intercelular del cuerpo, generalmente aplicado a la acumulación de excesivo líquido en los tejidos subcutáneos.

El edema puede ser localizado, por obstrucción venosa o linfática o por aumento de la permeabilidad vascular, o puede ser sistémico, originado por insuficiencia cardíaca o enfermedad renal.

El acúmulo de líquido de edema se designa según el lugar de éste, por ejemplo, ascitis (cavidad peritoneal), hidrotórax (cavidad pleural) e hidropericardio (saco pericárdico).

Factor de activación plaquetaria, PAF

Fuente principal: varios tipos de células inflamatorias. Receptores: Receptores específicos de PAF, efecto antagonizado por antagonistas de PAF como WEB 2086.

Factor de necrosis tumoral (TNF)

Fuente principal: células inflamatorias, especialmente macrófagos. Papel patológico: en estudio, evidencia de papel en la enfermedad inflamatoria crónica, mecanismos similares a los de IL-1.

Histamina

Fuente principal: mastocitos y basófilos. Receptores: H₁ (nótese que el edema es inhibido por el antagonista H₁ mepiramina, pero no por el antagonista H₂ cimetidina). Papel patológico: liberada de los mastocitos en la alergia dependiente de IgE; los antihistamínicos no sedantes (por ejemplo, terfenadina) son beneficiosos en la rinitis alérgica (fiebre del heno) y en afecciones cutáneas agudas (urticaria).

HOE 140

Un antagonista del receptor de bradicinina B₂. Inhibe la formación de edemas inducidos por bradicinina. Los antagonistas de cinina están en estudio para su uso en patologías alérgicas y dolorosas.

Inhibición de la síntesis de proteínas

El uso de agentes como la cicloheximida conduce a una inhibición de la síntesis de proteínas. Esto puede inhibir las acciones inflamatorias dependientes de la síntesis *de novo* de algunos mediadores como la interleucina-1.

Interleucina-1, (IL-1)

Fuente principal: células inflamatorias, especialmente macrófagos. Papel patológico: en estudio, evidencia de papel en la enfermedad inflamatoria crónica. Efectos dependientes de la síntesis de proteínas *de novo* y, por tanto, de inicio lento (1-2 h) e inhibidos por inhibidores de la síntesis de proteínas (p. Ej. Cicloheximida). Activa las células endoteliales para estimular la expresión de glicoproteínas (expresión de selectinas e ICAM).

Interleucina-8, (IL-8)

Fuente principal: células inflamatorias, que incluyen células endoteliales. Papel patológico: en estudio. Un potente quimioatrayente de neutrófilos.

Leucotrienos (LT) B₄, LTB₄

Fuente principal: células inflamatorias, especialmente neutrófilos. Papel patológico: en estudio. Un potente quimioatrayente de neutrófilos. Producto del metabolismo a través de la vía de la araquidonato-5-lipooxigenasa. Inhibición: los esteroides inducen la síntesis de lipocortina que actúa inhibiendo la fosfolipasa A₂. También hay disponibles inhibidores de la enzima 5-lipooxigenasa.

Leucotrienos (LT) C₄ y D₄, LTC₄ y LTD₄

Productos del metabolismo del ácido araquidónico a través de la vía de la 5-lipooxigenasa. Fuente principal: células inflamatorias, p. Ej. mastocitos y eosinófilos. Papel patológico: alergia, evidencia de papel en el asma. Potente broncoconstrictor. Inhibición: los esteroides inducen la síntesis de lipocortina que actúa inhibiendo la fosfolipasa A₂. También hay disponibles inhibidores de la enzima 5-lipooxigenasa que se utilizan actualmente para diversas formas de asma.

Mediador

Sustancia química que induce la actividad en un tejido excitable, como un nervio, un músculo, etc.

Mepiramina

Un antagonista del receptor H₂ de la histamina. Inhibe la formación de edemas inducidos por la histamina. No se usa clínicamente, pero es una herramienta experimental común.

Neutrófilos

Un granulocito, un glóbulo blanco que normalmente actúa para defender el cuerpo (por ejemplo, contra la invasión bacteriana). En la patología inflamatoria los neutrófilos pueden acumularse en grandes cantidades en los lugares inflamados y ejercer un efecto proinflamatorio.

N-formil-metionil-leucina-fenilalanina (FMLP)

Fuente principal: paredes celulares bacterianas. Es un potente agente quimiotáctico.

Prostaglandina, PGE

Un producto de la ciclooxigenasa del ácido araquidónico que aumenta el flujo sanguíneo en los lugares de inflamación. Esto, a su vez, puede conducir a una potenciación de la respuesta inflamatoria. También participa en el proceso del dolor.

Sustancia P (también, Péptido relacionado con la neuroquinina A)

Fuente principal: nervios sensoriales. Receptores: Neuroquinina NK-1, NK-2 y NK-3; Los receptores NK-1 en las células endoteliales median el aumento de la permeabilidad microvascular en la piel de rata, cobaya y humana, pero no en la piel de conejo. Por tanto, no se observa actividad de la sustancia P en la piel de conejo (NB 5-HT es igualmente débil en el conejo, pero potente en otras especies). La sustancia P también puede activar los mastocitos.

Papel patológico: en estudio, evidencia de estudios en animales de un rol en la inflamación y el dolor.

Día 4. Farmacología del aparato respiratorio.

Introducción

Los objetivos principales de este programa son: mostrar la farmacología básica de las vías respiratorias y los principios básicos de la regulación de la función pulmonar, así como de qué formas la función pulmonar puede verse influenciada por mediadores endógenos y agentes farmacológicos.

Objetivos de aprendizaje: al finalizar, se espera que los estudiantes sean capaces de:

- Describir la acción de varios agentes farmacológicos sobre la función pulmonar del conejillo de indias anestesiado.
- Explicar las acciones de estos agentes y relacionarlas con la regulación fisiológica de las vías respiratorias.
- A través de preguntas de autoevaluación, evaluar su: 1) capacidad para interpretar datos; 2) capacidad para aplicar los resultados a la comprensión de la función y regulación pulmonar; 3) conocimiento de los agentes farmacológicos utilizados.

Pretest

Antes de comenzar la práctica es posible probar los conocimientos previos mediante una serie de rápidas preguntas preliminares.

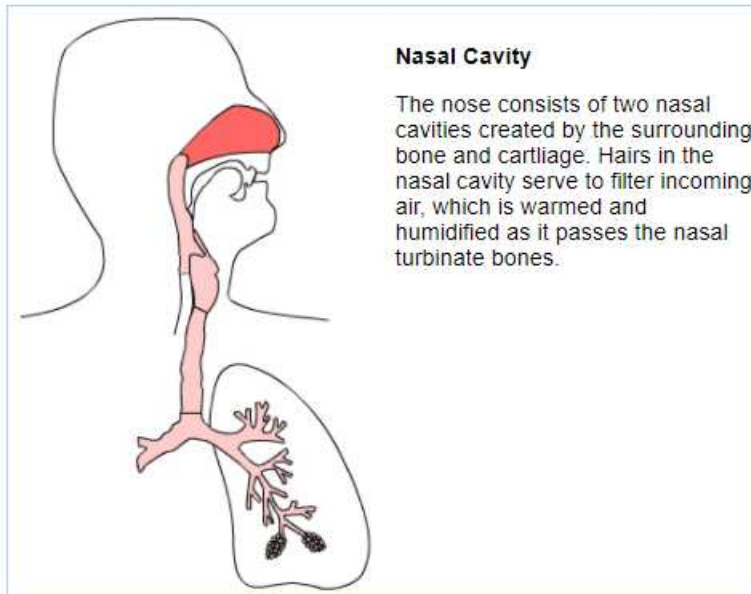
Tutorial

El siguiente tutorial proporcionará información básica sobre las vías respiratorias, que incluye:

- estructura de las vías respiratorias
- inervación nerviosa
- farmacología

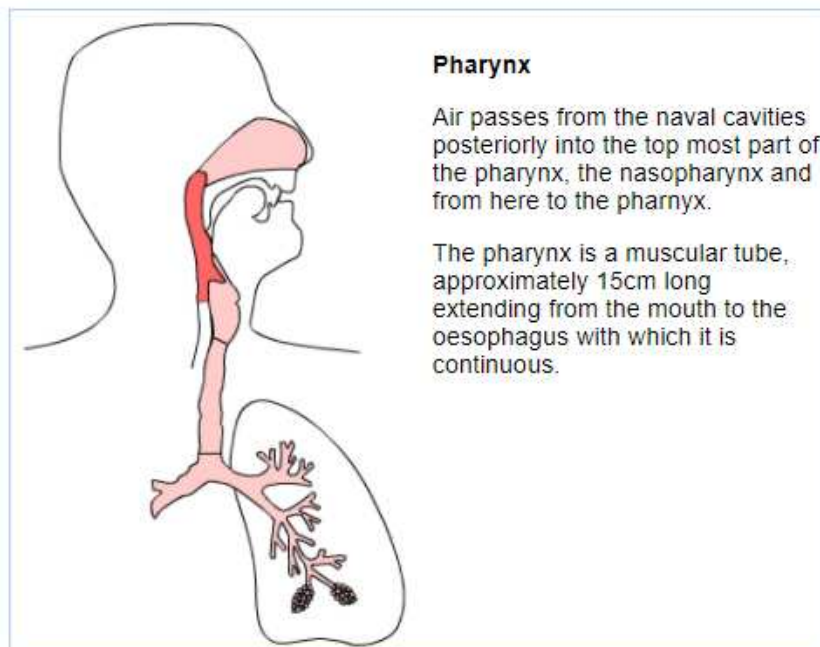
Introducción 2 – Estructura de las vías aéreas.

Cavidad Nasal



La nariz consta de dos cavidades nasales creadas por el hueso y el cartílago circundantes. Los pelos en la cavidad nasal sirven para filtrar el aire entrante, que se calienta y humedece a medida que pasa por los cornetes nasales.

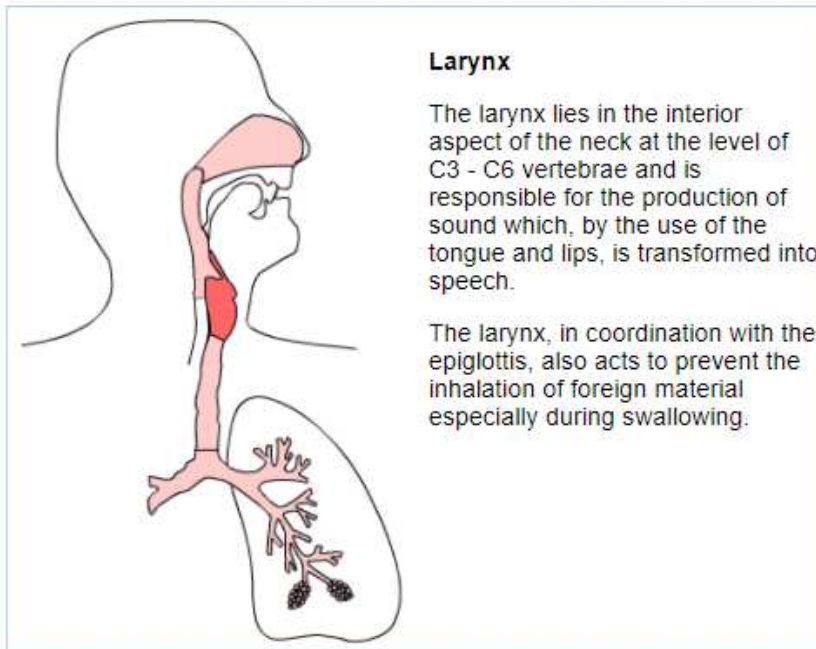
Faringe



El aire pasa de las cavidades nasales a la parte superior de la faringe, la nasofaringe y de aquí a la faringe propiamente dicha.

La faringe es un tubo muscular de aproximadamente 15 cm de largo que se extiende desde la boca hasta el esófago, con el que se continúa.

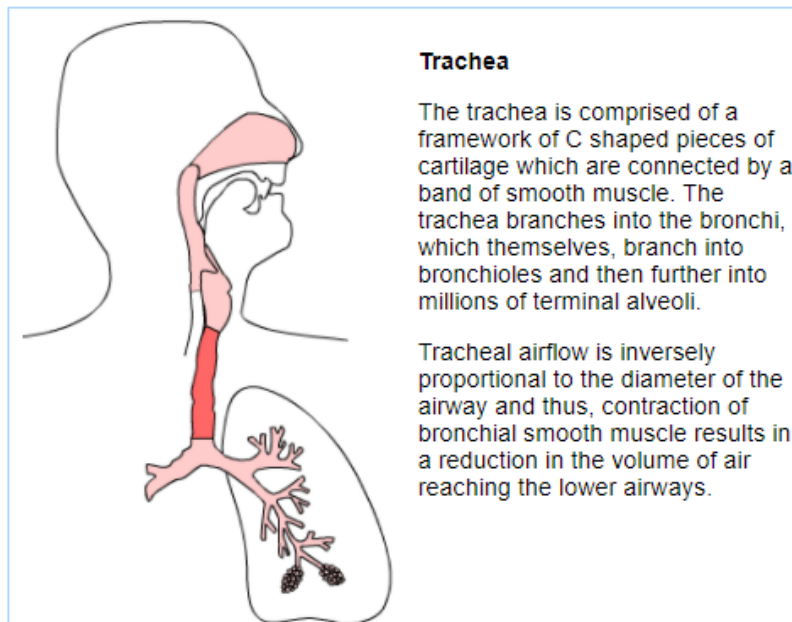
Laringe



La laringe se encuentra en la cara interior del cuello a la altura de las vértebras C3-C6 y es responsable de la producción del sonido que, mediante el uso de la lengua y los labios, se transforma en el habla.

La laringe, en coordinación con la epiglotis, también actúa para prevenir la inhalación de material extraño, especialmente durante la deglución.

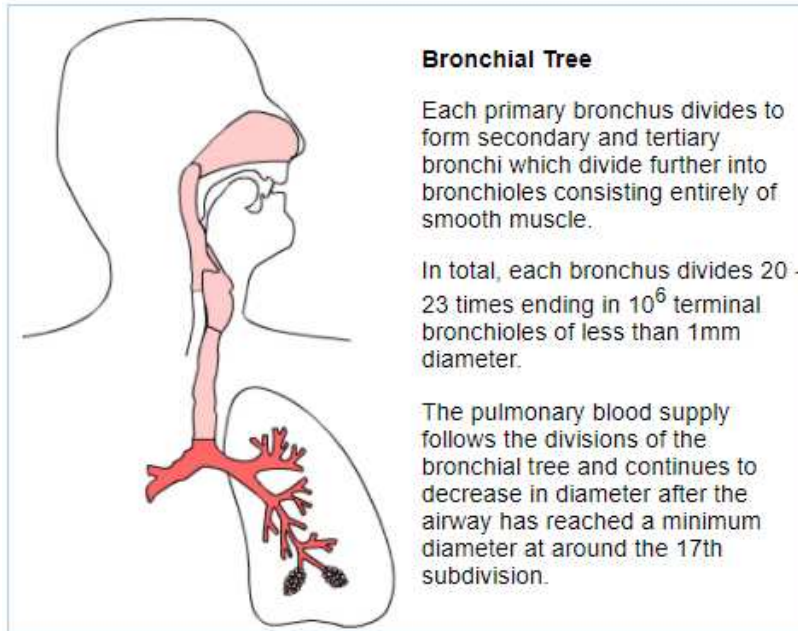
Tráquea



La tráquea se compone de una estructura de piezas de cartílago en forma de C que están unidas por una banda de músculo liso. La tráquea se ramifica hacia los bronquios, que a su vez se ramifican en bronquiolos y luego en millones de alveolos terminales.

El flujo de aire traqueal es inversamente proporcional al diámetro de la vía aérea y, por tanto, la contracción del músculo liso bronquial da como resultado una reducción del volumen de aire que llega a las vías aéreas inferiores.

Árbol bronquial



Cada bronquio primario se divide para formar bronquios secundarios y terciarios que se dividen en bronquiolos, formados totalmente por músculo liso.

En total, cada bronquio se divide de 20 a 23 veces y termina en 10^6 bronquiolos terminales de menos de 1 mm de diámetro.

El suministro de sangre pulmonar sigue las divisiones del árbol bronquial y continúa disminuyendo en diámetro después de que la vía aérea ha alcanzado un diámetro mínimo alrededor de la subdivisión 17.

Introducción 3 - Control de las vías aéreas

El tono del músculo liso bronquial, que afecta la resistencia de las vías respiratorias, está controlado por nervios autónomos. Estos nervios envían información al SNC (Sensorial o Aferente) o desde el SNC a los órganos efectores (Eferente).

1. Nervios aferentes

Varios tipos de terminaciones nerviosas aferentes están presentes en las paredes de las vías respiratorias, cuya función es enviar información sensorial a través del nervio vago (sistema nervioso autónomo parasimpático) para controlar la respiración y el tono bronquial (la resistencia de las vías aéreas). Éstas incluyen:

- Receptores de adaptación lenta (estiramiento): Se encuentra principalmente en el músculo liso de los bronquios y son estimulados por la distensión de las vías aéreas.

- Receptores de adaptación rápida (o de la irritación): Se encuentran debajo del epitelio y entre las células epiteliales. Son activados por estímulos mecánicos y químicos y causan broncoconstricción por un aumento reflejo del tono vagal.
- No mielinizados o amielínicos (Fibra C): Son terminaciones nerviosas que se encuentran en el epitelio bronquial junto con los receptores de la irritación. Son estimuladas por capsaicina, bradicinina, histamina y ciertas prostaglandinas.
- Receptores J (receptores de desinflado): Se encuentran entre los capilares pulmonares y las paredes alveolares y se activan por desinflado del pulmón, dando como resultado una respiración rápida y superficial.

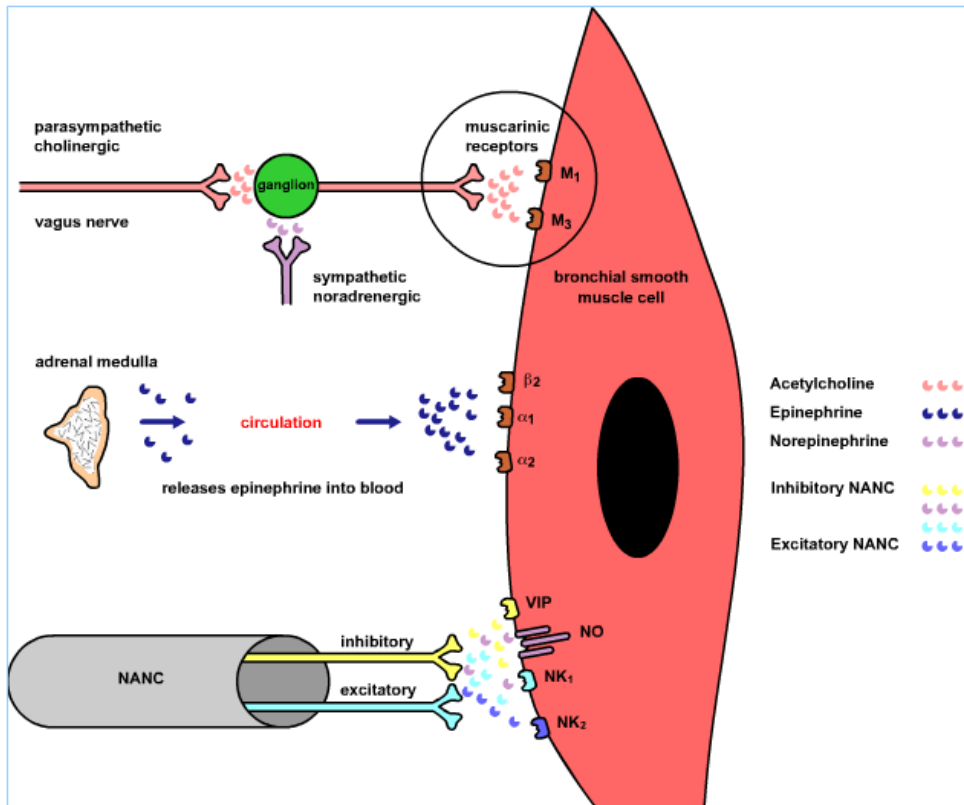
2. Nervios eferentes

La principal inervación nerviosa de los pulmones proviene del sistema nervioso parasimpático a través del vago. Los ganglios parasimpáticos están localizados en el interior de las paredes de los bronquios y bronquiolos.

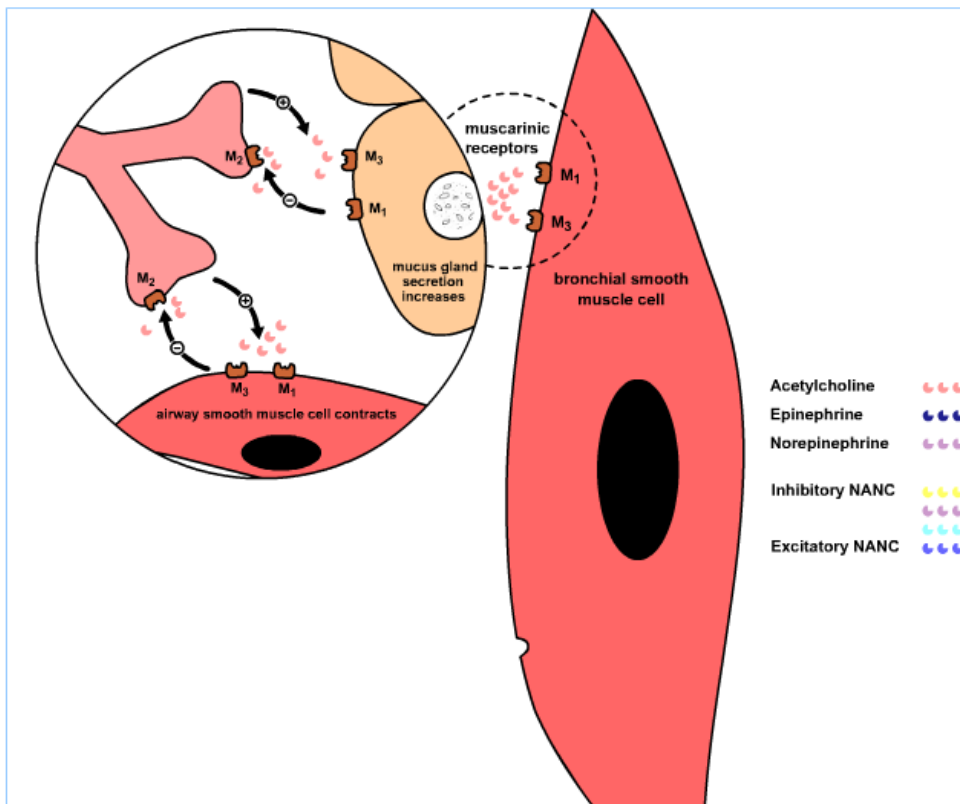
Las fibras posganglionares inervan el músculo liso bronquial, el músculo liso vascular y las glándulas submucosas. La acetilcolina (ACh), liberada desde las terminales nerviosas parasimpáticas, actúa a través de los receptores muscarínicos localizados en las vías respiratorias.

No hay inervación simpática directa del músculo liso bronquial, aunque existe control de la vasculatura.

También hay inervación no adrenérgica y no colinérgica (NANC) de las vías respiratorias, cuyos efectos, como su nombre indica, están mediados por sustancias diferentes de la acetilcolina o la adrenalina.



Haga clic en el círculo del diagrama. Se muestra la existencia de receptores muscarínicos M2 presinápticos, que ejercen un efecto inhibitorio de la liberación neuronal de Ach (mecanismo de feedback negativo).



Introducción 4 - I) Sistema Nervioso Parasimpático (SNP): Nervio vago

La acetilcolina (ACh) liberada por las terminales nerviosas difunde a través de la sinapsis y actúa sobre los receptores muscarínicos:

M1

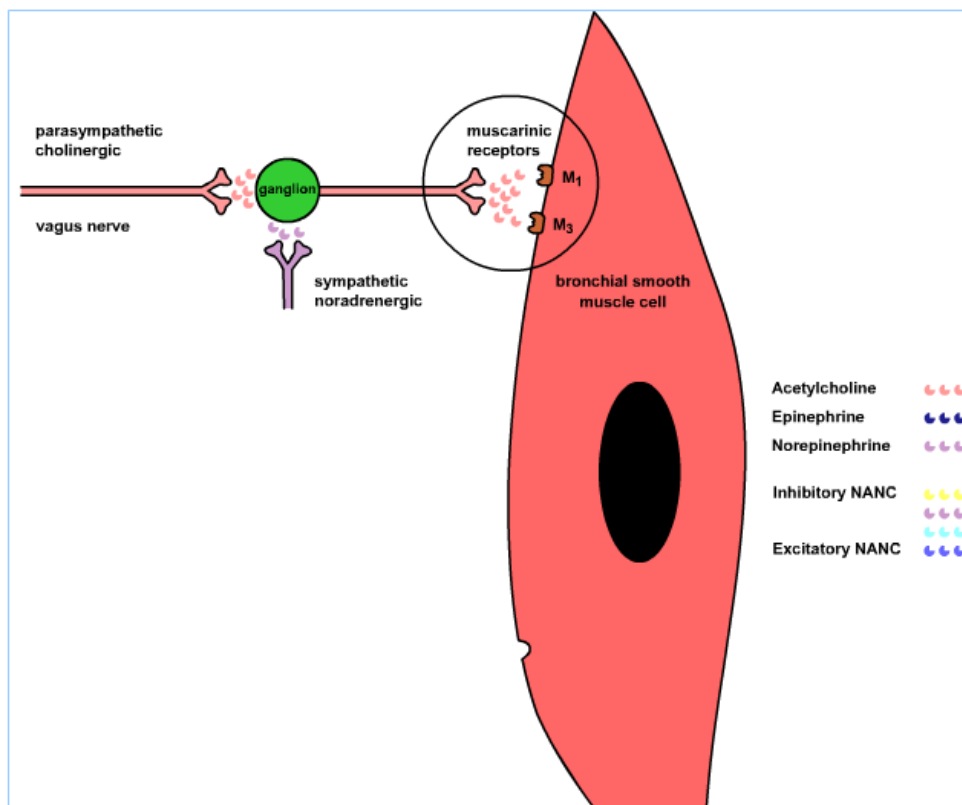
- Se encuentra en las neuronas del SNC, en las neuronas postsinápticas simpáticas y en algunos lugares de forma presináptica.
- Su activación origina: formación de inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG), así como aumento de la concentración de calcio intracelular.

M2

- Se encuentra en el miocardio y músculo liso. Son “autorreceptores”, localizados presinápticamente en el SN, que limitan la liberación de acetilcolina desde la terminación nerviosa mediante un mecanismo de retroalimentación (feedback) negativo.
- Su activación origina: la apertura de canales de potasio y la inhibición de la adenilato ciclasa.

M3

- Presente en músculo liso, endotelio y glándulas exocrinas.
- Su activación origina: la apertura de canales de sodio y potasio y la despolarización celular.

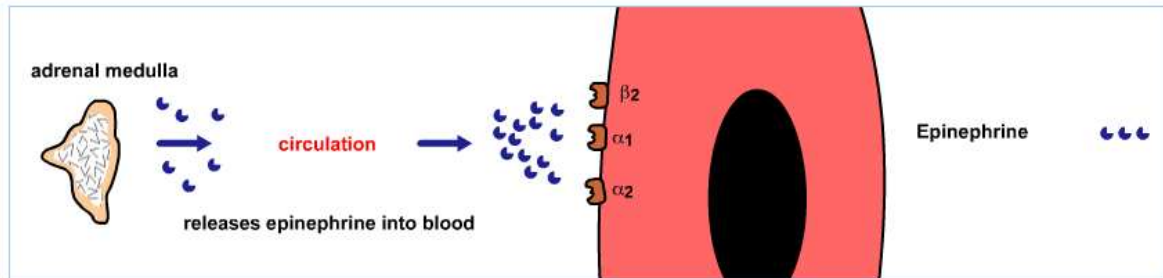


Introducción 5 - II) Sistema nervioso simpático (SNS)

En los pulmones, las fibras simpáticas inervan los vasos sanguíneos (provocando vasoconstricción) y las glándulas (inhibiendo las secreciones).

Sin embargo, en los seres humanos, el sistema nervioso simpático proporciona poca o ninguna innervación directa al músculo liso de las vías respiratorias. Los efectos simpáticos se deben a la acción de la adrenalina circulante (liberada desde la médula suprarrenal) sobre los receptores adrenérgicos β , concretamente los β_2 , causando relajación de la musculatura lisa bronquial.

Sin embargo, las fibras simpáticas ejercen un control indirecto sobre las vías respiratorias al inervar a los ganglios parasimpáticos.

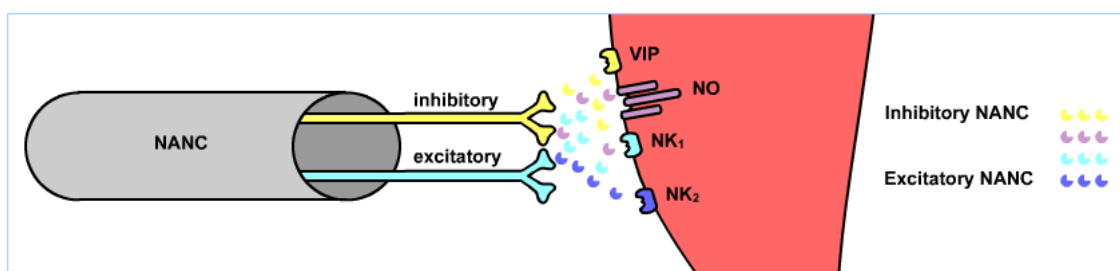


Introducción 6 - III) Nervios No adrenérgicos No colinérgicos (NANC)

Los nervios NANC tienen dos componentes: excitatorio (eNANC) e inhibitorio (iNANC).

Los neurotransmisores liberados por las neuronas eNANC incluyen la sustancia P (SP) y la neuroquinina A (NKA). Actúan a través de los receptores de neuroquinina, produciendo broncoconstricción. En algunas especies, además, producen degranulación de los mastocitos. Hay 2 tipos de receptores de neuroquinina: NK_1 y NK_2 . La NKA actúa a través de los receptores NK_2 y la SP a través de los receptores NK_1 .

El principal neurotransmisor de iNANC es el óxido nítrico (NO), aunque también contribuye el péptido vasoactivo intestinal (VIP). El NO provoca la relajación del músculo liso mediante la activación de la guanilato ciclasa. No se utilizan clínicamente fármacos para enfermedades respiratorias que actúen de forma similar a la activación de las fibras iNANC, ya que estas vías, cuando se activan, también producen una importante relajación del músculo liso vascular, lo que origina la hipotensión.



Introducción 7 – Substancias con un efecto directo en el músculo liso bronquial

Histamina

La histamina se forma por descarboxilación del aminoácido L-histidina mediante una reacción catalizada por la enzima histidina descarboxilasa. La mayor parte de la histamina tisular se

encuentra en los mastocitos del tejido conectivo (CTMC), donde se encuentra unida a la heparina. También se encuentra algo de histamina en el equivalente circulante del mastocito, el basófilo, donde se une al sulfato de condroitina. La histamina no procedente de los mastocitos se encuentra en el cerebro, donde actúa como neurotransmisor y puede desempeñar un papel en el control neuroendocrino, la regulación cardiovascular, la termorregulación y la excitación sexual. La histamina ejerce sus efectos actuando sobre los receptores H₁, H₂ y H₃ (todos receptores con 7 segmentos transmembrana).

Receptores H₁

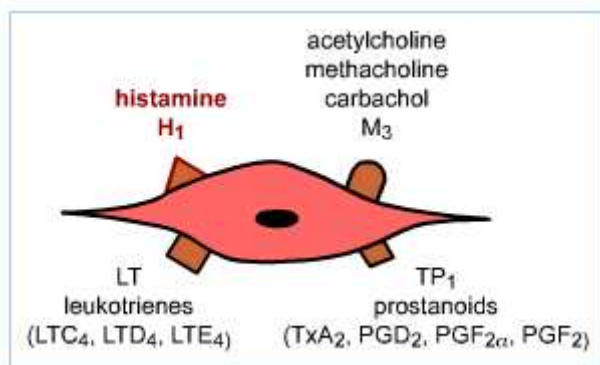
- Se encuentran en las células endoteliales y en el músculo liso.
- Su activación origina: un aumento de la hidrólisis del fosoinositol y un aumento del calcio intracelular.

Receptores H₂

- Se encuentran en la mucosa gástrica, las células del músculo cardíaco y algunas células del sistema inmune.
- Su activación origina: un aumento del AMPc intracelular.

Receptores H₃

- Se encuentran en el SNC
- Su activación origina: una disminución de la liberación de histamina en las neuronas histaminérgicas, probablemente por una disminución de la entrada de calcio.

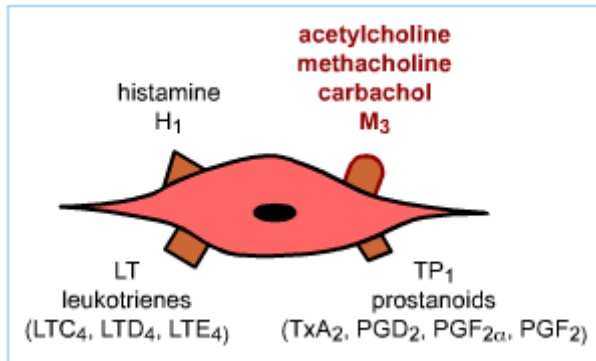


Introducción 8

Acetilcolina

La acetilcolina (ACh) es el neurotransmisor liberado por las terminaciones nerviosas colinérgicas. Se sintetiza en el citoplasma, a partir de acetil-Co-A y colina (transportada desde el medio extracelular por un portador de membrana dependiente de sodio) por la colina acetiltransferasa. Luego se transporta, mediante un antiporte dependiente de protones, desde el citoplasma a vesículas donde se almacenará. La fusión de estas vesículas con la membrana plasmática provoca la liberación de ACh en la hendidura sináptica, proceso que depende del calcio extracelular. En el músculo liso, los efectos de la ACh están mediados por la acción de los receptores muscarínicos (M₁, M₂ y fundamentalmente M₃) (como se describió en la sección "Sistema Nervioso Parasimpático (SNP): Nervio vago").

Metacolina y carbachol: son sustancias que reproducen las acciones de la ACh liberada por las terminaciones del nervio vago, es decir, son análogos funcionales de ésta.



Introducción 9

Leucotrienos y Prostanoides

Los leucotrienos y los prostanoideos se forman a partir del ácido araquidónico (liberado desde los fosfolípidos de la membrana plasmática por la acción de la Fosfolipasa A₂). La generación de subsiguientes compuestos (ya sean prostaglandinas, leucotrienos o tromboxanos) dependerá de la enzima presente en el tejido que metabolice el ácido araquidónico. Estos compuestos tienen diferentes efectos sobre las vías respiratorias como se verá a continuación.

Leucotrienos

Los leucotrienos se sintetizan a partir del ácido araquidónico por la enzima 5-lipooxigenasa (5-O) y se nombran alfabéticamente de la A a la F. El LTA₄ se convierte en LTB₄, que es el precursor de los cisteinil leucotrienos LTC₄, LTD₄ y LTE₄ (llamados así porque todos contienen en su estructura el aminoácido cisteína). El LTB₄ (un potente quimiotáctico) es producido principalmente por los neutrófilos. Los cisteinil leucotrienos son producidos por los eosinófilos, monocitos, macrófagos, mastocitos y basófilos. Algunos tejidos, incluidos el pulmón, bazo, cerebro y corazón también producen estos mediadores.

El LTB₄ actúa a través de su propio receptor y los cisteinil leucotrienos actúan a través de cysLT₁ o cysLT₂, aunque el rango de potencia de estos receptores difiere según el tejido y la especie.

El LTC₄ y el LTD₄ son potentes broncoconstrictores. También aumentan la permeabilidad microvascular, el exudado de plasma y la secreción de moco. Pero no producen vasodilatación. Además, a nivel cardíaco reducen la contractilidad del miocardio y el flujo sanguíneo coronario, provocando disfunción cardíaca. El LTE₄ es menos potente que LTC₄ y LTD₄, pero sus efectos son más duraderos.

Aunque tras la exposición de tejido pulmonar sensibilizado con alérgenos (test de antígenos) se libera una mezcla compleja de autacoides que incluyen sustancias broncodilatadoras (prostaglandina (PG) E₂) y broncoconstrictoras (PGF_{2α}, tromboxano (Tx) A₂ y LTC₄), parecen predominar los efectos broncoconstrictores de los peptidoleucotrienos. La broncoconstricción es de larga duración debido al lento metabolismo de los leucotrienos en el tejido pulmonar.

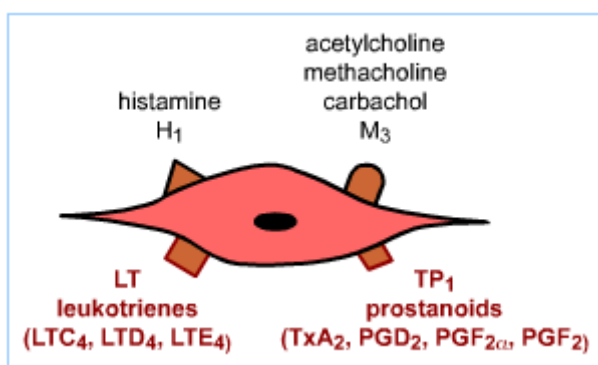
Introducción 10

Prostanoides

Los prostanoides, que se liberan durante la inflamación, se forman a partir del ácido araquidónico por la enzima ciclooxygenasa (COX), que está unida al retículo endoplásmico y, por lo tanto, se encuentra en casi todas las células del cuerpo humano. Existen 2 isoformas de ciclooxygenasa: La COX-1 se encuentra en la mayoría de las células y se expresa de manera constitutiva. Se cree que los prostanoides producidos a través de esta vía están involucrados en la homeostasis. La COX-2 es una enzima inducible y se encuentra en células inflamatorias. Los inhibidores selectivos de COX-2 (p. ej., celecoxib) reducen los efectos no deseados de la inhibición de COX-1 (como úlceras gástricas) que se aparecen con el uso de AINE no selectivos (como el ácido acetil salicílico). Mientras que los efectos secundarios en el estómago están claramente relacionados con la inhibición de COX-1, los que afectan al riñón son más complejos, ya que en algunas áreas existen pequeñas cantidades de COX-2 constitutiva y los AINEs causan retención de sodio.

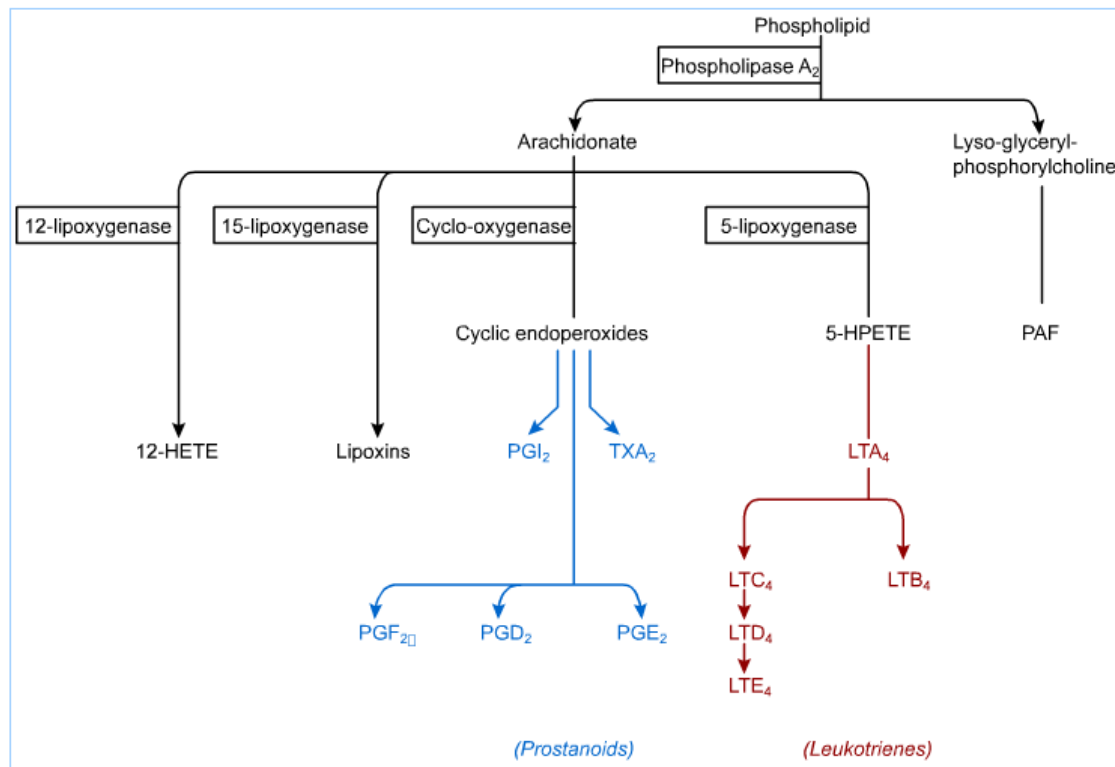
El producto final del metabolismo del ácido araquidónico difiere entre los tipos de células. En los macrófagos la activación de esta vía produce prostaglandina (PG)E₂, mientras que el producto principal de las plaquetas es el tromboxano (Tx)A₂. El endotelio produce PGI₂ (prostaciclina) y los mastocitos PGD₂.

Se han clasificado cinco subtipos de receptores de prostanoides, uno para cada uno de los cinco prostanoides: PGD₂ (receptor DP), PGF₂ (receptor FP), PGI₂ (receptor IP), TxA₂ (receptor TP) y PGE₂ (receptor EP). Los receptores EP se han subdividido además en EP₁, EP₂, EP₃ y EP₄. Por tanto, la PGE₂ tiene efectos mixtos sobre el músculo liso bronquial, provocando tanto contracción como relajación a través de la activación de los receptores EP₁ y EP₂. El TxA₂, PGD₂, PGF_{2a}, causan broncoconstricción a través de varios receptores, incluido el TP₁.



A continuación puede observarse un esquema de su síntesis.

Introducción 11



Introducción 12

5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina)

La 5-HT se forma a partir del aminoácido L-triptófano mediante la triptófano hidroxilasa. La amina libre se almacena o inactiva rápidamente mediante oxidación catalizada por la monoamino oxidasa (MAO). En los mamíferos, más del 90% de 5-HT se encuentra en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal. En la sangre, la 5-HT se encuentra en las plaquetas, que la concentran mediante un mecanismo de transporte activo. Además, la 5-HT produce agregación plaquetaria. En el SNC, la 5-HT se encuentra en los núcleos Raphe del cerebro. En roedores (pero no en humanos), la 5-HT también está presente en los mastocitos.

La 5-HT se encuentra a menudo colocalizada con otras sustancias, como la sustancia P, el Péptido vasoactivo intestinal (VIP) o la somatostatina. Se cree que esta cotransmisión ejerce efectos fisiológicos importantes.

Hay 3 tipos de receptor 5-HT, 5-HT₁, 5-HT₂ y 5-HT₃. Los receptores 5-HT₁ se subdividen en A, B, C y D. Los receptores 5-HT₁ se encuentran en el cerebro, mientras que los receptores 5-HT₂ se encuentran en las plaquetas y el músculo liso. La metisergida y la ciproheptadina son ejemplos de antagonistas del receptor 5-HT₂. Los receptores 5-HT₃ se encuentran en neuronas sensoriales nociceptivas del sistema nervioso periférico. La 5-HT provoca vasoconstricción, excepto en el corazón y el músculo esquelético, donde dilata los vasos sanguíneos, dependiendo esta respuesta en parte de las células endoteliales vasculares. En la microcirculación, la 5-HT dilata las arteriolas y contrae las vénulas, por lo que aumenta la

presión en los capilares de conexión y se produce exudación de plasma. La inyección intravenosa de 5-HT provoca, primero, un aumento y después un descenso en la presión arterial, que se debe a la constricción inicial de los vasos sanguíneos mayores, seguida de vasodilatación arteriolar y la pérdida de líquido. La inhibición de la liberación de noradrenalina de las terminaciones simpáticas también contribuye al efecto vasodilatador de la 5-HT.

Introducción 13

Substancias que tienen un efecto indirecto sobre el músculo liso bronquial.

Bombesina

La bombesina es un potente broncoconstrictor en cobayas *in vivo*, pero no tiene efecto sobre las tiras pulmonares *in vitro*, lo que sugiere que su acción es indirecta. Su actividad no se ve afectada por antihistamínicos, inhibidores de COX, inhibidores de 5-LO, antagonistas de PAF o antagonistas de serotonina, por lo que la liberación de mediadores no es su mecanismo de acción. Las respuestas inducidas por bombesina tampoco se ven afectadas por capsaicina o antagonistas colinérgicos, lo que sugiere que tampoco están involucrados mecanismos neuronales. Su efecto es inhibido por un antagonista del receptor de bombesina, lo que indica la participación de este receptor en su mecanismo. Además, sus efectos son inhibidos por la isoprenalina, lo que indica que la sustancia liberada por la bombesina es un espasmógeno. En los experimentos mostrados en este programa se usa bombesina ya que proporciona una broncoconstricción muy duradera frente a la cual se pueden comprobar los efectos de los fármacos broncodilatadores.

Substancia P

La sustancia P se libera de las terminaciones nerviosas sensoriales por un reflejo axónico. Produce sus efectos actuando sobre los receptores de neuroquinina 1. La sustancia P es un potente vasodilatador de acción directa sobre el músculo liso arteriolar. También provoca un aumento de la permeabilidad vascular, induce la secreción mucosa y la degranulación de los mastocitos.

Introducción 14

Bradicinina

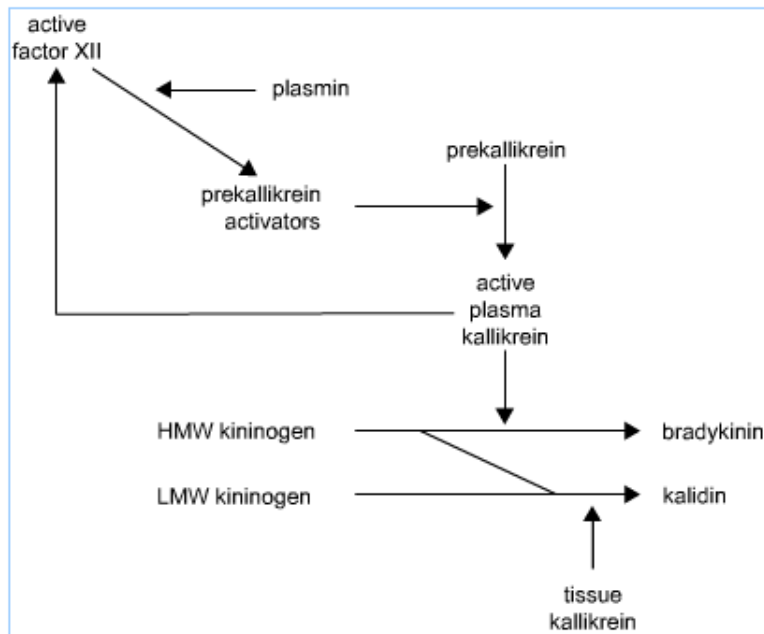
La bradicinina endógena es un nonapéptido. Junto con la calidina, se produce por escisión de las globulinas α_2 , que son sintetizadas por el hígado y circulan en el plasma como cininógenos (cininógeno de alto peso molecular (HMW) y cininógeno de bajo peso molecular (LMW)). Las proteasas llamadas calicreínas liberan los péptidos de sus precursores. Hay dos tipos de calicreínas: calicreína plasmática y calicreína tisular. La calicreína plasmática inactiva (precalicreína) es activada por el factor de Hageman para producir calicreína, que actúa específicamente sobre los cininógenos HMW para producir bradicinina (Ver diagrama en la siguiente página).

La bradicinina ejerce sus efectos a través de los receptores B_1 y B_2 . Los receptores B_1 se encuentran en el músculo liso vascular y aumentan por la inflamación. En la mayoría de los

tejidos son menos comunes que los receptores B₂. La activación del receptor B₂ activa las proteínas G, la PLA₂ y la PLC.

La bradicinina contrae el músculo liso uterino y bronquial (produciendo una contracción lenta y sostenida), pero relaja el músculo liso vascular, lo que provoca una disminución de la presión arterial. La inyección local de bradicinina produce vasodilatación arteriolar y un aumento en la permeabilidad de las vénulas poscapilares. El efecto vasodilatador es, en la mayoría de los casos, dependiente del endotelio. Sin embargo, bradicinina también activa la fosfolipasa A₂, produciéndose ácido araquidónico y posteriormente prostaglandinas, que también contribuyen a su efecto.

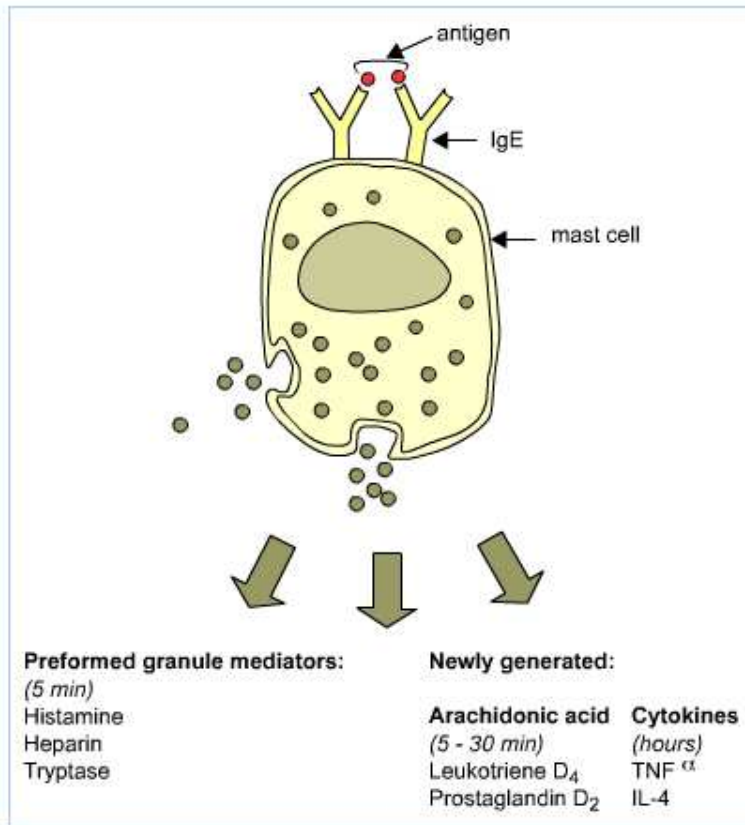
La inhalación o inyección intravenosa de cininas causa broncoespasmo en pacientes asmáticos, pero no en personas sanas. El broncoespasmo se inhibe mediante anticolinérgicos, pero no con antihistamínicos o inhibidores de la COX, lo que sugiere que sus efectos están mediados por neuronas. Una confirmación de esta hipótesis es que la inhalación repetida de bradicinina da como resultado una respuesta disminuida al 5'-AMP.



Introducción 15 – Patofisiología de las vías aéreas

Respuesta alérgica

Muchos casos de asma están causados por una respuesta alérgica a alérgenos como el ácaro del polvo doméstico o la caspa de los animales. Durante esta respuesta inflamatoria se liberan muchas sustancias con un efecto directo sobre el músculo liso bronquial.



La inhalación de alérgenos específicos hace que las células B produzcan IgE específica para el antígeno, que se une a receptores de IgE de alta afinidad (FceRI) en los mastocitos. La activación de los mastocitos se produce debido a la unión del antígeno específico a la IgE unida al receptor. El entrecruzamiento del receptor de IgE (que se unan dos de ellos) es necesario para la activación celular y, por tanto, solo antígenos bivalentes o polivalentes puede provocar la degranulación. El entrecruzamiento de los receptores de IgE de alta afinidad provoca la activación de la tirosin quinasa, lo que da como resultado la formación de inositol trifosfato (IP₃) e inositol tetrafosfato (IP₄) mediante la activación de la PLC. El IP₃ provoca la liberación de calcio del retículo endoplásmico. La PLC provoca la hidrólisis del fosfoinositol difosfato (PIP₂) para formar diacilglicerol (DAG), que activa la proteína quinasa C (PKC) lo que finalmente conduce a la fosforilación de diversas proteínas. Los gránulos se fusionan con la membrana plasmática y así se liberan los mediadores inflamatorios, como histamina, leucotrienos, citocinas y triptasa.

Introducción 16 - Fisiopatología de la vía aérea

Asma bronquial

Las principales características patológicas del asma bronquial son:

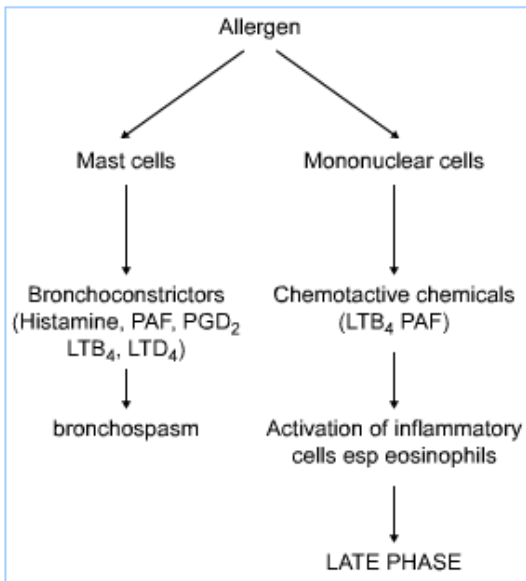
- Una respuesta inflamatoria crónica de las vías aéreas, lo que produce hipersecreción de moco y disnea debido a broncoconstricción aguda.

- Hiperreactividad bronquial como resultado de los reflejos axónicos y vagales locales. Esto contribuye a una broncoconstricción excesiva y la tos que se produce durante los ataques de asma.

Un ataque de asma se caracteriza por:

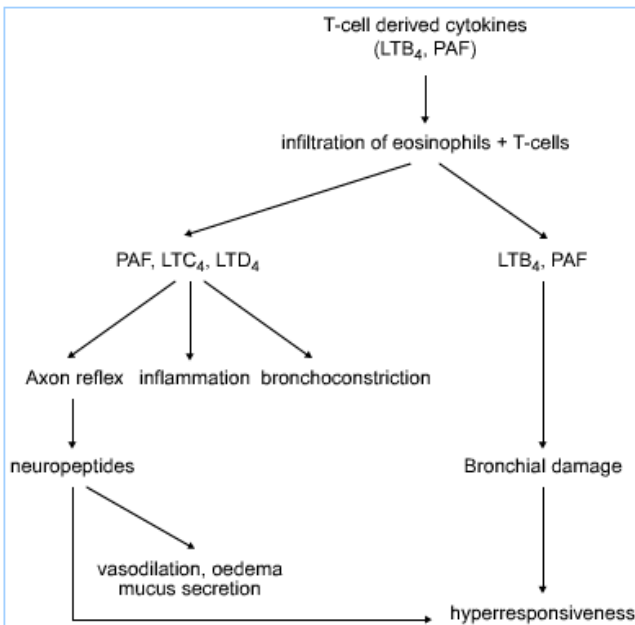
- Una fase temprana: debida principalmente a los mastocitos (pero también están involucrados los eosinófilos, macrófagos y las plaquetas).

Diagrama 1



- Una fase más tardía, probablemente debida a los eosinófilos y a los linfocitos T.

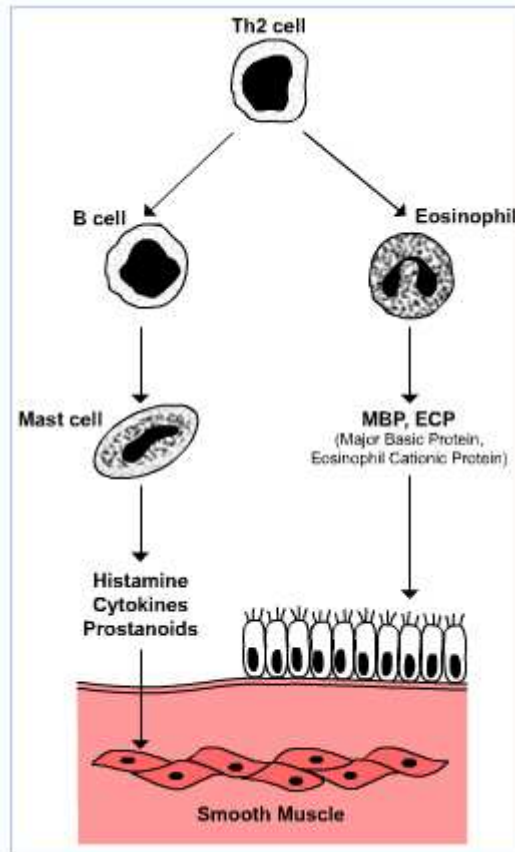
Diagrama 2



Introducción 17

Asma bronquial - Tratamiento

El tratamiento del asma se centra en tratar la causa subyacente (la inflamación) con medicamentos antiinflamatorios o tratar los síntomas (sobre todo la broncoconstricción).



Introducción 18 - Fármacos antiinflamatorios

Glucocorticoides

Estos medicamentos se utilizan para tratar los procesos inflamatorios crónicos subyacentes en el asma. No son broncodilatadores y no tratan los síntomas inmediatos del asma.

La beclometasona, la budesonida y la fluticasona son los esteroides antiinflamatorios que se utilizan actualmente como pilar del tratamiento del asma. Sus acciones incluyen:

- Inducción de la síntesis de lipocortina-1, que inhibe la fosfolipasa A₂ y, por tanto, reduce la producción de prostaglandinas, leucotrienos y PAF.
- Interacción con Elementos de Respuesta a Glucocorticoides (ERG) que da como resultado una disminución de la síntesis de citocinas, p. ej. interleucina-5 o factor de necrosis tumoral α (TNF α).
- Un mecanismo aún desconocido que reduce la respuesta inflamatoria en el pulmón.

Antagonistas de los receptores de leucotrienos e inhibidores de la 5-lipoxigenasa

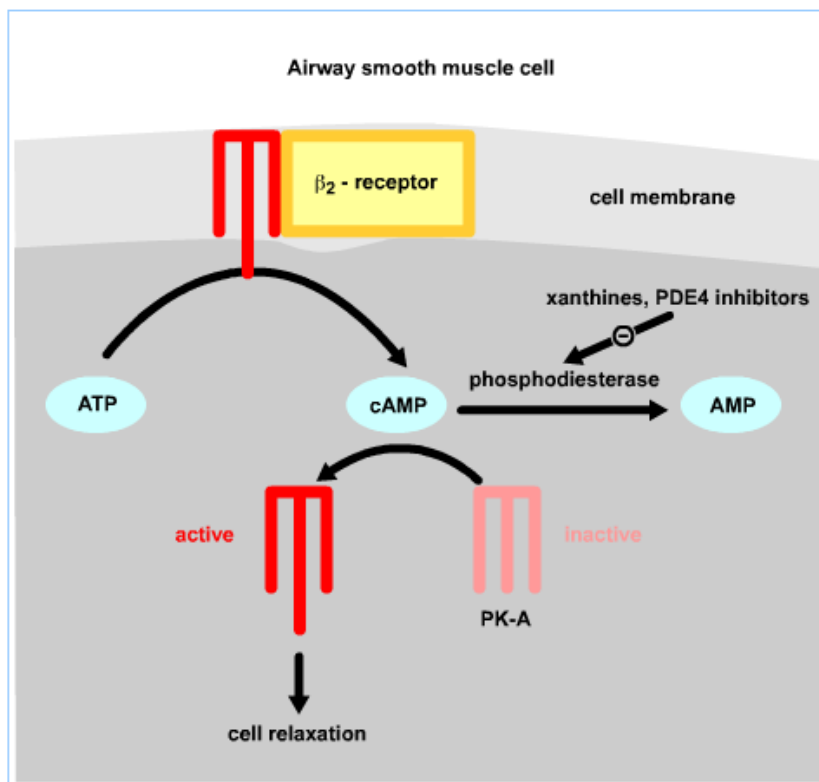
El LTC₄ y el LTD₄ son liberados a partir de células inflamatorias activadas y actúan como potentes broncoconstrictores a través de los receptores cysLT. Los antagonistas de estos receptores requieren receta médica e incluyen a montelukast, pranlukast y zafrilukast. Dichos fármacos reducen la afluencia de basófilos, linfocitos y eosinófilos en el líquido BAL 2 días después de la exposición al alérgeno. Existe evidencia que sugiere que también disminuyen la adhesión de leucocitos, lo que puede contribuir a la hiperreactividad de las vías respiratorias. Los inhibidores de la síntesis de peptidoleucotrienos y otros derivados de la 5-lipooxigenasa, como Zeiluton, también han demostrado en ensayos clínicos tener algún efecto en el asma.

Introducción 19 - Broncodilatadores

Agonistas de los receptores adrenérgicos β_2

Estos agentes revierten la broncoconstricción causada por diversos estímulos, provocando la relajación del músculo liso bronquial. El receptor β_2 está acoplado a la proteína G_s que a su vez activa la adenilato ciclasa y, por lo tanto, causa un aumento de AMPc. Como su efecto se opone directamente al de los broncoconstrictores su acción se denomina "antagonismo funcional". Actualmente existen dos tipos de agonistas β_2 según la duración de su acción:

- Agonistas β_2 de acción corta, como albuterol, terbutalina, fenoterol.
- Agonistas β_2 de acción larga, como salmeterol, aformoterol, bambuterol



Xantinas

Las xantinas, como la teofilina, han demostrado en ensayos clínicos ser útiles tanto en las crisis agudas de asma como reduciendo la frecuencia y gravedad de las crisis posteriores. La eficacia contra las crisis agudas radica en la capacidad de la teofilina para producir broncodilatación mediante la inhibición de las fosfodiesterasas (PDEs) que causan la degradación del segundo mensajero AMPc en 5 'AMP inactivo). Parece que las xantinas también pueden inhibir la reacción de fase tardía y la hiperreactividad bronquial. Algunos de los efectos de la teofilina pueden deberse al antagonismo de los receptores de adenosina. El principal problema con las xantinas es su estrecho margen terapéutico y los efectos secundarios, que se producen debido a la naturaleza ubicua las PDEs. Las metilxantinas tienen efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos sobre el corazón y del SNC. Los efectos secundarios se han logrado reducir mediante el desarrollo de inhibidores selectivos de la PDE (4) como roflumilast, ya que la PDE₄ es la isoforma presente en las células inflamatorias.

Anticolinérgicos

Los antagonistas muscarínicos evitan la unión de la acetilcolina a sus receptores muscarínicos. Ejemplos son: bromuro de ipratropio, atropina o bromuro de oxitropio. El bromuro de ipratropio no es particularmente eficaz en la exposición a alérgenos, pero es de utilidad en el asma con un fuerte componente de broncoconstricción refleja. Estos fármacos no son selectivos, por lo que su eficacia se ve reducida por el antagonismo sobre los receptores presinápticos M₂. Los antagonistas selectivos de M₃ pueden resultar más eficaces, como el bromuro de tiotropio, que se ha introducido recientemente en la práctica clínica y su duración de acción es larga.

Cromoglicato y nedocromil

El cromoglicato y el nedocromil están disponibles con receta médica, aunque su mecanismo de acción aún no se conoce totalmente. El cromoglicato no tiene ningún efecto directo sobre el músculo liso bronquial, pero es eficaz contra las reacciones tanto de fase temprana como tardía. Se cree que el tratamiento continuo inhibe la hiperreactividad bronquial. Originalmente se pensó que los efectos contra el asma de estos fármacos se debían a la inhibición de la liberación de mediadores de los mastocitos (por eso se les conoce como estabilizadores de membrana). Sin embargo, recientemente se ha descubierto que estos fármacos tienen efectos inhibidores sobre otros tipos de células, como los macrófagos y que también pueden suprimir los reflejos axónicos de las fibras de la irritación, previniendo la hiperreactividad bronquial mediante este mecanismo.

Introducción 20 - Medicamentos emergentes en el tratamiento del asma

También se están investigando otras clases de fármacos por su potencial para tratar el asma.

Inhibidores de PDE₄

Se ha descubierto recientemente que la elevación de AMPc y, por tanto, los inhibidores de PDE, tienen efectos supresores sobre las células inflamatorias. La isoforma de PDE predominante en las células inflamatorias es el tipo 4, por lo que los inhibidores selectivos de

esta PDE serán más beneficiosos al reducirse los efectos secundarios (como náuseas, arritmias cardíacas y convulsiones). Ejemplos de inhibidores de PDE₄ son Roflumilast y cilomilast.

Anticuerpos anti-IgE

Esta clase de compuestos tiene como objetivo, mediante la formación de complejos con IgE libre, bloquear la interacción entre las IgE y los mastocitos. Los anticuerpos anti-IgE iniciales provocaban la activación de los mastocitos mediante el entrecruzamiento de los receptores de la IgE, pero este problema se solventó con la producción de péptidos que se unen a la IgE en el mismo lugar en que ésta se une al receptor de IgE del mastocito.

Dichos fármacos reducen el número de células formadoras de IgE así como también los niveles séricos de IgE, la infiltración de eosinófilos pulmonares y la broncoconstricción inducida por antígenos. La respuesta inmune contra este tipo de fármacos se reduce mediante el uso de anticuerpos humanizados.

Se ha demostrado que los anticuerpos CGP51901 (quiméricos) y mAb-E25 recombinantes humanos (humanizados) disminuyen los niveles de IgE libre en suero y provocan una reducción reversible de los receptores FcεRI en los basófilos.

Inhibidores de tirosín quinasa

Las proteínas tirosín quinasa se subdividen en dos grupos:

- Receptores tirosín quinasa (p. Ej., el receptor de insulina y los receptores de factores de crecimiento como el del factor de crecimiento epidérmico o del factor de crecimiento derivado de plaquetas)
- Tirosín quinasa no receptores (por ejemplo, Src, Syk, JAK, Btk, Csk).

Actualmente se está investigando el posible papel de las tirosín quinasa no receptores en enfermedades de origen alérgico como el asma. Por ejemplo, el entrecruzamiento de receptores de antígenos en mastocitos, linfocitos T y B y granulocitos activa Lyn, Syk y Btk. Esto causa la fosforilación de tirosín y la activación de PLC, MAPK y la degranulación de los mastocitos. Los inhibidores de la tirosín quinasa bloquean la activación de tirosín quinasa inducida por antígenos y la liberación de histamina. Al fosforilarse JAK y activarse, puede activar a su vez una familia de factores de transcripción denominados STAT (de los que existen 7) que regulan la transcripción de genes inducida por citocinas. Existe mucha evidencia científica que respalda el papel de la activación de STAT-6 por Lyn, Syk y JAK en la patogenia del asma. Sin embargo, debido al gran número de quinasa, existe el problema de diseñar inhibidores con suficiente especificidad.

Inhibidores de NFκB

Actualmente se conoce cinco proteínas NF-κB de mamíferos. En la célula no estimulada NF-κB se encuentra en el citoplasma formando un complejo con la proteína inhibidora IκB. Tras la estimulación, IκB es activada por el complejo específico de IκBα (IKK) que causa la degradación de IκB. El NFκB libre y activo se trasloca al núcleo donde se une a elementos κB específicos e inicia la transcripción de genes que codifican proteínas inflamatorias como citocinas y

quimiocinas. Los glucocorticoides y los inmunosupresores, como ciclosporina A y FK506 inhiben la activación de NFκB.

Antagonistas de adenosina

La adenosina se forma por defosforilación del 5' monofosfato de adenosina por una ectoenzima 5'-nucleotidasa unida a la membrana. La adenosina se libera durante la hipoxia y en otras situaciones en las que las demandas de energía son muy elevadas, como por ejemplo en una situación inflamatoria en la que muchos tipos de células compiten por el suministro de energía. Se cree que se libera, probablemente de los mastocitos, después de una exposición aguda a alérgenos. La inhalación de adenosina causa broncoconstricción en sujetos asmáticos pero no en individuos normales. En la actualidad se conocen 4 receptores de adenosina; A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃. Se ha demostrado que suprimir la expresión del receptor A₁ inhibe la hipersensibilidad en un modelo de conejo. Los receptores A_{2A} están presentes en las células inflamatorias y la activación de este receptor provoca la supresión de la activación celular. En los mastocitos se encuentran tanto el receptor A_{2A} como el A_{2B} y la mayoría de las respuestas están mediadas a través del receptor A_{2B}, lo que lo convierte en un potencial objetivo terapéutico.

Agonistas de canales de potasio

Los canales de potasio están presentes en todas las membranas celulares. Controlan el potencial de membrana y, por lo tanto, la regulación fisiológica de la función celular. Uno de los principales efectos de la apertura de estos canales es la relajación del músculo liso. Por lo tanto, se cree que los agonistas de los canales de potasio, al abrir estos canales, tienen potencial para la relajación del músculo liso traqueal. Además de la relajación del músculo liso, también se ha demostrado que estos compuestos inhiben la liberación de taquiquininas broncoconstrictoras desde las terminaciones nerviosas.

Introducción 21

Bronquitis crónica

La bronquitis crónica se define como un trastorno relacionado con la producción excesiva de esputo y con tos todos los días o la mayoría de ellos. La obstrucción de las vías respiratorias es el resultado del estrechamiento de la luz y por los tapones de moco, que pueden producir una infección respiratoria secundaria. Por lo general, la bronquitis crónica causa hipoventilación alveolar, hipercapnia e hipoxia, aunque algunos pacientes hiperventilan para evitar una hipoxia grave.

Se puede desarrollar hipertensión pulmonar secundaria y provocar insuficiencia cardíaca de ventrículo derecho.

Enfisema

El enfisema es una afección crónica progresiva caracterizada por dificultad para respirar, especialmente al hacer ejercicio. Es el resultado del daño progresivo de los bronquiolos

terminales, los alvéolos y su irrigación sanguínea, lo que afecta gravemente al intercambio gaseoso. El daño es permanente e irreversible.

Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)

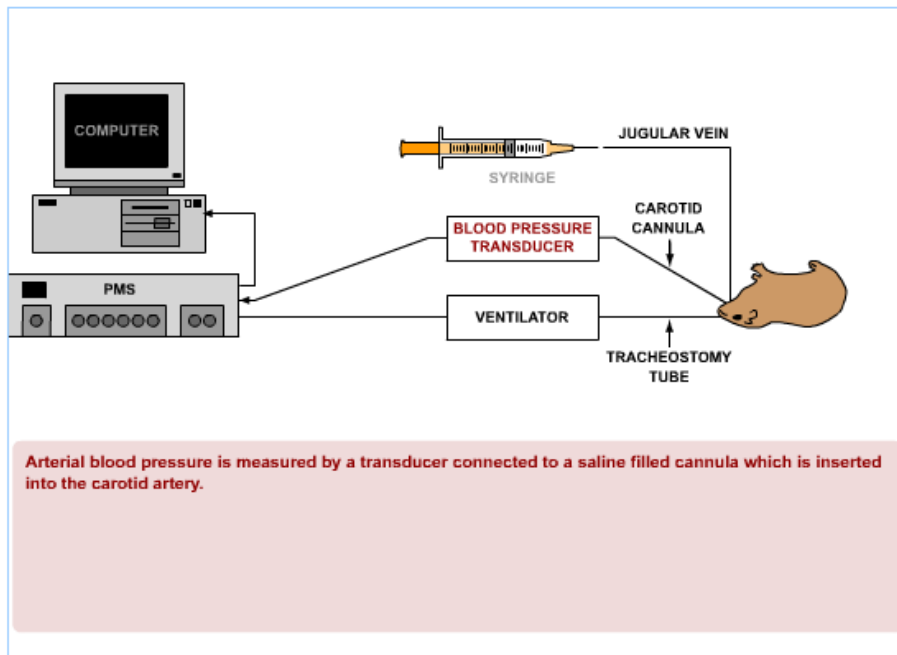
La bronquitis crónica y el enfisema a menudo se dan simultáneamente en los fumadores, una condición conocida como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Los pacientes suelen tener tos productiva, producción de esputo, dificultad para respirar al hacer ejercicio y obstrucción de las vías respiratorias. La infección respiratoria es habitual y puede empeorar el progreso de la enfermedad.

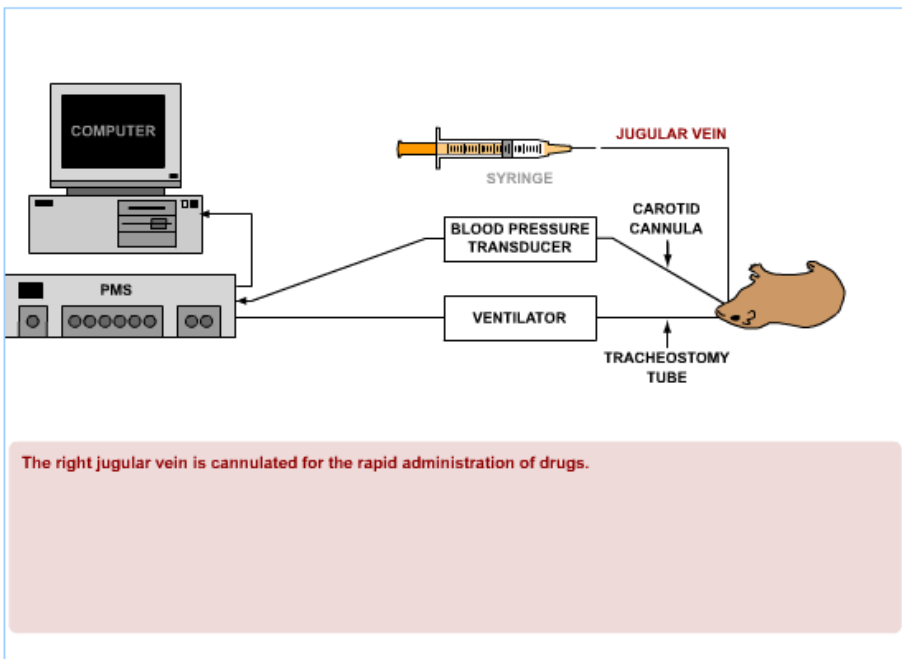
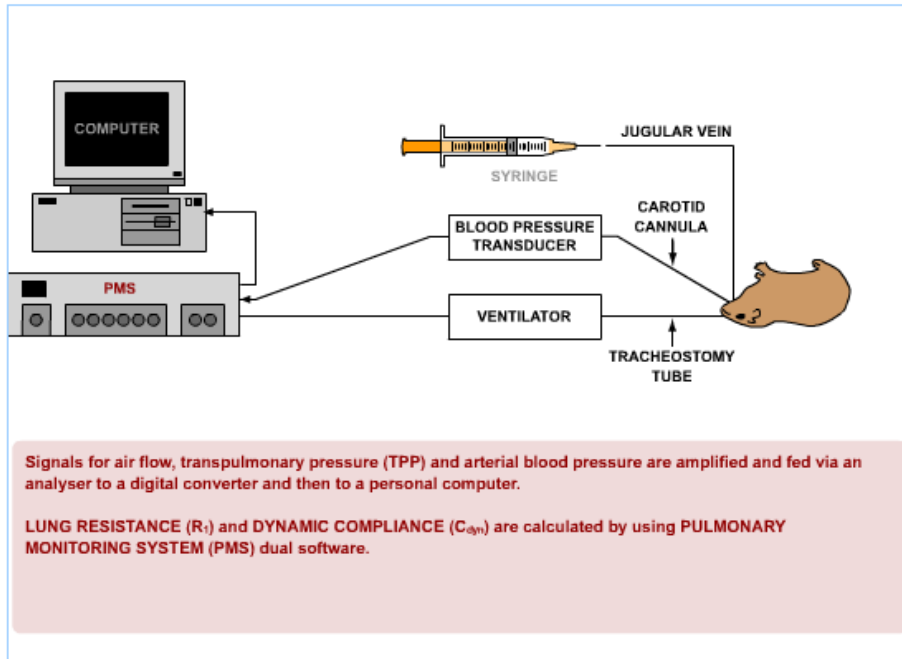
El tratamiento de la EPOC es sintomático. Se utilizan agonistas β_2 de acción prolongada y fármacos anticolinérgicos. Si bien frecuentemente se prescriben glucocorticoides para la EPOC, hay poca evidencia de que tengan un efecto clínico relevante, como sí está demostrado en pacientes con asma.

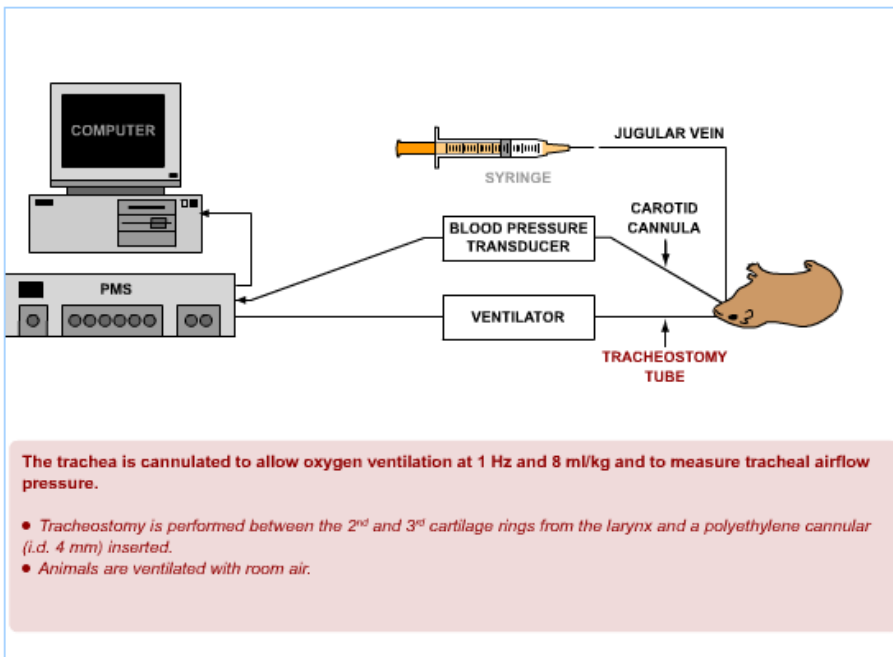
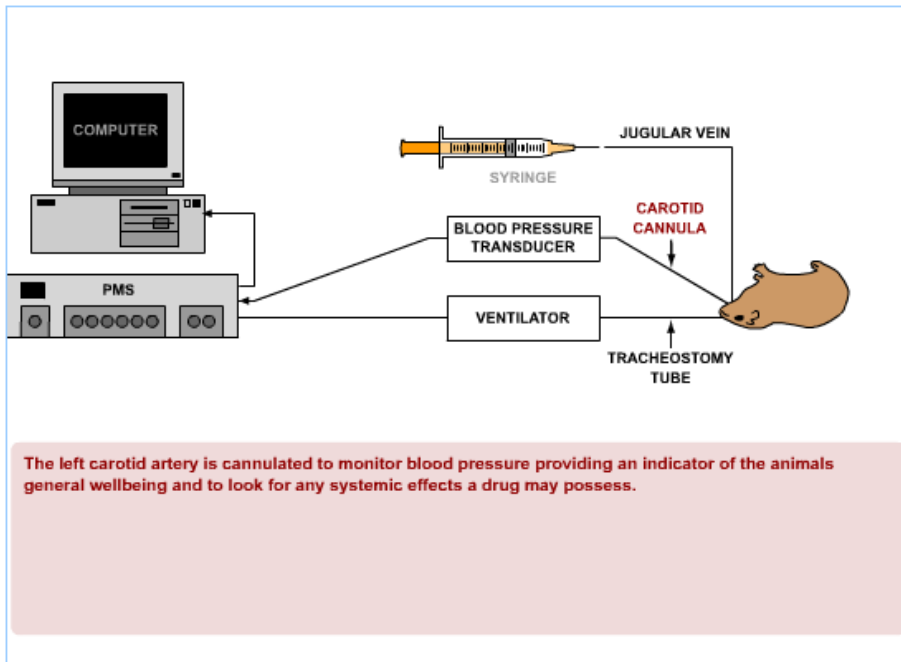
Metodos 1

1. Protocolo Experimental - Preparación Normal

Clicka en los componentes del diagrama par más información.







Metodos 2

1. Protocolo experimental - Preparación normal. Bloqueantes neuromusculares

Los bloqueantes neuromusculares se usan junto con la anestesia para producir parálisis muscular y permitir una relajación del músculo esquelético eficiente (y facilitar así la respiración artificial), sin la depresión respiratoria causada por una anestesia profunda. La mayoría de estos bloqueantes actúan en el receptor nicotínico postsináptico de ACh, reduciendo el potencial en la placa neuromuscular.

Hay dos categorías:

- Bloqueantes despolarizantes: son agonistas del receptor ACh. Causan una excitación prolongada que conduce a un bloqueo por agotamiento denominado “bloqueo despolarizante”. Algunos ejemplos son suxametonio y decametonio.
- Bloqueantes no despolarizantes: incluye medicamentos como pancuronio, vecuronio, atracurio y galamina. Todos son antagonistas competitivos del receptor de ACh, por lo que no causan despolarización y no tienen ningún efecto directo sobre el potencial de membrana. Algunos miembros de esta clase también actúan bloqueando canales iónicos.

Cuando se utilizan bloqueantes neuromusculares junto con anestésicos generales se debe garantizar que el nivel de anestesia sea suficiente en todo momento y durante todo el procedimiento. Si los efectos del anestésico desaparecen mientras el bloqueo neuromuscular todavía tiene lugar, la parálisis persiste y la única indicación de dolor o estrés es la medición de la presión arterial o la frecuencia cardíaca. Por lo tanto, en la práctica clínica solo se utilizan bloqueantes neuromusculares no despolarizantes, ya que sus efectos pueden revertirse con anticolinesterásicos (p. ej., Neostigmina). Dichos fármacos evitan la degradación de la ACh en la sinapsis. Como resultado de su acción habrá más ACh disponible para competir por el receptor postsináptico. La neostigmina generalmente se administra con atropina para reducir las acciones muscarínicas indeseables.

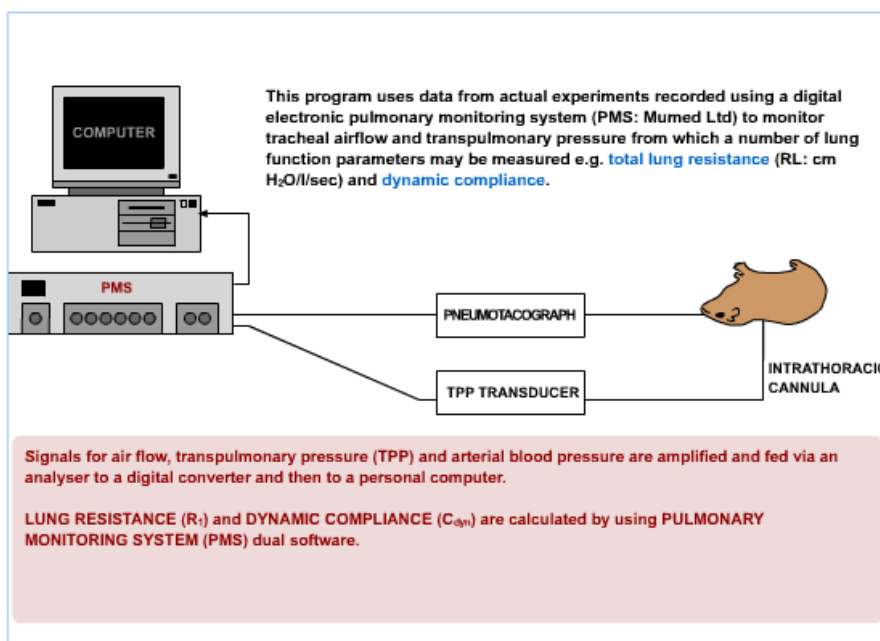
Los efectos secundarios del bloqueo neuromuscular son:

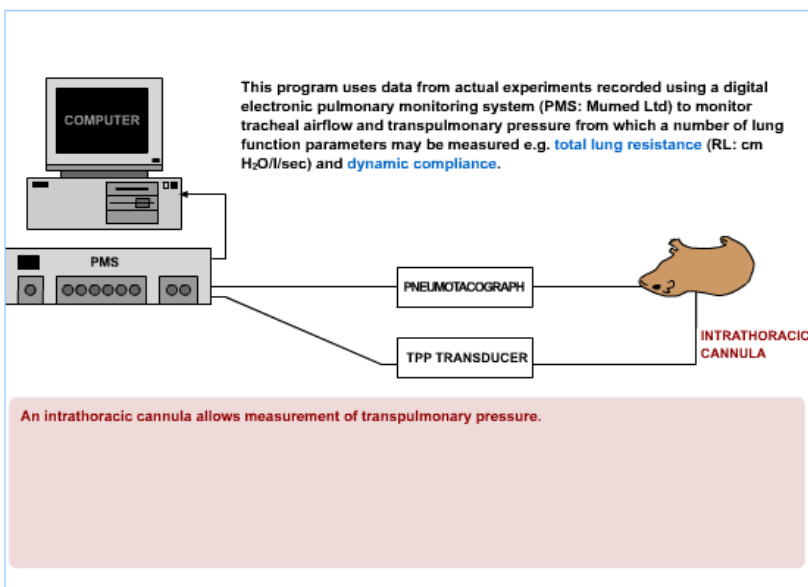
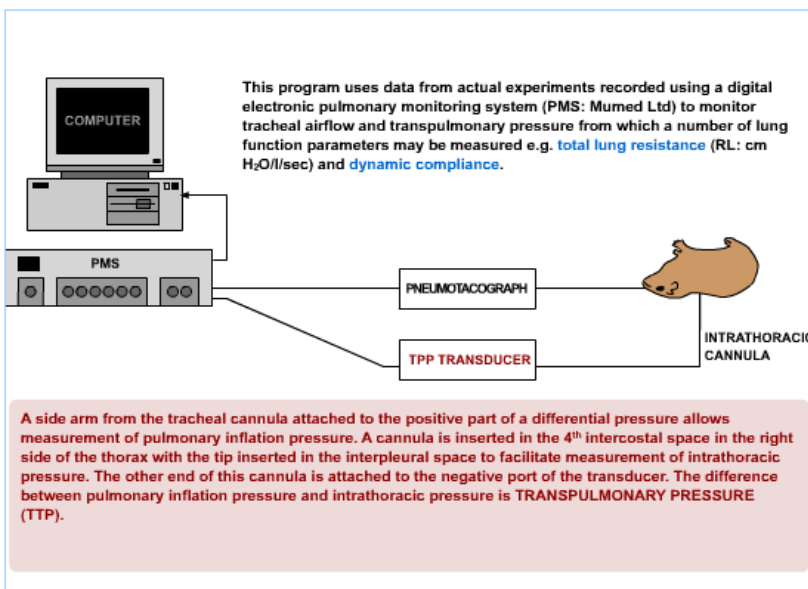
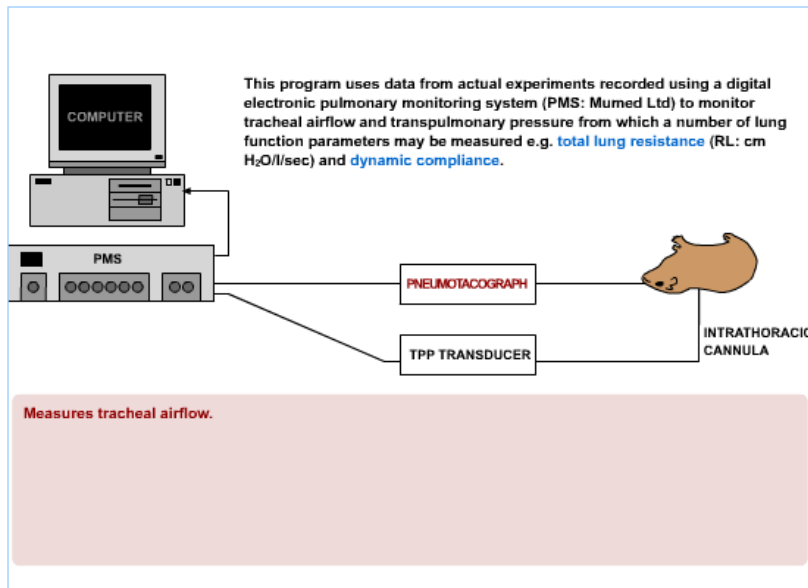
- Hiperpotasemia
- Presión intraocular elevada
- Presión intragástrica elevada
- Dolor muscular

Metodos 3

1. Protocolo Experimental – Preparación Normal

Clicka en los componentes del diagrama par más información.





Método 4

1. Protocolo Experimental

Experimentos con bombesina

Para estudiar los efectos de los fármacos broncodilatadores, se trata al animal con bombesina (i.v.) lo que produce una broncoconstricción prolongada (aumento en la resistencia de las vías respiratorias). Los broncodilatadores relajarán el músculo liso bronquial y provocarán una disminución de la resistencia de las vías aéreas.

Estimulación vagal

En algunos experimentos, el nervio vago se estimula eléctricamente colocándole electrodos de platino y estimulándolo (5 V; 10 Hz o 100 Hz; 5 ms de duración) durante 30 segundos.

Método 5

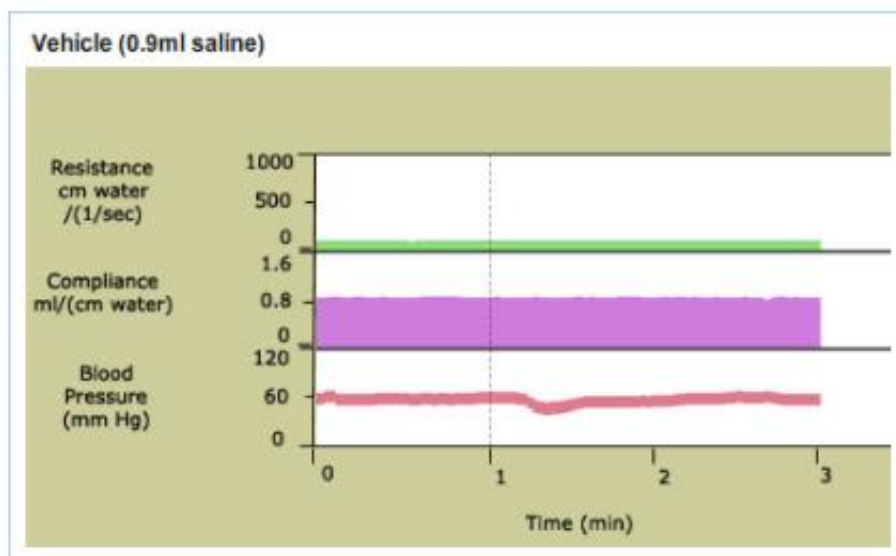
2. Animales alérgicos (Sensibilizados)-Test de alérgenos

Se realizaron algunos experimentos en cobayas (450 - 600 g) que se sensibilizaron al alérgeno mediante ovoalbúmina (10 mg / ml, i.p. en 1 ml de suspensión) administrada 21 días antes. Posteriormente se prepararon de la misma manera que los animales "normales".

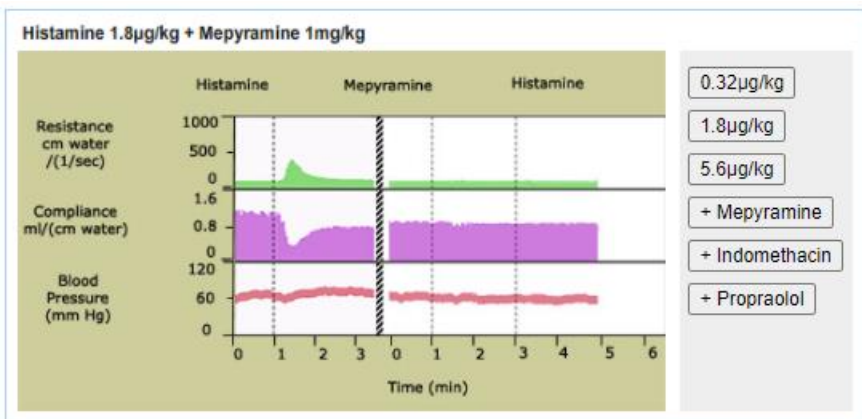
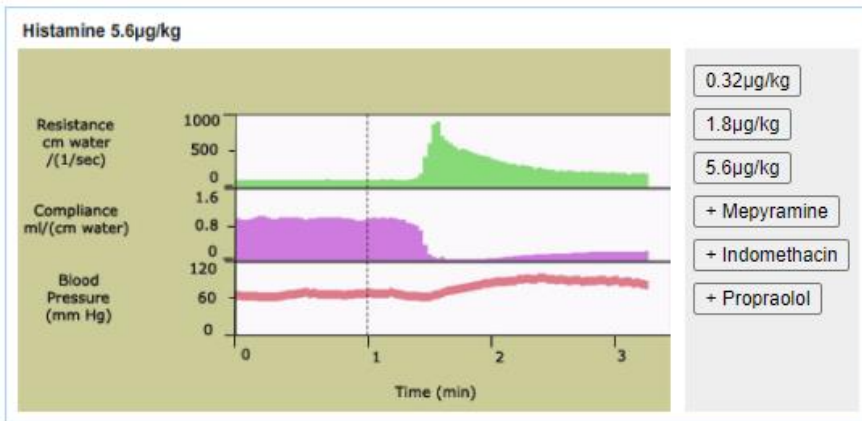
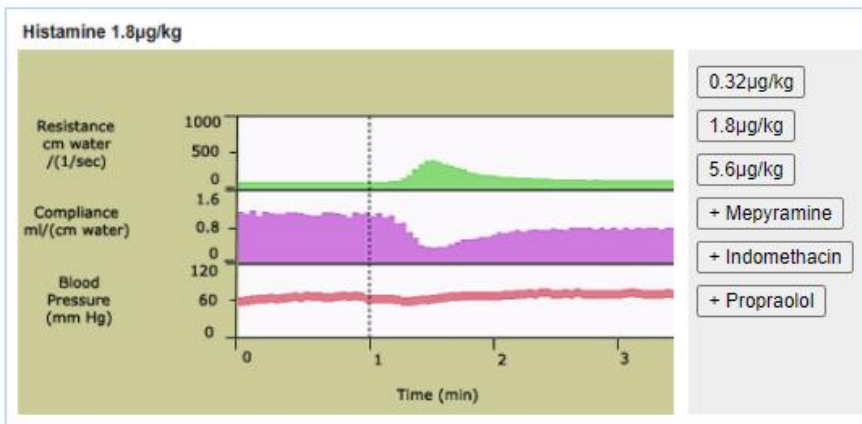
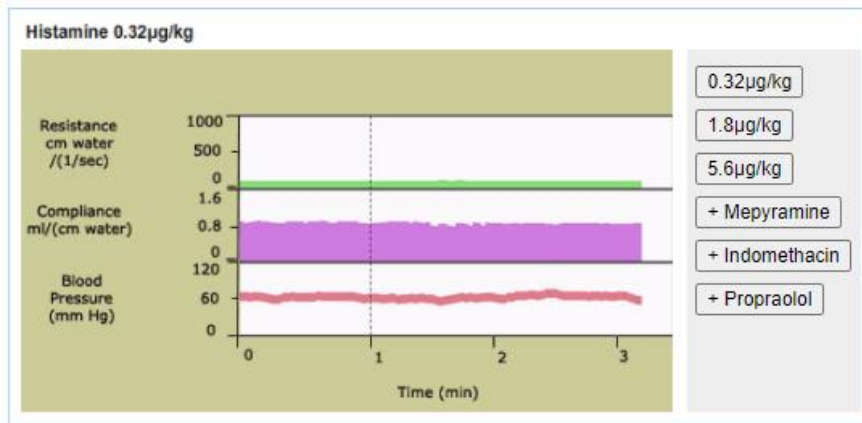
La sensibilización de los conejillos de indias intenta reproducir la producción de inmunoglobulinas específicas contra alérgenos observadas en sujetos atópicos con asma, proporcionando un modelo mediante el cual se pueden investigar fármacos antialérgicos.

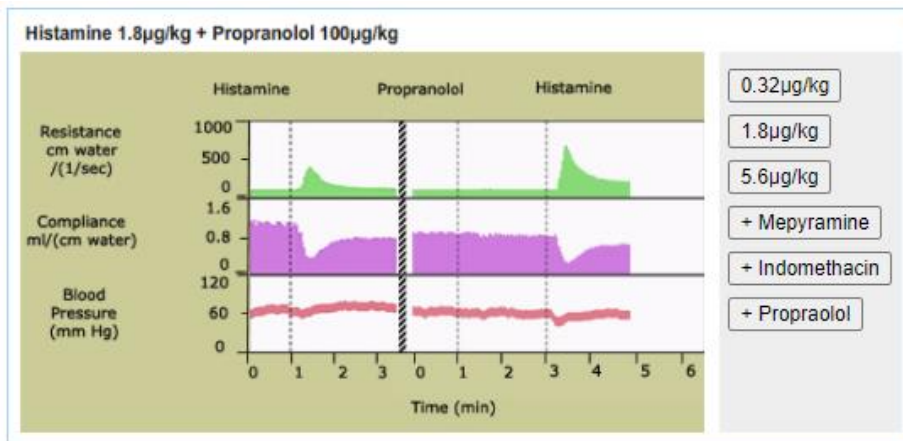
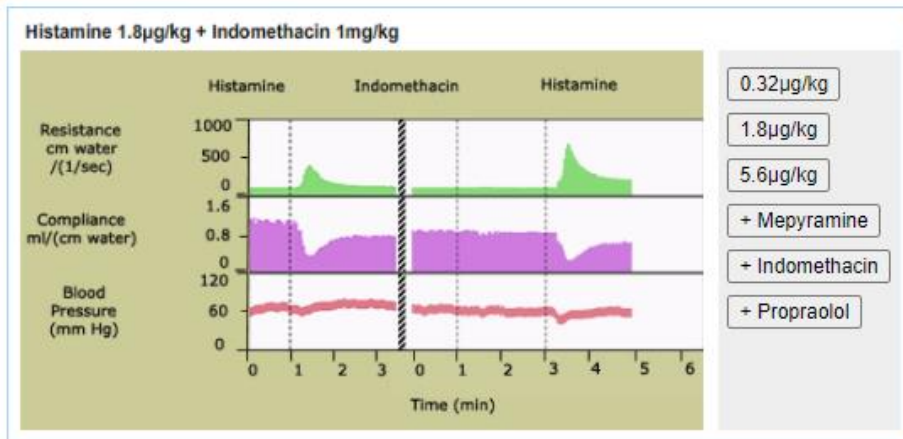
Experiments

Cobaya Normal– Vehículo

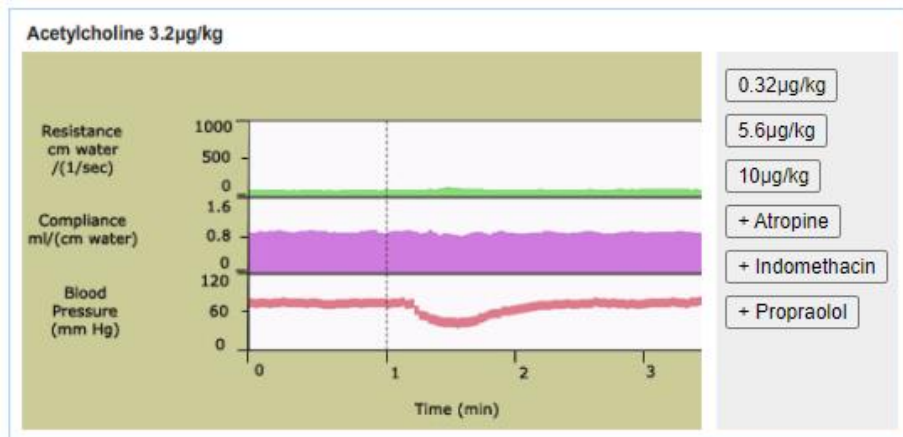


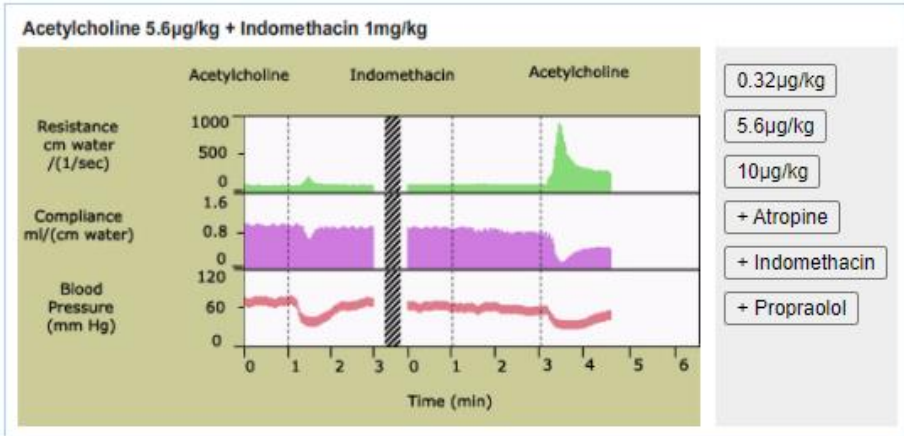
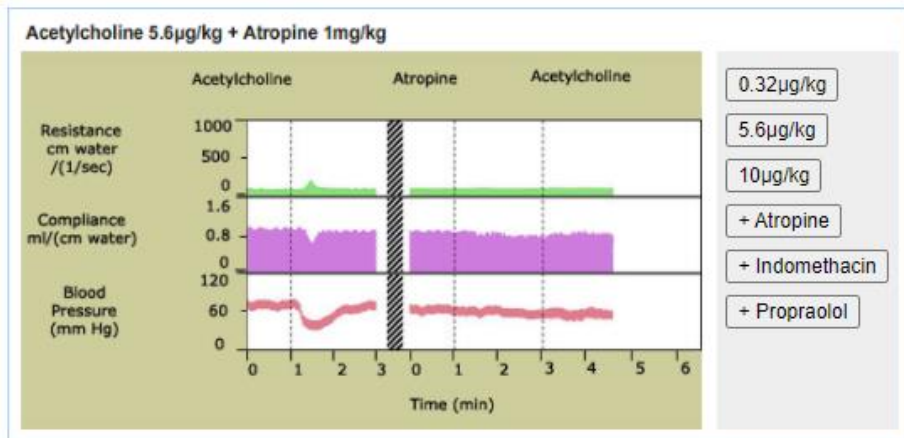
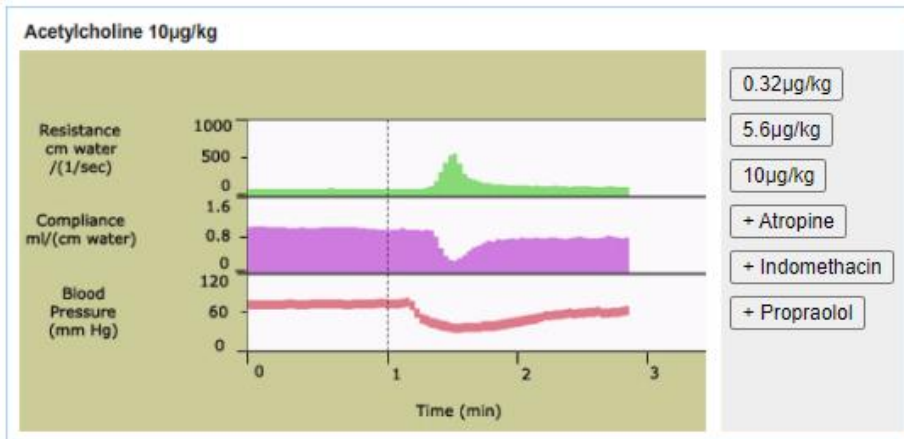
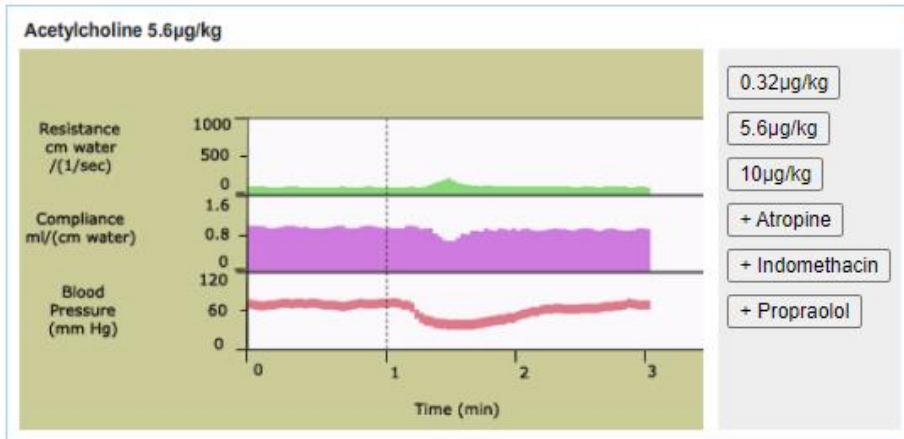
Cobaya Normal - Broncoconstrictores (Histamina)

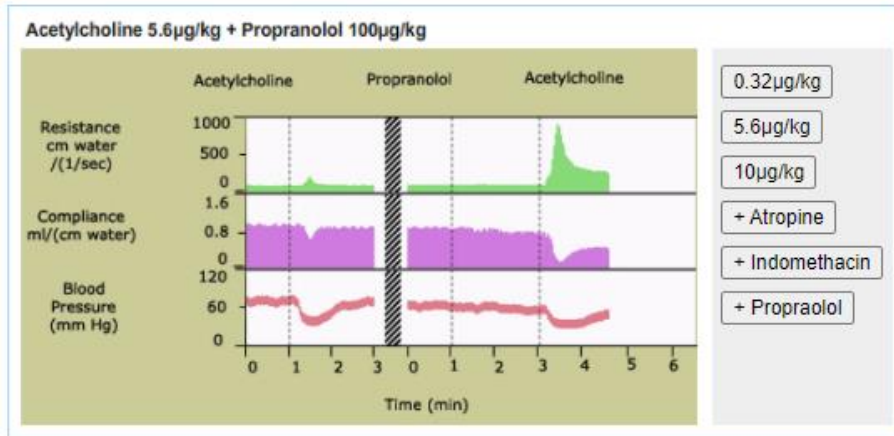




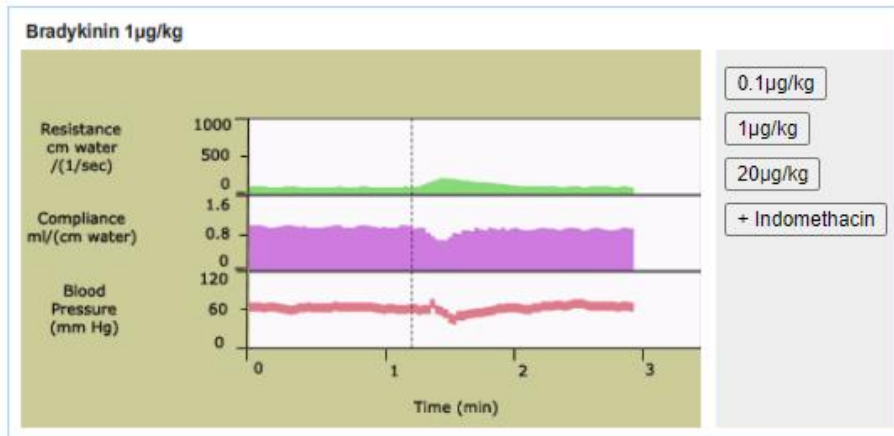
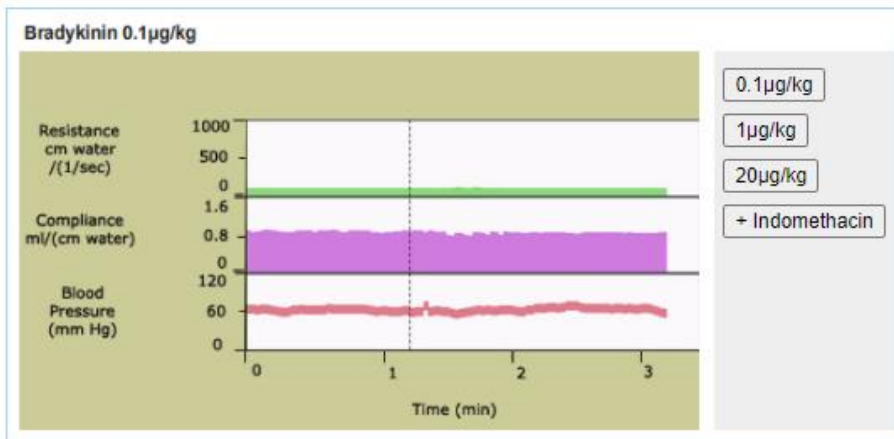
Cobaya Normal - Broncoconstrictores (Acetilcolina)

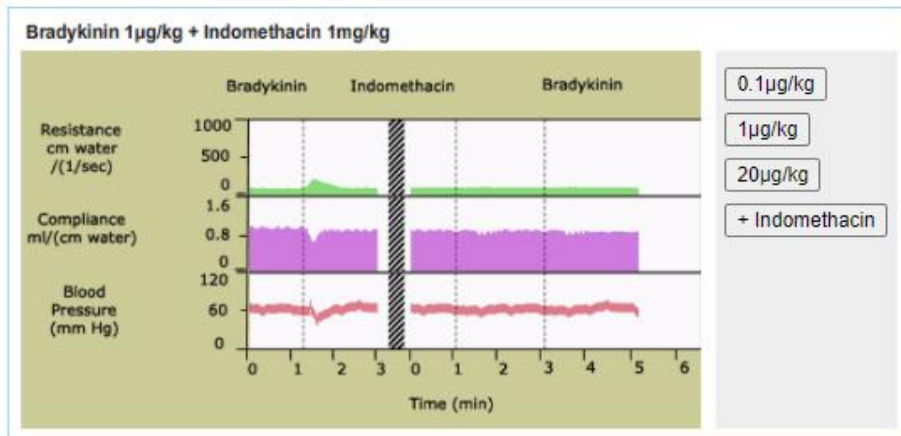
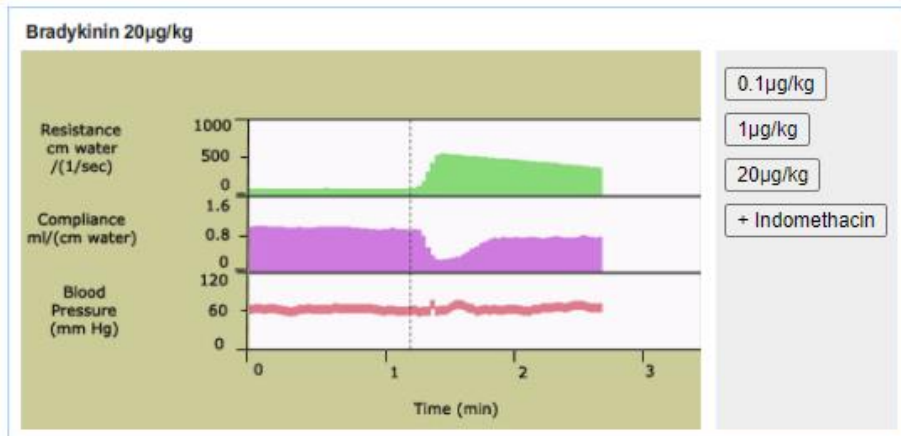




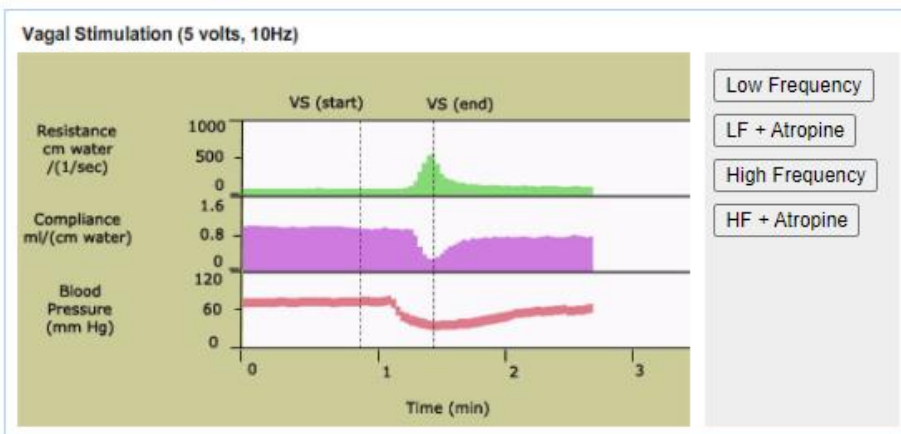


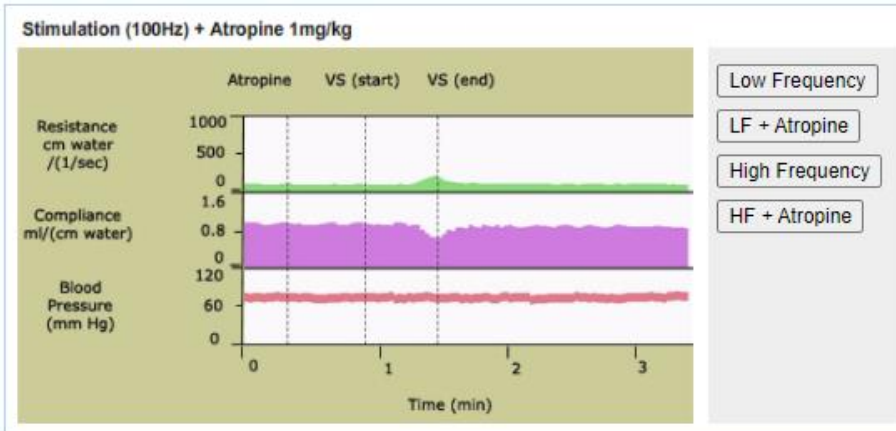
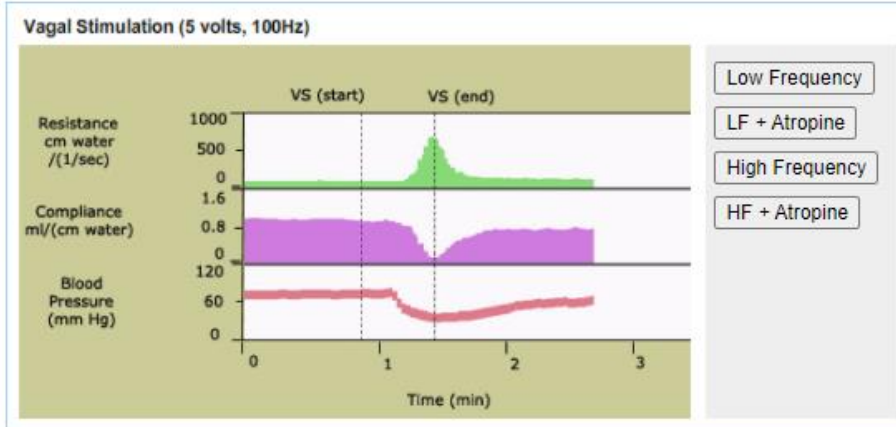
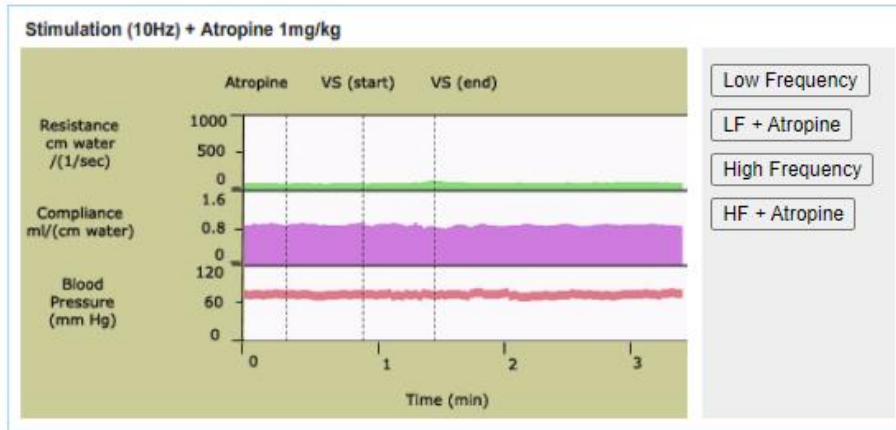
Cobaya Normal - Broncoconstrictores (Bradicinina)



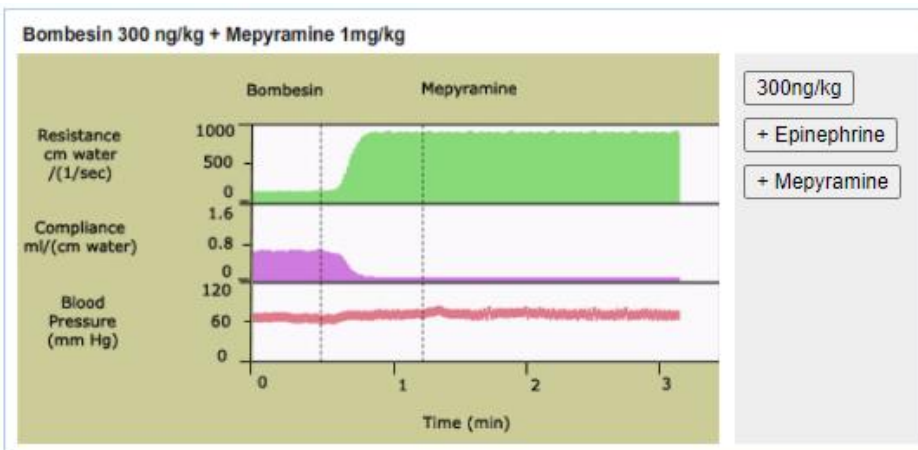
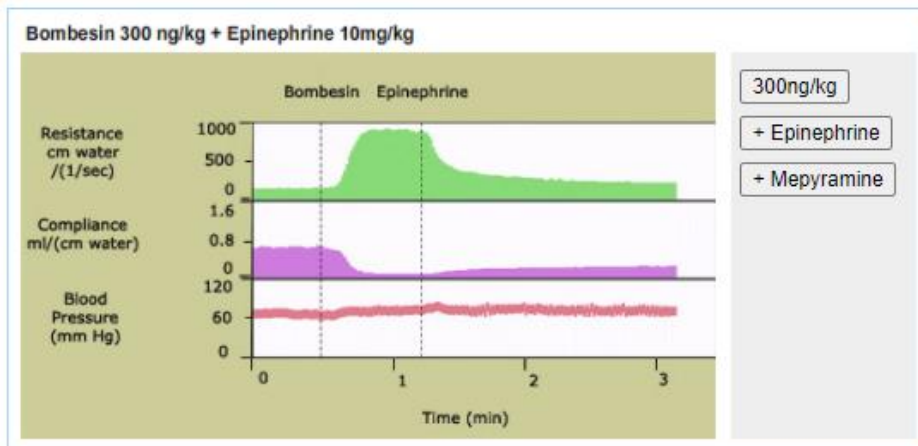
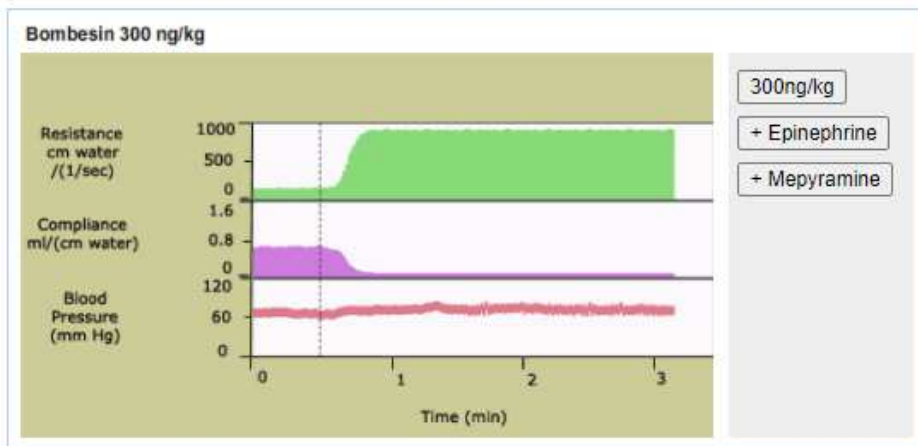


Cobaya Normal - Broncoconstrictores (Estimulación Vagal)

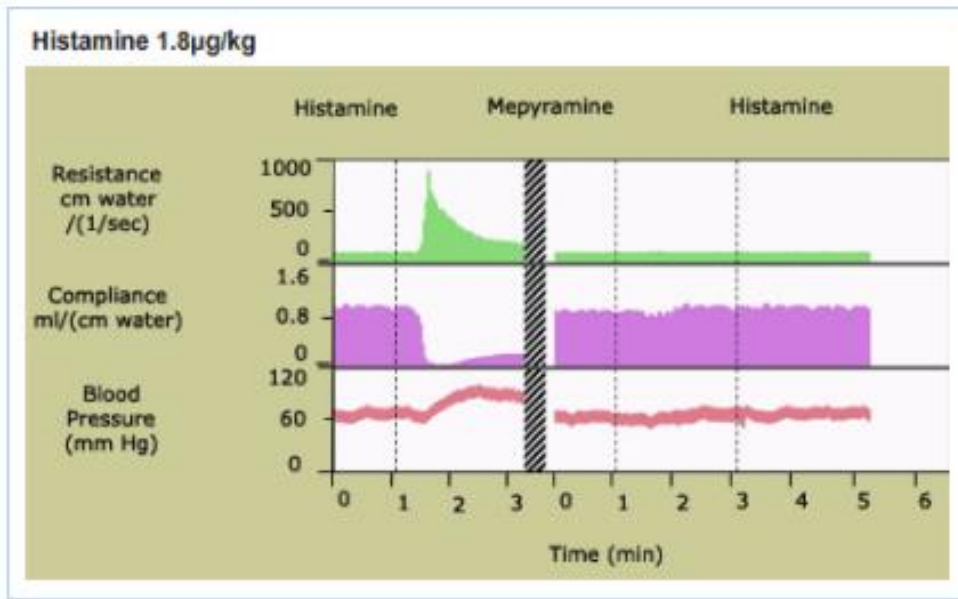




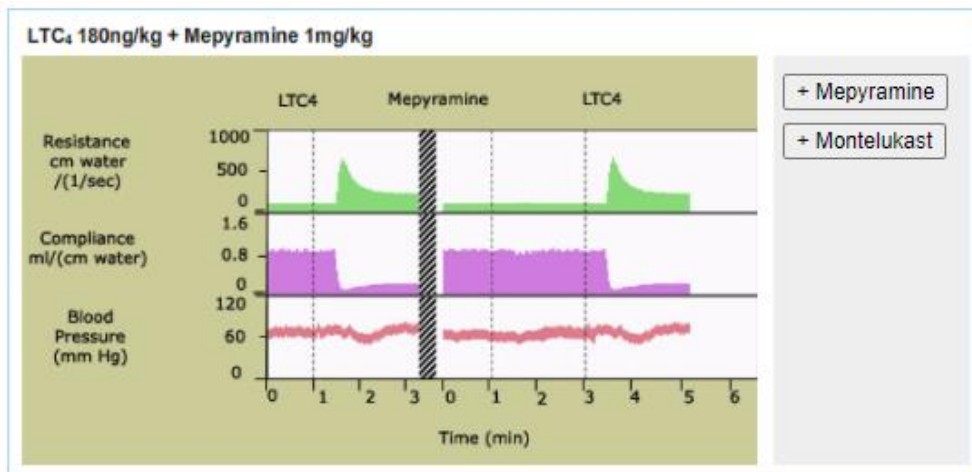
Cobaya Normal - Broncodilatadores (Tratado con Bombesina)



Cobaya Alérgico (Histamina + Mepiramina)



Cobaya Alérgico (LTC₄ + Mepiramina)



Cobaya Alérgico (Antígena + Mepiramina)

