

**MARIA RUBIO SOTES**

**LIBERACION DE METABOLITOS DEL ACIDO ARAQUIDONICO POR  
MONOCITOS CIRCULANTES EN EL ASMA DE DIFERENTES ETIOLOGIAS.**

**Directores : Prof. D. Amador Schüller Pérez  
Catedrático Emérito de Patología Médica**

**Prof. D. Angel Ortega Núñez  
Profesor Numerario de Patología Médica**

**TESIS DOCTORAL**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**Facultad de Medicina  
Departamento de Medicina**

**Año 1991**



MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO  
INSTITUTO NACIONAL DE LA SALUD  
Hospital Universitario San Carlos  
Ciudad Universitaria  
28040-MADRID

Universidad Complutense  
Departamento de Medicina

D. MANUEL DIAZ-RUBIO, Director del Departamento de Medicina de la  
Universidad Complutense de Madrid,

INFORMA: que el proyecto de Tesis Doctoral que presenta Dña. María  
Rubio Sotés titulado "Liberación de metabolitos del ácido  
araquidónico por monocitos circulantes en el asma de  
diferentes etiologías", realizado bajo la dirección de los  
Profesores D. Amador Schüller Pérez y D. Angel Ortega  
Núñez, reúne lo requisitos necesarios para poder optar al  
Grado de Doctor.

Por lo que expido el presente certificado a petición  
de la interesada en

Madrid, a doce de Marzo de mil novecientos noventa y uno.

Fdo. Prof. M. Díaz-Rubio.





MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO  
INSTITUTO NACIONAL DE LA SALUD  
Hospital Universitario San Carlos  
Ciudad Universitaria  
28040-MADRID

Universidad Complutense  
Departamento de Medicina

D.AMADOR SCHÜLLER PEREZ, Catedrático Emérito de Patología Médica,

CERTIFICO: que D<sup>a</sup> María Rubio Sotés ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral titulada "Liberación de metabolitos del ácido araquidónico por monocitos circulantes en el asma de diferentes etiologías".

Este trabajo reúne las condiciones necesarias para obtener el Grado de Doctor, por lo que doy mi conformidad para ser presentado a tal fin.

Y para que conste, firmo el presente en Madrid, a doce de Marzo de mil novecientos noventa y uno.

Edo. Prof. A. Schüller Pérez.



HOSPITAL GENERAL "GREGORIO MARAÑÓN"

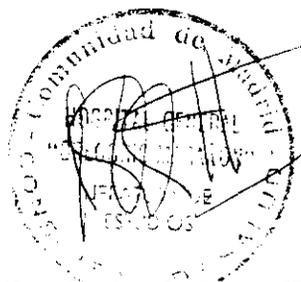
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
FACULTAD DE MEDICINA DE MADRID

D. ANGEL ORTEGA NUÑEZ, Profesor Numerario de Patología Médica,

CERTIFICO: que D<sup>a</sup> María Rubio Sotés ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral titulada "Liberación de metabolitos del ácido araquidónico por monocitos circulantes en el asma de diferentes etiologías"

Este trabajo reúne las condiciones necesarias para obtener el Grado de Doctor, por lo que doy mi conformidad para ser presentado a tal fin.

Y para que conste, firmo el presente en Madrid, a doce de Marzo de mil novecientos noventa y uno.



Fdo. Prof. A. Ortega Núñez.

**I.- INDICE GENERAL**

I	.- INDICE GENERAL.....	i
II	.- DEDICATORIA.....	x
III	.- AGRADECIMIENTOS.....	xii
IV	.- ABREVIATURAS EMPLEADAS.....	xiv
V	.- INTRODUCCION	
	Revisiones bibliográficas.....	1
	<b>1.- Asma bronquial. Definición.....</b>	<b>2</b>
	<b>2.- Fisiopatología.....</b>	<b>7</b>
	2.1 .- Mecanismos inmunológicos.....	8
	2.1.1.- Células implicadas.....	13
	2.2 .- Otras vías.....	16
	2.2.1.- Infecciones víricas.....	16
	2.2.2.- Teoría del bloqueo beta adrenérgico.....	19
	2.2.3.- Alteraciones de la actividad inhibitoria no adrenérgica-no colinérgica (NANC).....	22
	2.2.4.- Alteraciones en la regulación de la concentración intracelular de calcio.....	24
	2.2.5.- Inflamación y liberación de mediadores.....	25
	<b>3.- Asma e intolerancia a A.I.N.E.....</b>	<b>30</b>
	3.1 .- Reactividad cruzada.....	32
	3.2 .- Teorías patogénicas.....	33
	3.2.1.- Mecanismo inmunológico.....	33
	3.2.2.- Hipótesis de activación del complemento....	33
	3.2.3.- Teoría genética.....	34
	3.2.4.- Liberación de mediadores por las células cebas/basófilos.....	35
	3.2.5.- Intervención de los eosinófilos.....	37
	3.2.6.- Intervención de las plaquetas.....	37
	3.2.7.- Acción de los A.I.N.E. sobre el metabolismo del ác. araquidónico.....	38
	<b>4.- Metabolismo del ác. araquidónico.....</b>	<b>40</b>
	4.1 .- Producción de eicosanoides en tejidos y células.....	42
	4.2 .- Receptores tisulares de eicosanoides.....	45
	4.3 .- Acciones fisiológicas de los eicosanoides..	47
	<b>5.- Eicosanoides en enfermedades alérgicas.....</b>	<b>51</b>
	5.1 .- Eicosanoides y asma humano. Estudios sobre su posible intervención.....	52
	5.2 .- Eicosanoides y asma por intolerancia a A.I.N.E.....	56
	<b>6.- Papel de los macrófagos alveolares y monocitos</b>	

	periféricos en el asma bronquial.....	61
VI .-	HIPOTESIS DE TRABAJO.....	69
VII.-	MATERIALES Y METODOS.....	78
	1.- Materiales utilizados.....	79
	2.- Pacientes.....	81
	3.- Métodos.....	85
	3.1 .- Obtención de monocitos.....	85
	3.2 .- Comprobación de la capacidad de los monocitos para liberar eicosanoides.....	87
	3.3 .- Relación del número de células sembradas con la producción de LTB <sub>4</sub> .....	87
	3.4 .- Estímulos empleados.....	88
	3.5 .- Método de adición de estímulos en los pacientes estudiados.....	90
	3.6 .- Cuantificación de eicosanoides.....	91
	3.6.1.- Leucotrieno B <sub>4</sub> .....	92
	3.6.2.- Leucotrieno C <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub> .....	95
	3.6.3.- Leucotrieno C <sub>4</sub> específico (anticuerpo monoclonal).....	99
	3.6.4.- Prostaglandina D <sub>2</sub> .....	102
	3.6.5.- Tromboxano B <sub>2</sub> .....	105
VIII.-	RESULTADOS.....	108
	1.- Cuantificación de eicosanoides tras los distintos estímulos.....	109
	2.- Cálculo estadístico.....	110
	3.- Diferencias estadísticamente significativas entre la basal de cada grupo y los estímulos empleados.....	111
	4.- Comparación de la producción de eicosanoides tras el estímulo con ionóforo de calcio y tras AAS + ionóforo de calcio.....	114
	5.- Comparación entre el grupo A (controles sanos) y los restantes grupos.....	115
IX .-	DISCUSION.....	117
	1.- Hallazgos en la producción basal de eicosanoides de individuos sanos.....	118
	2.- Análisis de la respuesta a los estímulos en todos los grupos.....	120
	3.- Comparación con los datos de la literatura.....	130
	4.- Actuación del ác. acetilsalicílico en la liberación de eicosanoides.....	132

X	.- CONCLUSIONES.....	138
XI	.- INDICE DE FIGURAS.....	143
	Fig. 1 .- Esquema del proceso de membrana para liberación de mediadores químicos.....	144
	Fig, 2 .- Representación esquemática de los fosfolípidos.....	145
	Fig. 3 .- Vía de generación del ác. araquidónico a partir de fosfatidilinositol.....	146
	Fig. 4 .- Resumen de las vías metabólicas del ác. araquidónico.....	147
	Fig. 5 .- Mecanismos de biosíntesis de prostaglandinas y tromboxanos.....	148
	Fig. 6 .- Formación de leucotrienos.....	149
	Fig. 7 .- Formación de lipoxinas.....	150
	Fig. 8 .- Producción de eicosanoides por las distintas células.....	151
	Fig. 9 .- Modelo teórico de receptor de eicosanoides.....	152
	Fig. 10.- Antes y después de la centrifugación....	153
	Fig. 11.- Producción de $LTB_4$ en relación con el número de células tras el estímulo con ionóforo de calcio A-23187.....	154
	Fig. 12.- Estudio del estímulo con diluciones de anti-IgE en la producción de $LTB_4$ ....	155
	Fig. 13.- Comprobación de diluyentes en la producción de $LTB_4$ en sanos.....	156
	Fig. 14.- Esquema teórico del radioinmunoensayo para cuantificar eicosanoides.....	157
	Fig. 15.- Representación de la curva standard para la cuantificación de $LTB_4$ .....	158
	Fig. 16.- Representación de la curva standard para la cuantificación de $LTC_4/D_4/E_4$ ....	159
	Fig. 17.- Representación de la curva standard para la cuantificación de $LTC_4$ (anticuerpo monoclonal).....	160
	Fig. 18.- Representación de la curva standard para la cuantificación de $PGD_2$ .....	161
	Fig. 19.- Representación de la curva standard para la cuantificación de $TxB_2$ .....	162
	Fig. 20.- Representación de las diferencias estadísticas del $FEV_1$ entre el grupo	

	A y los grupos B, C, D, y E.....	163
Fig. 21.-	Grupo A: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de $LTB_4$ , basal y tras los diferentes estímulos.....	164
Fig. 22.-	Grupo A: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de $LTC_4/D_4/E_4$ , basal y tras los diferentes estímulos.....	165
Fig. 23.-	Grupo A: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de $PGD_2$ , basal y tras los diferentes estímulos.....	166
Fig. 24.-	Grupo A: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de $TxB_2$ , basal y tras los diferentes estímulos.....	167
Fig. 25.-	Grupo B: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de $LTB_4$ , basal y tras los diferentes estímulos.....	168
Fig. 26.-	Grupo B: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de $LTC_4/D_4/E_4$ , basal y tras los diferentes estímulos.....	169
Fig. 27.-	Grupo B: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de $PGD_2$ , basal y tras los diferentes estímulos.....	170
Fig. 28.-	Grupo B: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de $TxB_2$ , basal y tras los diferentes estímulos.....	171
Fig. 29.-	Grupo C: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de $LTB_4$ , basal y tras los diferentes estímulos.....	172
Fig. 30.-	Grupo C: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de $LTC_4/D_4/E_4$ , basal y tras los diferentes estímulos.....	173

Fig. 31.- Grupo C: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de PGD <sub>2</sub> , basal y tras los diferentes estímulos.....	174
Fig. 32.- Grupo C: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de TxB <sub>2</sub> , basal y tras los diferentes estímulos.....	175
Fig. 33.- Grupo D: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de LTB <sub>4</sub> , basal y tras los diferentes estímulos.....	176
Fig. 34.- Grupo D: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub> , basal y tras los diferentes estímulos.....	177
Fig. 35.- Grupo D: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de PGD <sub>2</sub> , basal y tras los diferentes estímulos.....	178
Fig. 36.- Grupo D: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de TxB <sub>2</sub> , basal y tras los diferentes estímulos.....	179
Fig. 37.- Grupo E: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de LTB <sub>4</sub> , basal y tras los diferentes estímulos.....	180
Fig. 38.- Grupo E: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub> , basal y tras los diferentes estímulos.....	181
Fig. 39.- Grupo E: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de PGD <sub>2</sub> , basal t tras los diferentes estímulos.....	182
Fig. 40.- Grupo E: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de TxB <sub>2</sub> , basal y tras los diferentes estímulos.....	183
Fig. 41.- Grupo A: representación de las medias	

	y D.S. de los log. de la producción de los distintos eicosanoides tras el estímulo con ionóforo de calcio (I) y AAS + ionóforo de calcio (AAS+I).....	184
Fig. 42.-	Grupo B: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de los distintos eicosanoides tras el estímulo con ionóforo de calcio (I) y AAS + ionóforo de calcio (AAS+I).....	185
Fig. 43.-	Grupo C: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de los distintos eicosanoides tras el estímulo con ionóforo de calcio (I) y AAS + ionóforo de calcio (AAS+I).....	186
Fig. 44.-	Grupo D: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de los distintos eicosanoides tras el estímulo con ionóforo de calcio (I) y AAS + ionóforo de calcio (AAS+I).....	187
Fig. 45.-	Grupo E: representación de las medias y D.S. de los log. de la producción de los distintos eicosanoides tras el estímulo con ionóforo de calcio (I) y AAS + ionóforo de calcio (AAS+I).....	188
Fig. 46.-	Producción de $LTB_4$ . Comparación del grupo control A con los grupos B, C, D, y E, basal y tras los distintos estímulos.....	189
Fig. 47.-	Producción de $LTC_4/D_4/E_4$ . Comparación del grupo control A con los grupos B, C, D, y E, basal y tras los distintos estímulos.....	190
Fig. 48.-	Producción de $PGD_2$ . Comparación del grupo control A con los grupos B, C, D, y E, basal y tras los distintos estímulos.....	191
Fig. 49.-	Producción de $TxB_2$ . Comparación del grupo control A con los grupos B, C, D, y E, basal y tras los distintos estímulos.....	192
Fig. 50.-	Comparación de la producción de	

	eicosanoides entre el grupo A (controles sanos) y el grupo B (asma polínico). Diferencias significativas.....	193
Fig. 51.-	Comparación de la producción de eicosanoides entre el grupo A (controles sanos) y el grupo C (asma intrínseco moderado). Diferencias significativas....	194
Fig. 52.-	Comparación de la producción de eicosanoides entre el grupo A (controles sanos) y el grupo D (asma intrínseco severo). Diferencias significativas.....	195
Fig. 53.-	Comparación de la producción de eicosanoides entre el grupo A (controles sanos) y el grupo E (asma intrínseco con intolerancia a A.I.N.E.). Diferencias significativas.....	196
XII .-	INDICE DE TABLAS.....	197
Tabla I .-	Mediadores activos sobre vasos y músculo liso.....	198
Tabla II .-	Mediadores enzimáticos.....	200
Tabla III.-	Mediadores quimiotácticos.....	201
Tabla IV .-	Mediadores implicados en la patogénesis del asma humana.....	204
Tabla V .-	Protocolo empleado para el diagnóstico de intolerancia a A.I.N.E.....	205
Tabla VI .-	Eicosanoides encontrados en tejidos y células humanas.....	207
Tabla VII.-	Factores liberados por macrófagos y monocitos que pueden influir en el asma..	208
Tabla VIII-	Actividades de los metabolitos del A.A. producidos por la vía ciclooxygenasa.....	209
Tabla IX .-	Actividades de los metabolitos del A.A. producidos por la vía lipooxygenasa.....	210
Tabla X .-	Eicosanoides encontrados en enfermedades alérgicas humanas.....	212
Tabla XI .-	Características clínicas de los pacientes del grupo A (sanos).....	213
Tabla XII.-	Características clínicas de los pacientes del grupo B (polínicos).....	214
Tabla XIII-	Características clínicas de los pacientes	

	del grupo C (asma intrínseco moderado)...	215
Tabla XIV.-	Características clínicas de los pacientes del grupo D (asma intrínseco severo).....	216
Tabla XV .-	Características clínicas de los pacientes del grupo E (asma intrínseco con intolerancia a A.I.N.E.).....	217
Tabla XVI.-	Provocaciones con A.I.N.E. en los pacientes del grupo E.....	218
Tabla XVII.	Comprobación de la capacidad de los monocitos para liberar eicosanoides.....	219
Tabla XVIII.	Número de células sembradas por pocillo en cada uno de los pacientes de los cinco grupos.....	220
Tabla XIX.-	Niveles de eicosanoides obtenidos en el grupo A.....	221
Tabla XX .-	Niveles de eicosanoides obtenidos en el grupo B.....	222
Tabla XXI.-	Niveles de eicosanoides obtenidos en el grupo C.....	223
Tabla XXII-	Niveles de eicosanoides obtenidos en el grupo D.....	224
Tabla XXIII.	Niveles de eicosanoides obtenidos en el grupo E.....	225
Tabla XXIV-	Incremento en la producción de eicosanoides respecto a la basal en los diferentes grupos, tras los estímulos empleados. Diferencias significativas....	226
Tabla XXV.-	Resumen de la significación estadística de la producción de eicosanoides tras el estímulo con ionóforo de calcio y AAS + ionóforo de calcio en los distintos grupos.....	227
XII.-	BIBLIOGRAFIA.....	228

## II.- DEDICATORIA

A MI MADRE Y HERMANA

A MI PADRE "in memoriam"

### III.- AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis que se presenta para optar al grado de Doctora en Medicina es fruto, en primer lugar, de una experiencia clínica adquirida a lo largo de muchos años de trabajo en la Sección de Alergología del Hospital General Gregorio Marañón de Madrid, en los que he aprendido de todos los compañeros con los que he compartido dicho trabajo, y en segundo lugar, de la experiencia y enseñanza recibida de los miembros del Departamento de Medicina Experimental del mismo Hospital. A todos quiero expresar mi agradecimiento, y desearía no olvidar a ninguno de ellos:

- Prof. Dr. D. Angel Ortega Núñez, amigo y maestro en todos los campos de la Medicina y codirector de esta Tesis.

- Prof. Dr. D. Amador Schüller Pérez, de quien he recibido lecciones magistrales, codirector de esta Tesis.

- Dr. D. Pedro García Barreno, que me facilitó el trabajo en el Departamento de Medicina Experimental.

- Dr. D. Jorge Moscat Guillén, sin cuya eficaz guía no hubiese podido realizarlo.

- Todos los médicos de la Sección de Alergología del Hospital General Gregorio Marañón de Madrid, por su constante apoyo, amistad y magnífica colaboración laboral.

- Dr. D. Juan Francisco del Cañizo López, asesor constante del estudio estadístico.

- Por último, al Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, por la concesión de la Beca 89/0007 que ha posibilitado la realización del presente trabajo.

#### **IV.- ABREVIATURAS EMPLEADAS**

A.A.	Acido Araquidónico
A.A.S.	Acido acetilsalicílico
A.I.N.E.	Antiinflamatorios no esteroideos
AGEP	Acetilglicerilfosforilcolina
AMP	Adenosín monofosfato
AMP-c	Adenosín monofosfato cíclico
ATP	Adenosín trifosfato
C <sub>1</sub>	Fragmento 1 del complemento
C <sub>2</sub>	Fragmento 2 del complemento
C <sub>3</sub>	Fragmento 3 del complemento
C <sub>3a</sub>	Anafilotoxina del fragmento 3 del complemento
C <sub>3b</sub>	Fracción b del fragmento 3 del complemento
C <sub>4</sub>	Fragmento 4 del complemento
C <sub>5a</sub>	Anafilotoxina del fragmento 5 del complemento
CGDS	Cromoglicato disódico
CH <sub>50</sub>	Capacidad hemolítica del complemento al 50%
cpm	Cuentas por minuto
CTMC	Célula cebada del tejido conectivo
DAG	1,2-diacilglicerol
DHA	Dihidroalprenolol
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECF-A	Factor quimiotáctico de los eosinófilos de la anafilaxia
ECP	Proteína catiónica del eosinófilo
ETOH	Etanol
FEM	Flujo expiratorio máximo
FEV <sub>1</sub>	Volúmen expiratorio forzado en el primer segundo
FVC	Capacidad vital forzada
g	Unidad de campo centrífugo relativo
H.B.	Hiperreactividad bronquial
HBSS	Solución salina balanceada de Hank
HETE	Acido hidroxieicosatetraenoico
HPETE	Acido hidroperoxieicosatetraenoico
IF-A	Factor inflamatorio de la anafilaxia
IgE	Inmunoglobulina E
IgE-Fc	Fragmento C de la inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgG <sub>4</sub>	Inmunoglobulina G, subclase 4
Ionof	Ionóforo de calcio A-23187
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
LBA	Lavado broncoalveolar
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub>	Leucotrieno C <sub>4</sub>
LTD <sub>4</sub>	Leucotrieno D <sub>4</sub>
LTE <sub>4</sub>	Leucotrieno E <sub>4</sub>
LTS	Leucotrienos
LXA	Lipoxina A

LXB	Lipoxina B
MMC	Célula cebada de mucosa
MMEF	Máximo flujo medio expiratorio
NANC	Actividad inhibitoria no adrenérgica, no colinérgica
NCF	Factor quimiotáctico de neutrófilos
NCF-HMW	Factor quimiotáctico de neutrófilos de alto peso molecular
PAF	Factor agregante de plaquetas
PBM	Proteína básica mayor del eosinófilo
PBS	Buffer fosfato salino
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandina D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandina F <sub>2</sub> alfa
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandina I <sub>2</sub>
PGs	Prostaglandinas
PI	Fosfoinosítidos
rpm	Revoluciones por minuto
SRS-A	Sustancia de reacción lenta de la anafilaxia
TxA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
TxB <sub>2</sub>	Tromboxano B <sub>2</sub>
Txs	Tromboxanos
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
VRS	Virus respiratorio sincitial

**V.- INTRODUCCION**

**Revisiones Bibliográficas**

## ASMA BRONQUIAL.

### 1.-DEFINICION.

A pesar de que el término asma como designación de una enfermedad disneíca fué utilizado por los griegos, no existe en la actualidad una definición satisfactoria de esta enfermedad, debido fundamentalmente a que tampoco se conoce su fisiopatología a la perfección. Las definiciones más recientes se extienden en una serie de explicaciones, que sólo traducen este desconocimiento. Las más satisfactorias son las siguientes:

En 1962 (1) el **Comité de Estandarización Diagnóstica de la Sociedad Torácica Americana** la define como:

"Asma es una enfermedad caracterizada por un incremento de la respuesta de la tráquea y bronquios frente a una variedad de estímulos, manifestada por extenso estrechamiento de las vías aéreas que cambia en severidad bien espontáneamente o como resultado del tratamiento. El término asma no es apropiado para el estrechamiento bronquial que resulta de infección bronquial (bronquitis aguda o crónica), de enfermedad obstructiva pulmonar (enfisema) o de alteraciones cardiovasculares". El asma, como es definido aquí, puede ocurrir en sujetos con otras enfermedades broncopulmonares o cardiovasculares, pero en estas circunstancias la obstrucción de las vías aéreas no está relacionada de forma causal con estas enfermedades.

Sin embargo, esta definición no fué aceptada por el grupo de la Fundación Ciba, porque la define como "enfermedad".

Más recientemente un grupo de expertos de la **Fundación de Alergia de América** ha elaborado estas definiciones y propone una

serie de criterios diagnósticos.(2):

"El asma se define como episodios recurrentes de sibilancias o disnea, caracterizados por un incremento significativo en la resistencia al flujo aéreo. Bien espontáneamente o mediante tratamiento, se alcanzan períodos de remisión completa o casi completa de síntomas acompañados de una disminución sustancial de la resistencia al flujo aéreo".

Una persona se dirá que padece asma cuando se encuentran los siguientes criterios:

- Episodios recurrentes de sibilancias o disnea.
- Demostración objetiva mediante pruebas de función pulmonar de aumento significativo de la resistencia al flujo aéreo durante los episodios, y de mejoría cuando el paciente está libre de síntomas espontáneamente o mediante tratamiento. Son aceptables varias medidas del flujo aéreo: capacidad vital forzada (FVC), volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV<sub>1</sub>), flujo espiratorio medio (FEM), o máximo flujo meso espiratorio (MMEF).

Se adopta de forma tentativa la siguiente estandarización: la medida del flujo debe ser menor de 50% del valor teórico normal durante un episodio asmático, mientras debe mejorar a más del 80% del teórico normal cuando el paciente está asintomático. Durante el tiempo en que el paciente está asintomático se debe utilizar la provocación con exposición al alérgeno, metacolina o ejercicio para demostrar la reducción requerida en la medida del flujo.

Estos criterios son los preferentes, pero cuando no se realizan pruebas funcionales respiratorias o los resultados no corresponden con los criterios estándares se pueden utilizar los

siguientes para un diagnóstico presuntivo de asma:

1. Episodios recurrentes de sibilancias o disnea, más uno o más de los criterios siguientes:

2. Durante los episodios, la existencia de dos o más signos diferentes de las pruebas de función pulmonar de incremento de la resistencia de vías aéreas, tales como respiración dificultosa, jadeo inspiratorio y espiratorio, retracciones inspiratorias, espiración forzada prolongada o uso de los músculos respiratorios accesorios, con desaparición de tales signos cuando el paciente está asintomático, bien espontáneamente o bajo un tratamiento óptimo.

3. Recuento total de eosinófilos sanguíneos sobre  $400/\text{mm}^3$  durante el tiempo en que el paciente presenta síntomas y no está siendo tratado con corticoides.

4.A. Historia de episodios inducidos o agravados al menos en dos ocasiones por exposición a un material alergénico reconocido, aparición o empeoramiento estacional de los síntomas, como en primavera, verano al menos durante dos años.

4.B. Pruebas cutáneas con aparición de pápula y eritema con una dilución apropiada y un extracto del material alergénico apropiado a la exposición específica o estacional (el término dilución apropiada se puede definir sólo a través de la experiencia de un extracto particular).

Se puede utilizar el término de probable asma cuando están presentes los criterios 1 y 4.A o cuando están presentes el 1 y 4.B, pero el criterio 4.A se ha encontrado sólo en una ocasión o sólo durante un año.

Se puede utilizar el término de posible asma cuando está

presente el criterio 1 y la historia sugiere que el criterio 2 se puede encontrar durante un episodio, pero dicho episodio no ha sido presenciado por un médico.

A continuación la Fundación de Alergia de América cita una lista de posibles alérgenos.

En 1981 (3) un **Comité de la Sociedad Torácica Americana** ha propuesto la siguiente definición modificada de la dada en 1962:

"La característica primaria de los individuos asmáticos es la obstrucción reversible y episódica de las vías aéreas".

El término reversible se refiere a :

- En el momento de la obstrucción el sujeto debería mostrar mejoría de los test utilizados para medir la reversibilidad de más de dos desviaciones estándar.

- Se deben utilizar corticoides como prueba antes de llegar a la conclusión de que la obstrucción es irreversible.

La obstrucción de las vías aéreas:

- Se puede manifestar como tos periódica, opresión torácica, sibilancias o disnea o prácticamente sin síntomas.

- Se asocia con aumento de la respuesta de la tráquea y bronquios a varios estímulos, mediados por sustancias tales como metacolina o histamina.

- Está asociado con cambios en la severidad que puede ocurrir tanto de forma espontánea como tras tratamiento.

Vuelven a insistir en que la palabra asma no es apropiada para indicar el estrechamiento bronquial que resulta sólo de infección bronquial o enfermedad cardiovascular. El asma se puede presentar en pacientes con otras enfermedades broncopulmonares

o cardiovasculares, pero en estos casos la obstrucción de las vías aéreas no está relacionada de forma causal con estas enfermedades.

El defecto básico del asma parece ser una alteración en el huésped que periódicamente conduce a una contracción excesiva del músculo liso e hipersecreción de moco en el árbol bronquial y a edema de la mucosa. En algunas circunstancias el defecto del huésped parece estar claramente relacionado con un estado inmunológico alterado que afecta a la IgE (reaginas) o incluso IgG, pero en otros la causa subyacente del defecto no puede ser determinada. Puede servir de ayuda en la identificación del asma alérgico la historia personal o familiar de manifestaciones alérgicas.

Varios estímulos pueden iniciar la obstrucción de las vías aéreas en sujetos susceptibles. La obstrucción puede resultar de inhalación de alérgenos, ingestión de alimentos o drogas, o inyecciones. A veces parecen iniciar o exacerbar el episodio las infecciones agudas del tracto respiratorio superior, o reacciones emocionales, y otras veces parecen ser responsables dos o más de estos factores conjuntamente. En otras ocasiones no se pueden descubrir los estímulos iniciadores de algunos episodios.

Se debe diferenciar del asma un estado transitorio de hiperreactividad, que es inducido por factores temporales tales como la administración de vacunas virícas, bronquiolitis o agentes sensibilizantes específicos en un tiempo concreto.

En conclusión, el asma es una enfermedad de obstrucción difusa, no uniforme de las vías aéreas que varía ampliamente en severidad, tanto de forma espontánea como mediante tratamiento.

Los pacientes con asma tienen eosinofilia en sangre o esputo cuando la enfermedad es activa.

Este concepto de asma sirve como definición descriptiva y operacional, sin especificar causa o patogénesis. En un simposium de expertos, al cabo de tres días de discusión, concluyeron que no se puede definir el asma con los conocimientos actuales.

## 2.- FISIOPATOLOGIA.

Tradicionalmente, se ha concedido la mayor importancia como factor primordial del asma a la contracción del músculo liso bronquial, el broncospasmo, palabra que incluso ha sido utilizada como sinónimo de asma, y a la hiperreactividad bronquial (los bronquios de los asmáticos son extremadamente sensibles a determinados estímulos, mucho más que los de las personas "normales"). Sin embargo, en los últimos años se está destacando la importancia del componente inflamatorio de la obstrucción bronquial, y del papel de los eosinófilos como contribuyentes a esta inflamación.

El asma se traduce a nivel anatomo patológico por los siguientes componentes: broncoespasmo, edema de la mucosa, infiltrados celulares, secreción de moco, descamación de las células epiteliales, engrosamiento de la membrana basal, e hiperplasia de la mucosa (4). A esta situación se puede llegar a partir de la clásica reacción IgE-antígeno (mecanismo inmunológico), o desde otras vías capaces de producir la contracción del músculo liso bronquial e inflamación.

## 2.1-MECANISMOS INMUNOLOGICOS

Clínicamente se traduce por la producción de una disminución del FEV<sub>1</sub>, al menos en un 20-25% sobre el valor basal, tras la inhalación del antígeno al que el individuo está sensibilizado. Esta disminución tiene lugar a los pocos minutos de la inhalación, es máximo a los treinta minutos y se recupera espontáneamente a las dos horas. Con mucha frecuencia esta primera reacción se sigue de una nueva caída del FEV<sub>1</sub>, que comienza a las tres o cuatro horas de la inhalación, es máxima a las seis u ocho horas y puede persistir durante veinticuatro o cuarenta y ocho horas o más, sin que en ningún momento se acompañe de síntomas sistémicos. Esta segunda fase de la reacción fué observada en 1917 y 1922 (5), aunque no ha sido reconocida hasta 1973-1976 (6-7). A la primera disminución del FEV<sub>1</sub> se conoce con el nombre de fase inmediata, y a la segunda, fase tardía de la reacción alérgica inmediata o anafiláctica de la clasificación clásica.

Esta reacción clásica inmediata o anafiláctica se inicia por la unión de un antígeno a dos moléculas de IgE unidas a la superficie de la célula cebada o de basófilos. Esta unión induce activación de enzimas asociados a la membrana, que produce la entrada de Calcio extracelular, y liberación subsecuente de histamina y otras sustancias denominadas mediadores químicos. Este proceso, sumamente complejo (fig 1), se puede resumir de la siguiente forma:

La unión del antígeno a dos moléculas de IgE activa los receptores de esta inmunoglobulina (8) que a su vez activa a una serie de enzimas asociados a la membrana, tales como serin-proteasa, 2 fosfolipasa C, metiltransferasas, y adenilato

ciclasa. La estimulación del turnover de fosfoinositidos (PI) resulta en una acumulación de 1,2-diacilglicerol (DAG) en la membrana plasmática y la liberación de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) en el citoplasma. El IP<sub>3</sub> puede producir movilización de calcio intracelular, y a su vez, el DAG activa la proteínquinasa C. El incremento del calcio intracelular y del DAG produce la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y de la DAG-lipasa, respectivamente. A través de la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, se generan ácidos grasos libres (la mayoría de los cuales es ácido araquidónico), y lisofosfatidilcolina. Mediante la activación de la fosfolipasa C y de la DAG-lipasa, se liberan Ac. araquidónico libre, monoacilglicerol y ac.lisofofatídico. Todos estos productos son activos fusógenos de membrana, que pueden facilitar la fusión de la membrana de los gránulos de las células cebadas a la membrana celular, y la liberación de los mediadores químicos (9).

En este proceso también se activa otra enzima, la adenilato ciclasa. La activación de los receptores de IgE induce un incremento transitorio en el AMP cíclico intracelular, que alcanza un máximo a los 15-30 segundos (10,11). Se ha demostrado la activación simultánea de las metiltransferasas y del AMP en la membrana plasmática aislada (12). A su vez, la adenilato cilcasa activa a una proteínquinasa. Se ha demostrado por muchos investigadores que el incremento intracelular de AMP cíclico inhibe la liberación de histamina inducida por antígeno (13,14).

Podemos ver en las tablas I, II, y III, la acción resumida de los mediadores químicos producidos en esta reacción inmediata (15). Repasaremos a continuación aquellos que se han encontrado

implicados en el asma humano (tabla IV).

Se puede comprobar la producción de estos mediadores a nivel humano mediante la inducción experimental de asma, tras la provocación con el antígeno al que el sujeto está sensibilizado. En muchos casos es difícil comprobar la presencia de estos mediadores bien por problemas técnicos, o por la labilidad de los mismos. Es posible que este asma experimental no se desarrolle exactamente igual que el asma "natural", pero resulta útil para estudiar la secuencia de liberación de mediadores, su relación con las manifestaciones clínicas y la alteración que produce en la función pulmonar.

Mediante esta técnica se ha podido precisar que en las crisis asmáticas se produce un aumento de los niveles de histamina (16,17) y un incremento serico de NCF-HMW, paralelo al grado de broncoespasmo inducido (18), iniciándose entre uno y cinco minutos después de la provocación. El nivel de NC-HMW alcanza un pico de actividad máxima entre los cinco a quince minutos, aunque su acción persiste durante horas tras el estímulo (18). Asociado a su liberación se produce leucocitosis y neutrofilia transitoria e igual secuencia se encuentra tras la inhalación de agua destilada (19), en el asma inducida por el ejercicio (20) y tras la ingesta de aspirina (21). Este incremento en NCF-HMW y de leucocitos no se produce tras el broncoespasmo inducido por metacolina (18,22) indicando con ello que no es consecuencia de la broncoconstricción.

También se ha comprobado que paralelamente al incremento de NCF-HMW se sigue un incremento de los receptores para  $C_3b$  en los neutrófilos y monocitos circulantes (23), fenómeno que no se

objetiva en el broncoespasmo inducido por la histamina, pero sí en el broncoespasmo inducido por el ejercicio (20).

Se ha demostrado que en el asma inducido por la inhalación de antígeno no se producen alteraciones de  $C_3$  ni  $C_4$  ni hay incremento en el nivel de complejos inmunes circulantes (18). Recientemente se ha demostrado aumento de PAF en sangre venosa a las 6 h. de la provocación inhalativa (24).

La acción de estos mediadores y de los restantes, de cuya liberación se tiene evidencia indirecta, conduce a una reacción alérgica "clásica" que aparece en minutos, persiste de treinta a sesenta minutos, y se sigue de una fase tardía inflamatoria, que ocurre a las cuatro-ocho horas (reacción dual). Parece que en esta fase tiene importancia el AGEP o PAF (25) y se detecta un segundo pico de NCF-HMW (18,26,27). Esta respuesta tardía ha podido ser estudiada histológicamente a nivel cutáneo, infiriendo sus resultados a lo que sucede en el pulmón humano, donde es difícil poder objetivarlo. En la fase tardía es más patente la inflamación con aflujo de eosinófilos, neutrófilos, linfocitos, basófilos y monocitos (28). La proporción relativa de cada tipo celular depende del estímulo empleado y el tiempo transcurrido. A nivel vascular se observa vasodilatación e infiltrado perivascular, hialización del endotelio y a veces discreta hemorragia y necrosis, pero nunca con la intensidad con que ocurre con la reacción de tipo Arthus (29). El infiltrado celular probablemente responde a la liberación de mediadores ECF-A (30,31) NCF (27) IF-A (32)  $LTB_4$  y otros derivados del ácido araquidónico (A.A) (33).

La producción de broncoconstricción inmediata y tardía tras

la provocación inhalativa puede ser bloqueada mediante medicación con CGDS (34) considerando como estabilizador de la membrana del mastocito. Este resultado implica que la célula cebada participa en el desarrollo de ambas fases de la respuesta pulmonar dual . Por el contrario, los corticoides no tienen efecto sobre la fase inmediata pero sí bloquean el desarrollo de la tardía (34) lo que parece sugerir el papel que desarrollan los derivados del AA en esta fase. Este componente tardío no responde con igual eficacia a los broncodilatadores agonistas beta adrenérgicos como la fase inicial.

A nivel teórico se postula la siguiente secuencia de acontecimientos en la producción de la reacción dual: la degranulación de células cebadas conduce a la liberación rápida de una variedad de **mediadores**, incluyendo **histamina, derivados de AA, bradiquinina y factores quimiotácticos**, que producen vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y atracción inicial de polimorfonucleares. Los gránulos de la matriz de las células cebadas proporcionan una fuente adicional continua de mediadores, que aparecen a los largo de horas. Es de gran interés un mediador asociado a los gránulos, el **factor inflamatorio de la anafilaxia (IF-A)**, que se ha demostrado induce el infiltrado celular característico de la fase tardía de la reacción. Y en esta fase tardía se destaca el papel importante que puede desarrollar el eosinófilo, atraído por el PAF y otros mediadores, que libera proteína básica mayor(PBM) capaz de lesionar el epitellio, bién por sí misma o interfiriendo en la acción del factor relajante derivado del epitelio (35).

### 2.1.1- Células implicadas.

Determinadas células poseen receptores para el fragmento Fc de la IgE, como las células cebadas, basófilos, macrófagos (36,37), monocitos (38), eosinófilos (39), linfocitos (38) y plaquetas (40). Las células cebadas y los basófilos poseen receptores de alta afinidad (41,42), en tanto que a los de las otras células son de baja afinidad.

Las **células cebadas** y los **basófilos** son miembros de una familia heterogénea de células, con importantes características comunes. Dentro de las células cebadas se distingue en la actualidad dos subpoblaciones, estudiadas fundamentalmente en animales de experimentación: las células cebadas de la mucosa (MMC) y las del tejido conectivo (CTMC) (43,44). En el hombre se ha podido estudiar a nivel de tejidos, donde parece que existe también estas diferencias (45,46), aunque no se conoce muy bien su situación. En una primera evaluación se ha considerado que a nivel de pulmón predominan las células semejantes a las MMC en el epitelio y parénquima, así como en la lámina propia, en tanto que en la submucosa predominan las CTMC en proporción 2/1 (47). Además de existir diferencias en el contenido de mediadores, se comportan de forma diferente frente a los fármacos.

También dentro de los basófilos humanos parece existir dos subpoblaciones, con diferente contenido en histamina (48),

En el caso de los **macrófagos** el puenteo de dímeros de IgE unidos a su superficie induce la liberación de su contenido en enzimas lisosomales, anión superóxido, otros radicales oxígeno altamente destructivos, segrega interleuquina 1, y productos del metabolismo del ácido araquidónico, en general leucotrienos (49)-

Tanto los macrófagos pulmonares como los peritoneales son ricos productores de  $LTC_4$ .

Al igual que ocurre con los macrófagos, el receptor de IgE del **eosinófilo** es de baja afinidad. La intervención de esta célula en la producción y/o modulación de la inflamación en el asma es importante. Por un lado, se ha demostrado que los característicos cristales de Charcot-Leyden, que se encuentran en el esputo de los asmáticos, están formados por lisofosfolipasa (50), enzima que se localiza en la membrana del eosinófilo (51). Por otro lado, se ha demostrado que la proteína básica mayor (PBM) del eosinófilo, que es muy tóxica para el epitelio de la vía aérea (52) produciendo lesiones similares a las encontradas en el asma, ha sido detectada en el esputo y en la membrana basal de los bronquios de pacientes asmáticos fallecidos en status (53). También se ha detectado otra enzima, la ECP (proteína catiónica del eosinófilo), que se encuentra aumentada en el suero de los asmáticos, tras la provocación bronquial (54). Además, el eosinófilo produce  $LTC_4$  sugiriendo este hecho que puede inducir broncoespasmo directamente (55).

Las **plaquetas** parecen tener receptores de baja afinidad para IgE. Estas células son atraídas al lugar de la reacción por el PAF, que las agrega, y en virtud de su agregación y de la unión de la IgE ligada a su pared con el antígeno, liberan **serotonina** y factor plaquetario IV (43).

Todas estas células, especialmente las células cebadas y los basófilos, van a liberar los mediadores químicos, tras realizarse la unión IgE-antígeno. Existe evidencia de que la  $IgG_4$  puede mediar la degranulación de las células cebadas, aunque

probablemente con menos eficacia que la IgE (56).

En la actualidad se está comprobando la presencia y acción de algunas de estas células en el pulmón de pacientes asmáticos, tras la provocación con el antígeno al que están sensibilizados. Así, haciendo lavados broncoalveolares (LBA) se ha visto la presencia de eosinófilos , contados antes de la provocación inhalativa y, tras ésta, o tras la instilación local de antígeno y se observa que los eosinófilos se encuentran degranulados (57), además de encontrarse aumentados en su recuento con respecto a los controles sanos. También se encuentran incrementados hasta cinco veces el número de células cebadas (58) que son capaces de liberar sus mediadores frente a diversos estímulos con mayor facilidad que los mastocitos de sujetos normales.

Y, por supuesto, en el pulmón se encuentran macrófagos , alveolares y vasculares intersticiales. Los macrófagos alveolares constituyen el 90% de todas las células del LBA de individuos sanos. Además de su intervención en fagocitosis , en la expresión de mediadores , y procesamiento de antígenos, su posición anatómica les hace ocupar un lugar preeminente en la superficie de interfase del pulmón humano (59). Aunque se acepte generalmente que la reacción de hipersensibilidad inmediata se inicia en el pulmón por la interacción antígeno-IgE unida a las células cebadas, menos del 1% de las células de la luz bronquial humana son células cebadas (60). La naturaleza predominante de los macrófagos alveolares en las vías aéreas sugiere que estas células tienen una implicación precoz que conduce a la activación de las células cebadas.

Aunque no contienen receptores para IgE, está actualmente

en debate la participación de las **células epiteliales bronquiales** en el asma. Se ha comprobado mediante biopsias y en estudio postmortem que el epitelio está erosionado, encontrándose células epiteliales desprendidas. Se estima hoy que este efecto se produce por acción de la PBM del eosinófilo (35). Pero es también importante conocer que estas células producen un factor/s relajante sobre la musculatura lisa (61) cuyo papel puede ser importante en el mantenimiento fisiológico del calibre de las vías aéreas.

## **2.2.- OTRAS VIAS.**

Existen numerosos casos de asma, especialmente entre los adultos (asma intrínseco), en los que no es posible demostrar la mediación por IgE. Sin embargo, en estos casos, la histopatología, fisiología y respuesta al tratamiento farmacológico es totalmente indistinguible del asma extrínseco. Es posible que exista mecanismo de autoperpetuación, de desarrollo de hiperreactividad bronquial (HB) diferente a la exposición antigénica. Y para explicarlo, se han emitido diferentes hipótesis.

### **2.2.1- Infecciones víricas.**

Muchos pacientes con asma intrínseco relatan el comienzo de su enfermedad en relación a una infección respiratoria aguda.

La relación entre infecciones virales e inducción de crisis asmáticas comenzó a ser estudiada en 1967 por Mc Intosh y colaboradores (62) en niños, comprobados por otros autores (63,64) y ampliada a adultos (65). Los virus implicados son:

virus respiratorio sincitial, rinovirus, influenza y el micoplasma pneumoniae (66). La conclusión de estos estudios fué que las infecciones virales precipitan crisis asmáticas con mucha mayor frecuencia en niños menores de diez años que en adultos, en tanto que las infecciones bacterianas no guardan relación. Pero es posible que no solamente precipiten crisis asmáticas, sino que las infecciones virales pueden ser causantes de la iniciación del asma. Este es el caso de los niños que han padecido bronquiolitis: una parte de ellos se recuperan totalmente, pero para el 30-50% de los niños la bronquiolitis inicial se sigue de episodios recurrentes de disnea con infecciones víricas respiratorias subsiguientes. Los pacientes más susceptibles de episodios recurrentes de disnea tienen antecedentes familiares de enfermedades alérgicas, sin que se sepa todavía la explicación exacta de su patogénesis.

Para intentar aclararla se han llevado a cabo estudios en sujetos sanos, a los que se le induce infecciones respiratorias de vías superiores, siguiendo las posibles alteraciones que se producen en su función pulmonar (67,68).

Empey y colaboradores (69) midieron las variaciones en la hiperreactividad bronquial en de sujetos sanos infectados con virus de vías respiratorias superiores, llegando a la conclusión que un infección respiratoria vírica común produce un incremento marcado en la hiperreactividad bronquial, que puede persistir en algunos casos durante seis semanas. Esta experiencia ha sido repetida , obteniéndose resultados similares (70). La producción de esta hiperreactividad ha sido explicada por varias teorías. Una de ellas es que los virus respiratorios lesionan el epitelio

bronquial y sensibilizan las fibras sensoriales del vago de adaptación rápida., cuyos receptores aferentes están localizados en el subepitelio de las vías aéreas mayores. Ello daría lugar a que se desencadenase un reflejo vagal frente a cualquier estímulo. Esta teoría parece avalada por el hecho que este tipo de hiperreactividad puede ser prevenida por la administración de atropina (71).

Otra teoría es que la hiperreactividad inducida por virus se produce por la liberación de mediadores químicos, ya que se ha comprobado que se produce IgE específica frente al virus respiratorio sincitial (VRS) (71). En este estudio se encontró que los niveles de IgE específica eran mayores en los casos en los que la infección cursaba con disnea. Ello induce a pensar que la reacción IgE-VRS produce liberación de mediadores y obstrucción de las vías aéreas. Sin embargo, es sabido que para que haya broncoconstricción es necesario algo más que la sólo liberación de mediadores, y en este caso concreto, este algo más es la inflamación producida por el virus.

Pero también se ha atribuido el desarrollo de hiperreactividad por virus a la inducción de bloqueo beta-adrenérgico, como se ha comprobado que se produce en los granulocitos cultivados con virus respiratorios (72).

Otros autores (73) han comprobado "in vitro" que los virus respiratorios producen un aumento en la liberación de mediadores químicos por los leucocitos, especialmente por los basófilos. Además de la liberación de mediadores broncomotores tendría lugar también un aumento en la quimiotaxis (74), aumentando la inflamación.

Así pues, en el caso de la hiperreactividad inducida por infecciones víricas existen varias teorías explicativas, todas ellas avaladas por estudios experimentales y es probable que estos hechos sean complementarios, no excluyentes.

#### 2.2.2- Teoría del bloqueo beta-adrenérgico.

Szentivany (75) propuso que una reducción en la función de los receptores beta adrenérgicos de las vías aéreas de los asmáticos podría explicar la mayoría de las características del asma, incluyendo la hiperreactividad bronquial inespecífica. Sugirió que esta depresión de la función beta disminuiría la efectividad de los reflejos parasimpáticos que usualmente producen broncodilatación compensadora y esta anomalía tenía como resultado que las vías aéreas fueran hiperreactivas a los agentes broncoconstrictores.

Esta teoría ha dado lugar a múltiples trabajos experimentales, tanto en animales como en el hombre. Utilizando animales no se ha conseguido demostrarlo (76,77), pues parece que la actividad de los reflejos simpáticos endógenos bronquiales varían ampliamente según las distintas especies. Además no se ha observado que se produzca hiperreactividad permanente en los animales utilizados normalmente como modelos de asma (78).

En el hombre se han realizado diversos estudios sobre los receptores beta que poseen los linfocitos y neutrófilos . Parker y Smith (79) demostraron que tanto los cultivos linfocitarios como los cultivos mixtos linfocitos-neutrófilos de los asmáticos generaban menor cantidad de AMP en respuesta a la isoprenalina que los sujetos normales; además, este fenómeno estaba más

acentuado en los pacientes con asma crónico severo, y la respuesta se hacía prácticamente normal cuando el asma mejoraba. Sin embargo, otros investigadores han demostrado que la exposición repetida a los agonistas beta en los sujetos no asmáticos hacía disminuir la respuesta de los receptores beta en los leucocitos (80) por lo que se puede deducir que los hallazgos de Parker y Smith pueden ser atribuibles tanto a la terapia con beta agonistas como a la enfermedad en sí (81,82).

Se han realizado estudios similares utilizando 3dihidroalprenolol (DHA), que se une a los receptores beta de forma específica. Con esta técnica se ha encontrado que los receptores de la membrana de los linfocitos estaban disminuidos en los asmáticos que no recibían tratamiento con beta agonistas (83,84). Además se ha hallado que la densidad de los receptores beta de los linfocitos disminuye en proporción directa con la severidad de la obstrucción de las vías aéreas en pacientes que no recibían terapia beta agonista (84). Pero es posible que esta disminución pueda ser debida a otros tratamiento como corticoides y teofilinas.

Otros autores como Galant y colaboradores (85) han encontrado que los sujetos normales y los asintomáticos que no reciben tratamiento con beta agonistas tienen receptores beta en densidad normal, mientras que los que han sido sometidos a medicación tienen una reducción mayor del 70%, en tanto que las constantes de disociación para la unión con DHA son similares en los tres grupos. Estos autores propusieron la idea de que la terapia con beta agonistas produce una "down regulation" de los receptores beta. Así mismo (86) encontraron que la densidad de

los receptores beta volvía a la normalidad una semana después de suspender el tratamiento, por lo que añadieron a su concepto primitivo la idea de que la "down regulation" de los receptores beta era reversible, y se producía más como resultado de la terapia que como carácter intrínseco de la enfermedad.

Sin embargo a estos hallazgos se pueden oponer otros conceptos, igualmente ciertos en apariencia, como es el hecho de que los pacientes que reciben tratamiento con beta agonistas presentan obstrucción más severa de las vías aéreas que los que no la reciben. Y por otra parte, es posible que no sean superponibles los estudios realizados en leucocitos con los hechos en las vías aéreas. Por ejemplo, el tratamiento con terbutalina durante dos semanas causa una reducción del 85% de los lugares de unión del DHA con los receptores de los leucocitos, pero el tratamiento crónico con esta droga, que conduce a exposición crónica de los receptores beta bronquiales, no parece alterar de forma significativa la función de las vías aéreas. (87)

También se han esgrimido razones histológicas en contra de esta teoría. Patterson y colaboradores (88) no encontraron evidencia de hiperreactividad en el músculo bronquial aislado de pacientes asmáticos "post mortem", obteniendo iguales resultados en los que estaban sometidos a tratamiento con beta adrenérgicos como los que no lo estaban. E igual ocurre con preparaciones de tráquea aislada de cobayas con asma inducido de forma experimental.

En otros estudios se ha intentado reproducir la disfunción de los receptores beta administrando propanolol a sujetos sanos

sin conseguirlo (89), por lo que se llegó a la conclusión de que no es ésta la causa más importante de hiperreactividad bronquial inespecífica, aunque es posible que las dosis y vías de administración del propanolol que utilizaron en este estudio no hayan sido las suficientes ni las adecuadas.

También se ha pensado que la disminución de receptores beta podría ser debida a la presencia de autoanticuerpos para los receptores beta. Sin embargo, los estudios realizados para comprobar esta teoría solamente han encontrado dichos autoanticuerpos en un 9% de los casos, que quizá sean secundarios a la propia enfermedad, y se correlacionan con la gravedad de la misma (90).

### 2.2.3 - Alteración de la actividad inhibitoria no adrenérgica, no colinérgica (NANC).

Se conoce desde hace tiempo la existencia de este sistema inhibitor no adrenérgico en el tracto gastrointestinal, sistema que cuando es estimulado produce la relajación del músculo liso. A nivel intestinal se considera que la ausencia de este sistema está asociado a la enfermedad de Hirschprung.

Estudios recientes sugieren que en las vías aéreas, incluidas las del hombre, existe un sistema similar que puede ser el responsable principal de la producción de la broncodilatación y su ausencia podría conducir al broncoespasmo (91).

Aunque no se han identificado completamente los neurotransmisores del sistema NANC parece existir evidencia de que son neuropéptidos, de los cuales se están describiendo un creciente número (92). El péptido presente en mayor concentración

en las vías aéreas humanas, determinado por radioinmunoensayo, es el VIP (93) que parece ser el neurotransmisor de los nervios inhibidores no adrenérgicos. Incluso parece que es capaz de regular la secreción de mediadores por las células cebadas (94). Este péptido de 28 aminoácidos se ha localizado tanto en pulmón de animales de experimentación como en humanos, en las neuronas y terminaciones nerviosas del músculo liso de las vías aéreas, especialmente en las superiores, alrededor de las glándulas mucosas, cerca de las células epiteliales de las vías aéreas y en los vasos bronquiales y pulmonares (93,95). La estimulación de los receptores de VIP activa la adenilato ciclasa, aumentando el contenido de AMP de los pulmones y la tráquea (96), con efecto similar a la activación por beta agonistas, por lo que se ha postulado que una deficiencia de los receptores VIP en las vías aéreas de los pacientes asmáticos puede ser uno de los mecanismos de producción de asma. En los animales de experimentación el VIP protege frente a la broncoconstricción inducida por histamina (97,98) pero en el hombre, administrado por vía inhalatoria, no tiene este efecto (99). Si se administra por vía i.v. protege relativamente poco (100) frente a estos estímulos en pacientes asmáticos. Además su efecto broncodilatador en el asma severa es menos marcado que el de los beta agonistas (101). Por estas razones existen dudas de que realmente juegue algún papel importante en el asma.

Los nervios excitadores no colinérgicos parece que están mediados por el neurotransmisor **sustancia P**. Este sistema produce broncoconstricción "in vitro", que no es inhibida por la atropina (102), pero parece que su actividad es mínima a nivel humano.

#### 2.2.4 -Alteración en la regulación de la concentración intracelular de Calcio.

Son numerosos los estudios que han establecido el importante papel que tiene el calcio como mensajero intracelular para la respuesta de muchos tipos de células frente a diversos estímulos. En el caso que nos ocupa, se consideran fenómenos dependientes de calcio la contracción del músculo liso, la liberación de mediadores por las células cebadas y basófilos, la secreción mucosa, la iniciación y conducción del impulso nervioso, el movimiento de las células inflamatorias y la secreción de sustancias proinflamatorias por los macrófagos activados y los neutrófilos.

La teoría de que una posible alteración de la homeostasis del calcio juegue un papel importante en la patogénesis de la HB fué descrita por primera vez por Weiss y Viswanath en 1979 (103). La base de esta hipótesis fué el hallazgo de una sensibilidad incrementada al calcio extracelular de la tensión isométrica de reposo que sigue a la anafilaxia "in vitro" de la tráquea del cobaya. Según esta teoría, el fenómeno final unitario de la HB sería una regulación alterada del control de la concentración del calcio libre intracelular, que haría que todas las células implicadas en la patogénesis del asma fuesen hiperreactivas al estímulo dependiente del calcio (104). Los estudios "in vitro" llevados a cabo en este sentido parecen ligar el efecto del calcio al de los mediadores de la reacción anafiláctica (105).

Para comprobar esta teoría se han realizado estudios en pacientes asmáticos utilizando la acción de los bloqueantes de los canales de calcio, verapamil y nifedipina, sobre la respuesta

a histamina, metacolina y antígeno, y en animales de experimentación. En animales sí ha sido posible obtener una buena respuesta protectora con nifedipina (106). En el hombre, Catrina y colaboradores (107) han descrito la capacidad de la nifedipina para prevenir el broncoespasmo inducido por el ejercicio. Otros autores sólo han conseguido demostrar que este fármaco proporciona protección parcial en la broncoconstricción inducida por el aire frío (108) e histamina (109) y para otros, la protección obtenida es muy débil frente a histamina y metacolina (110,111). También se ha objetivado que ejerce protección frente al descenso nocturno del FEM (112). Pero los resultados han sido discordantes en la protección frente a la provocación con antígeno (113,114).

En conclusión, los efectos demostrados de estos bloqueantes de los canales de calcio son limitados, y en muchos casos las dosis necesarias para producir cambios en la contracción del músculo liso o la inhibición de mediadores son muy elevadas y sobrepasa los límites de utilización clínica. Es posible que los productos que se utilizan no sean los adecuados.

#### 2.2.5 -Inflamación y liberación de mediadores.

Es posible que los mediadores de la inflamación puedan jugar un papel importante en el desencadenamiento de la HB. Esta hipótesis es sugerida por el hecho de que estímulos que producen hiperreactividad bronquial, como son la exposición al ozono, fumar, infecciones virales y la inhalación de antígenos, también produce un cierto grado de inflamación de las vías aéreas. Además, el esputo de los pacientes con asma contiene a menudo

grupos de células epiteliales de las vías aéreas y neutrófilos, sugiriendo la presencia de una respuesta inflamatoria que afecta al menos a estos dos tipos celulares.

Los datos de los que disponemos en este momento son indirectos y basados sobre todo en la hiperreactividad inducida de forma experimental. Uno de estos modelos experimentales es el producido por la exposición al ozono, que causa inflamación de las vías aéreas caracterizadas por lesión epitelial y aflujo de neutrófilos (115). Es interesante señalar que la hiperreactividad inducida por este método es reversible en poco tiempo.

Se han llevado a cabo estudios en perros con hiperreactividad inducida por ozono (116) a los que se les practicaba lavados broncoalveolares. Se encontró un aumento en el número de células epiteliales de vías aéreas y de los neutrófilos, sin que ocurriesen cambios significativos en macrófagos, linfocitos o eosinófilos (117). Se ha investigado la secuencia de la liberación de mediadores requeridos para el desarrollo de inflamación e HB. El perfil de liberación de los productos de la vía lipooxigenasa que hallaron (118) fué en mayores cantidades de  $LTB_4$  (potente quimiotáctico de neutrófilos) y 15-HETE, junto con pequeñas cantidades de otros HETE y  $LTC_4$ . En los perros tratados con ozono, y a los que previamente se les había inducido neutropenia con hidroxiaurea, se desarrollaba un mínimo grado de HB, en comparación con los que no habían sido depleccionados de neutrófilos (119). Esta serie de experiencias ha llevado a postular que el daño epitelial es un acontecimiento inicial tras el tratamiento con ozono, y que esta lesión es independiente de los neutrófilos (119). Pero para que desarrolle

HB en este modelo animal es necesario que los neutrófilos sean activados y emigren al epitelio de la vía aérea (120). Se podría imaginar que tras la exposición a un estímulo inflamatorio se produce, en primer lugar, activación de las células epiteliales en la superficie de las vías aéreas; en segundo lugar, liberación de metabolitos del ácido araquidónico por la vía lipooxigenasa a partir de estas células epiteliales; tercero, estimulación de los neutrófilos por estos metabolitos, produciendo aflujo de neutrófilos al epitelio de la vía aérea y, finalmente, liberación de prostaglandinas o tromboxanos por los neutrófilos, que actúan sobre el músculo liso bronquial o sus terminaciones nerviosas para producir aumento de la reactividad (121). Se han obtenido hallazgos similares en cobayas utilizando diisocianato de tolueno (122).

También se han realizado estudios similares en el hombre, en los que se produce hiperreactividad (123) y han confirmado la asociación entre el aflujo selectivo de neutrófilos en las vías aéreas y el desarrollo de hiperreactividad (124). Sin embargo, a diferencia de lo sucedido en los perros, el lavado broncoalveolar no contenía aumento de células epiteliales. Es posible que ésto represente diferencias entre especies, como se ha comprobado que existen en el perro y el cobaya (125).

Se ha demostrado la existencia de hiperreactividad bronquial en el hombre en los casos de asma inducido por alérgenos cuando existe respuesta dual (fase inmediata y tardía) y no en los que sólo representan respuesta inmediata (126). El componente tardío está asociado con la liberación de mediadores (27) y la fase celular de la reacción inflamatoria (127) lo que sugiere que es

necesaria la inflamación para que se presente tanto la respuesta tardía como la hiperreactividad. Además, es un hecho comprobado que la liberación de mediadores modula, de alguna forma, la HB. Así, los pacientes con asma estacional por sensibilización al pólen muestran marcado incremento de la hiperreactividad bronquial durante la estación polínica, que persiste durante varias semanas (127). Y este hecho se ha comprobado que sucede tras la inhalación de otros antígenos, como ácaros y epitelios de gato. En cuanto a los mediadores potencialmente intervinientes, el hecho de que la respuesta asmática tardía inducida por alérgeno sea inhibida por la indometacina, sugiere que pueden estar implicados los productos derivados del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa (128).

Además, la administración de dosis subliminales de  $\text{PGF}_2\alpha$  y  $\text{PGD}_2$  pueden incrementar la respuesta de las vías aéreas a inhalaciones subsiguientes de histamina (129). Esto hace suponer que las PGs pueden potenciar la acción de otros mediadores, como los LTs.

Todos estos hechos han llevado a considerar que el asma puede ser una enfermedad que se inicia en el epitelio bronquial (130). La rotura del epitelio y de sus uniones intercelulares, bién por estimulación fisicoquímica (ozono), inflamación ( $\text{LTB}_4$ , histamina, PBM del eosinófilo) o fuerzas posiblemente osmóticas, pueden exponer o alterar el umbral de los receptores aferentes para reflejos irritantes, (130) y cambios en la osmolaridad del entorno de las células cebadas luminales pueden tener importantes consecuencias para la activación de estas células (131,132,133).

Es posible que esta hipótesis no sea una explicación universal de la HB, pero parece explicar muchos de los cambios fisiopatológicos asociados a las vías aéreas asmáticas.

### 3 - ASMA E INTOLERANCIA A AINE

El asma asociada a intolerancia a antiinflamatorios no esteroideos (AINE) se caracteriza por ser un asma de evolución severa, en general, que sufre fuertes exacerbaciones cuando el paciente ingiere aspirina u otros AINE. Se suele observar la asociación con rino-sinopatía hiperplásica (poliposis) con mucha mayor frecuencia que en otros tipos de asma. Se han empleado diversos sinónimos para definir el cuadro clínico, el más frecuente de los cuales es el de AAS triada (asma-poliposis-intolerancia al ác. acetilsalicílico). Se utiliza también la denominación de idiosincrasia por aspirina, asma inducido por aspirina, asma con intolerancia aspirina, reacción pseudoalérgica por aspirina. Esta proliferación de denominaciones se debe al desconocimiento de su patogenia.

Clínicamente cursa como un asma intrínseco que suele comenzar por encima de los 40 años, afecta predominantemente a mujeres en edad cercana a la menopausia, con evolución a la corticodependencia en la mayoría de los casos, aunque el paciente no tome ningún AINE (134), y con eosinofilia elevada en sangre y esputo. La rinitis que lo acompaña suele ser también severa, eosinofílica, productora de anosmia, y bastante resistente al tratamiento, pues sólo responde a dosis elevadas de esteroides, más altas que las necesarias para controlar el asma. También se acompaña en ocasiones de la presencia de un flush rojo-vinoso facial, que sólo sucede tras la ingesta de Ac. acetilsalicílico (AAS).

La frecuencia de intolerancia a la aspirina en pacientes asmáticos es distinta según que el diagnóstico se establezca por

anamnesis o mediante prueba de provocación. Si el diagnóstico se hace por anamnesis, se sitúa entre el 1,9% y el 19,8%, mientras que si se hace por provocación oscila entre el 16% y el 30-40% según los diversos autores (135).

No existe otra forma de diagnosticar la intolerancia a AINE más que la prueba de provocación, es decir, la administración de pequeñas dosis crecientes de AAS, comprobando el descenso del FEV1, mediante espirometría (igual o superior al 20% respecto a la basal), o del F.E.M. (en medidas similares). No se ha encontrado ninguna prueba de laboratorio que nos permita realizar el diagnóstico, por lo que, desafortunadamente, hemos de someter a los pacientes a esta prueba de riesgo. Existen, no obstante, unas premisas de exclusión de esta prueba, como son : 1º que el paciente presente una obstrucción fija, severa, del árbol bronquial, y cuyo mejor FEV1 sea menor de 1,5 l.; 2º aquellos pacientes que rechazan el tratamiento con corticoides sistémicos (136); 3º pacientes con sinusitis purulenta o con asma infecciosa que son relativamente refractarias al tratamiento con corticoides durante las exacerbaciones infecciosas de su asma (136,137); 4º pacientes con enfermedades psiquiátricas que interfieren con su aceptación voluntaria de esta prueba; 5º pacientes con vías aéreas inestables, cuyo FEV1 cambia más del 20% en la provocación con placebo (138,136)

Los principios que rigen la provocación oral son los siguientes: 1º el tiempo transcurrido desde la ingestión de AAS hasta el comienzo de los síntomas respiratorios oscila entre los 30 minutos y 4 horas (134,139); 2º cuanto más irritable es el árbol tráqueo bronquial, más probabilidades hay de que se

presente una respuesta asmática severa (138); 3º cuanto menores son las dosis de AAS, menor será la respuesta asmática y viceversa, sugiriendo un fenómeno dosis-respuesta (140,141); 4º las reacciones respiratorias a los AINE ocurren incluso en pacientes pretratados con teofilina y corticoides (142); 5º tras la provocación positiva se produce un periodo que oscila entre 2 y 5 días en el que el árbol bronquial del paciente es refractario a una nueva prueba de provocación (142).

No existe ningún protocolo de provocación absolutamente recomendado, sino que cada grupo de trabajo establece el suyo. En la tabla V queda reflejado el que actualmente se sigue en la Sección de Alergia del Hospital General "Gregorio Marañón". El paciente debe estar en situación estable, por lo que, si es necesario, se ajustará previamente el tratamiento con corticoides.

### 3.1 -Reactividad cruzada

Las primeras reacciones adversas a la aspirina fueron comunicadas por Hirschberg en 1902 (143), y consistieron en angioedema, urticaria y disnea. Con la introducción de nuevos AINE fueron apareciendo reacciones de intolerancia a los mismos, y así, Storn Van Leeuwen en 1928 (144) la describió frente a aminopirina, antipirina y luminal. Van Selow (145), Giraldo (146) y Santer (147) describieron la intolerancia a la indometacina, y más tarde otros autores encontraron reacciones frente a la mayoría de AINE de posterior aparición.

La estructura química de estos medicamentos son muy dispares entre sí, por lo que la reactividad cruzada entre los mismos no

parece ser de carácter inmunológico.

### 3.2 -TEORIAS PATOGENICAS.

Se han barajado diversas hipótesis para tratar de explicar el asma inducido por AINE, y ninguna de las cuales ha obtenido plena demostración. A continuación se exponen las más importantes:

#### 3.2.1 -Mecanismo inmunológico.

Dado que el cuadro clínico es muy parecido al del asma desarrollado por reacción antígeno -IgE, se trató de demostrar que la aspirina actuaría de igual manera. Sin embargo, todos los datos obtenidos aparecen contrarios a este mecanismo. En primer lugar, las pruebas cutáneas han sido sistemáticamente negativas, tanto empleando aspirina (148,149) aspirilpolisina (150,151), suero con elevado contenido de aspirina (152,153), conjugados de caseína o de seralbúmina humana más aspirina (154,155); no se ha podido transferir pasivamente sensibilidad a la aspirina a primates (156); la prueba de degranulación de los basófilos frente al complejo aspirina-albúmina sérica humana es negativa en estos pacientes ((157); y finalmente, los pacientes con este síndrome de intolerancia a AAS muestran la misma reacción cuando se les provoca con una amplia serie de AINE no relacionados químicamente, como se indicó antes.

#### 3.2.2 -Hipótesis de la activación del complemento.

Yurchack (155) sugirió que la aspirina activa directamente el sistema del complemento, con formación de las anafilotoxinas

$C_{3a}$  y  $C_{5a}$ , que a su vez, podrán estimular la liberación de mediadores químicos a partir de las células cebadas. Además podrían tener también un papel relevante en el desencadenamiento de este proceso inflamatorio otras actividades dependientes de la activación del complemento, como la quimiotaxis leucocitaria y la degranulación (158). En efecto, autores como Van Oss y cols (159) demostraron que la aspirina tenía un papel anticomplementario in vitro ; Aroyave y cols (160) encontraron que se producía un descenso de los valores del  $CH_{50}$  mayor del 20% sobre los basales en 3 de 7 pacientes intolerantes al AAS durante la prueba de provocación con aspirina ; Voigtlander y cols. (161) detectaron un pequeño descenso transitorio en los valores del  $CH_{50}$ ,  $C_1$ ,  $C_2$ , y  $C_3$  tras la administración de 1 g. de aspirina en voluntarios sanos. Sin embargo, el trabajo más reciente de Pleskow y cols. (162), que midió la cifra de  $CH_{50}$  y la actividad de  $C_4$  por inmunolectroforesis en cohete para  $C_{4d}$ , y de  $C_5$ , en sangre venosa y arterial en 16 intolerantes a AAS, no pudo demostrar que se produjeran cambios significativos, ni durante ni después de la producción de broncoespasmo por aspirina en estos enfermos.

### 3.2.3 -Teoría genética.

En general, este tipo de asma se presenta de forma esporádica dentro de la población, aunque se ha publicado la existencia de cuatro familias en las que aparece una alta prevalencia de asma inducido por aspirina. Pero no es sugestivo que la enfermedad se deba a una herencia simple. De hecho, la expresión fenotípica de esta enfermedad requiere la herencia de

varios defectos genéticos, como son : la predisposición al asma, una deficiencia enzimática en un mediador de la cascada inflamatoria, y la exposición a fármacos que bloqueen algún factor o enzima del metabolismo del A.A. u otro mediador en células seleccionadas (163). En este sentido, Mullarkey y cols. (164) han encontrado una prevalencia altamente significativa del locus HLA-DQW2 en el 65% de los asmáticos intolerantes, prevalencia que no se halla en los individuos sanos ni en asmáticos tolerantes. El hecho de que no se halle en todos los intolerantes puede explicarse, bien porque haya más de un defecto genético, bien porque este defecto no resida estrictamente en dicho locus, sino que vaya asociado a él. O bien, que sea sólo un hallazgo no relacionado con la enfermedad.

#### 3.2.4 -Liberación de mediadores por las células cebadas/basófilos.

Algunos autores han propuesto la teoría de que la aspirina y otros A.I.N.E. (o bien sus metabolitos), pueden alterar la superficie de las membranas de alguna o todas las células cebadas del aparato respiratorio, o de los basófilos circulantes, de manera que produzcan liberación de mediadores inflamatorios. Tal teoría presupone que una única población de células cebadas, que sólo existiría en los individuos asmáticos intolerantes a la aspirina, son susceptibles a los A.I.N.E.. O bien, alternativamente, que los A.I.N.E. estimulan selectivamente, y sólo en los pacientes intolerantes, la formación de anafilotoxinas o de 15-HETE, que a su vez, inician la liberación de mediadores químicos de estas células.

Para tratar de demostrar esta teoría se han realizado determinaciones de los mediadores liberados durante la prueba de provocación positiva. Así, Stevenson y cols. (165) encontraron elevación de la concentración de histamina en sangre venosa periférica de estos pacientes, pero también se producía el mismo resultado en pacientes con prueba de provocación negativa. Otro estudio similar, realizado por Wasserman y cols. (166) no pudo demostrar la existencia de este incremento. En un reciente estudio multicéntrico (167) en el que se determinaba histamina, factor plaquetario 4, y factor quimiotáctico de los neutrófilos en sangre y orina, no se ha encontrado que se produzca ningún cambio significativo, aunque en otros estudios sí se ha podido demostrar que se produce un incremento del factor quimiotáctico de los neutrófilos durante la crisis asmática inducida por aspirina, que no se produce con la administración de placebo, ni en asmáticos tolerantes cuando se les administra AAS (168, 169).

Otro punto que podría corroborar esta teoría fué el hallazgo por Basomba y cols. (170) de la inhibición del broncoespasmo cuando al paciente se le hacía inhalar cromoglicato disódico (CGDS) (estabilizador de la membrana del mastocito) previamente a la provocación con aspirina. Sin embargo, este estudio se realizó antes de conocer que la provocación con aspirina positiva induce un periodo refractario entre 2 y 5 días, y en consecuencia, la falta de reacción al AAS en la segunda provocación podría haber sido causada por este periodo de tolerancia. Cuando este periodo es tenido en cuenta, el pretratamiento con 40 mg de CGDS no previene la reacción asmática (171). Otro hecho en contra de esta teoría es la existencia del

periodo refractario tras una primera provocación, y la posibilidad de realizar "desensibilización" con aspirina. En este caso, no existe explicación plausible de cómo se inhibiría la liberación de mediadores.

### **3.2.5 -Intervención de los eosinófilos.**

Dado que los eosinófilos están muy elevados tanto en sangre como en esputo y exudado nasal en los pacientes con intolerancia a A.I.N.E. (172, 173), sería lógico pensar que estas células pueden tener un papel predominante en el desencadenamiento de este tipo de asma. Sin embargo, los eosinófilos son sumamente sensibles a la acción de los corticoides, en su funcionamiento y en su migración, y como sabemos que el pretratamiento con corticoides no inhibe el desencadenamiento del asma por administración de aspirina, se hace difícil admitir que sea esta célula la primordialmente afectada.

### **3.2.6 -Intervención de las plaquetas.**

Varios grupos de autores (174,175) han demostrado la producción de una sustancia broncoconstrictora en el sobrenadante de las plaquetas activadas. Se podría pensar que en los pacientes intolerantes existiera un defecto que afectara a estas células, en virtud del cual se alterará la liberación de este factor broncoconstrictor. Sin embargo, no hay ningún trabajo que lo demuestre cómo se verá después.

### **3.2.7 - Acción de los A.I.N.E sobre el metabolismo del ácido araquidónico.**

En 1971 Vane publicó que la aspirina y otros A.I.N.E. inhiben la síntesis de las prostaglandinas in vitro (176, 177), acción que posteriormente fué comprobada en numerosas especies de animales y en diversos tejidos (178). También se ha demostrado esta acción en casi todas las células humanas, con dosis terapéuticas de estos fármacos, inhibiendo la ciclooxigenasa. En 1975 Szczeklik y cols. (179) demostraron que todos los fármacos que presentan reactividad cruzada con el AAS inhiben igualmente la ciclooxigenasa. A partir de estos trabajos surgió la teoría de que el asma desencadenado por la aspirina se producía por un bloqueo o alteración de esta vía, tan importante en el desencadenamiento de la cascada inflamatoria (180).

Parece confirmar esta teoría el hecho de que los fármacos que producen mayor inhibición del enzima señalado (aspirina, indometacina, ác. flufenámico etc.) son los que inducen broncoespasmo en los paciente con asma desencadenado por aspirina, mientras que los que no la inhiben (salicilamida, paracetamol, benzidamida, cloroquina), se toleran. La fenilbutazona (179) es menos potente inhibidor que el resto de los A.I.N.E., y parece que ésta es la explicación de su mejor tolerancia en estos pacientes. Por otra parte, la inducción de tolerancia a la aspirina hace que se toleren otros A.I.N.E., y viceversa (181, 182, 183).

La producción de broncoespasmo inducido por la aspirina se podría explicar de dos maneras :

-A través de una alteración de la proporción relativa de las

prostaglandinas broncoconstrictoras, F<sub>2</sub>alfa, y broncodilatadoras, E<sub>2</sub>, con predominio de las primeras.

-O bien por desviación del metabolismo del ác. araquidónico hacia la vía de la lipooxigenasa, con el consiguiente aumento de producción de leucotrienos broncoconstrictores.

Llegados a este punto, y dado que es motivo de esta tesis, parece oportuno realizar un resumen del metabolismo del ác. araquidónico, la producción de sus metabolitos por las diferentes células que pueden actuar en el asma, la participación de los eicosanoides en la patogenia del asma, y los trabajos realizados en este sentido en los intolerantes a aspirina.

#### 4 -METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO

El ácido araquidónico (A.A.) es un ácido graso poliinsaturado de 20 átomos de carbono (ác. 5,8,11,14-cis-eicosatetraenoico), que es un constituyente normal de los fosfolípidos que forman muchas membranas biológicas. Se sintetiza a partir del ácido linoleico, que se transforma en dihomogamma-linoleico, y este en ácido araquidónico (184). La liberación del A.A. de las membranas celulares puede ser estimulada por una variedad de señales biológicas, incluyendo activación del receptor específico, interacción antígeno-anticuerpo, estímulos físicos tales como el frío, o alteraciones iónicas del medio (185).

No se encuentra libre en las membranas, sino que está esterificado en lípidos complejos, habitualmente fosfolípidos, que son un grupo de bases de fosfoglicéridos, sobre todo fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol, y se halla situado en la posición 2 del esqueleto del glicerol (fig. 2).

Aunque la mayoría de las células presumiblemente liberan A.A. a partir de los fosfolípidos por acción de la fosfolipasa A2 (fig. 1), la acción secuencial de la fosfolipasa C, seguida por una diglicérido lipasa, puede también liberar A.A. (186) (fig. 3).

En las figuras 4, 5, 6 y 7 se expone de forma resumida el metabolismo del A.A. a través de sus dos vías principales, ciclooxigenasa y lipooxigenasa. Es dudoso que se produzca la vía epoxigenasa in vivo.

La **ciclooxigenasa** es un complejo enzimático asociado al

grupo heme, que cataliza la incorporación de oxígeno molecular en la molécula del A.A., seguido de cierre del anillo, que produce los endoperóxidos intermedios PGG<sub>2</sub> y PGH<sub>2</sub>, éste último por acción de una peroxidasa. La ciclooxigenasa y la peroxidasa se encuentran en casi todos los tipos de células (187), pero el paso siguiente a prostaglandinas y tromboxanos sólo lo hacen células altamente especializadas.

Las **lipooxigenasas** son una familia de enzimas citosólicas con importante especificidad de célula. Las tres enzimas más importantes de la lipooxigenación de los mamíferos son las 5, 12, y 15 lipooxigenasas, en las que el número indica el número del átomo de carbono donde se introduce una molécula de oxígeno, formándose productos inestables, el 5, 12, 15 HPETE, que rápidamente se transforman, por vía enzimática y por un mecanismo de reducción no enzimático, en los correspondientes 5, 12, 15 HETE (188). Es la 5 lipooxigenasa la que actúa en neutrófilos, monocitos, macrófagos y células cebadas (189); la vía 12 lipooxigenasa se forma primordialmente en plaquetas (190), y la 15 lipooxigenasa en eosinófilos, células endoteliales y células epiteliales (191, 192). Posteriormente, en todas las vías, se forman análogos de los leucotrienos A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, y E<sub>4</sub> (193). Los tres últimos constituyen la antigua sustancia de reacción lenta de la anafilaxia (SRS-A), y se conocen también con el nombre de C<sub>6</sub> leucotrienos sulfidopéptidos, siendo la porción peptídica glutatión para el leucotrieno C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), cisteinilglicina para el leucotrieno D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) y gamma-glutamylcisteína para el leucotrieno E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>) (188).

En 1984 se describieron en los neutrófilos una serie de

compuestos derivados de trihidroxitetraenos, que han sido llamados lipoxinas, y de los que se conocen dos, la lipoxina A (LXA) y la lipoxina B (LXB) (194).

Aunque todas las células humanas que se han examinado expresan actividad ciclooxygenasa y una o más actividades lipooxigenasas, sólo las células cebadas, varios tipos de leucocitos, plaquetas y células endoteliales y epiteliales de diversos órganos generan y secretan cantidades suficientes de estos mediadores para influir a otras células en la reacción alérgica (188) (fig. 8).

#### **4.1 -Producción de eicosanoides en tejidos y células.**

En la tabla VI se muestra la producción de metabolitos del A.A. por tejidos y células humanas (195). Repasaremos brevemente aquellos que nos interesan en este trabajo.

##### **1º-Pulmón**

El tejido pulmonar de una gran variedad de especies animales tiene capacidad metabólica para producir prostaglandinas (PGs), tromboxanos (Tx<sub>s</sub>), LTB<sub>4</sub>, y sulfidopéptido leucotrienos, aunque puede variar su proporción entre especies y entre los diferentes tejidos pulmonares estudiados dentro de una especie. Así, en las tiras de pulmón de cobaya se ha visto que el LTA<sub>4</sub> se transforma en LTB<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, y E<sub>4</sub>, mientras que en el tejido traqueal aislado sólo se produce LTB<sub>4</sub> (196). En cambio, el tejido bronquial central y periférico puede convertir el LTC<sub>4</sub> exógeno en LTD<sub>4</sub> y E<sub>4</sub> (196, 197). Las tiras del parénquima pulmonar humano pueden también catalizar la conversión de LTC<sub>4</sub> a LTE<sub>4</sub> y D<sub>4</sub> (198). Las células epiteliales de tráquea humana producen solamente PGE<sub>2</sub> y

PGF<sub>2</sub>alfa (199).

La producción in vitro de leucotrienos por el tejido pulmonar puede ser específica de estímulos (200). Cuando se estimula parénquima humano con ionóforo de Calcio A 23187 se produce predominantemente sulfidopéptido leucotrienos, que se presentan como LTE<sub>4</sub> y menores cantidades de PGD<sub>2</sub>. Pero cuando el tejido es sensibilizado con IgE y estimulado con anti-IgE, el metabolito predominante es PGD<sub>2</sub>. También se ha demostrado que el parénquima pulmonar produce prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) y su metabolito 6-ceto-PGF<sub>2</sub> alfa, y en menores cantidades, PGF<sub>2</sub>alfa, TxB<sub>2</sub>, y PGE<sub>2</sub> (201).

#### **2º-Basófilos y células cebadas pulmonares**

Los basófilos producen LTC<sub>4</sub>, que es metabolizado a D<sub>4</sub> y E<sub>4</sub> (202, 203), y pequeñas cantidades de 5-HETE, y no producen PGD<sub>2</sub>. Los mastocitos pulmonares producen predominantemente PGD<sub>2</sub> (204) y pequeñas cantidades de TxB<sub>2</sub>, 6-ceto-PGF<sub>2</sub>alfa, PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2</sub>alfa (205), y LTC<sub>4</sub> (202,203). Si se toman células cebadas pulmonares aisladas y se estimulan con IgE-Fc, se produce predominantemente PGD<sub>2</sub>, pero si estas células se incuban con fibroblastos de ratón 3T3, al cabo de 7 días el mismo estímulo produce cantidades similares de LTC<sub>4</sub> y PGD<sub>2</sub> (206). Esto podría significar que, o bien al aislar las células cebadas se altera la vía de la 5-lipooxigenasa, o bien que la presencia de los fibroblastos proporciona unos factores críticos similares a los que se pueden producir en el pulmón humano. Tal vez esté relacionado con este experimento el hecho publicado de que los mastocitos con características de los llamados de mucosa elaboran grandes cantidades de leucotrienos, en tanto que los llamados de tejido

conectivo generan  $PGD_2$  y parecen carecer de la vía 5-lipooxigenasa (207, 208).

### **3º-Eosinófilos**

Los eosinófilos humanos y de ratón, cuando son estimulados con ionóforo de Calcio y A.A. exógeno, lo metabolizan predominantemente hacia la vía lipooxigenasa, siendo su producto mayor el 15-HETE, junto con otros productos de la 15-lipooxigenasa y 5-lipooxigenasa (209, 210). También producen  $LTC_4$  y  $LTD_4$ , tanto en animales como en humanos, y tanto en individuos sanos como en pacientes con eosinofilia (211, 212, 213).

### **4º-Linfocitos**

El principal metabolito del A.A. en los linfocitos T humanos es el 15-HETE, con cantidades significativas de 11 y 5-HETE, mientras que se detectan pequeñas cantidades de  $LTB_4$  (214).

### **5º-Plaquetas**

Producen preferentemente  $TxA_2$ , que se degrada a  $TxB_2$ , 12-HETE, y pequeñas cantidades de  $PGD_2$  (215, 216).

### **6º-Neutrófilos**

Producen  $LTB_4$  (217) y lipoxinas (194), así como pequeñas cantidades de  $TxB_2$ ,  $PGE_2$ , y  $PGF_2$  alfa (195).

### **7º-Monocitos periféricos y macrófagos alveolares**

Ambos tipos de células son parte de una familia de células fagocíticas mononucleares que se encuentran prácticamente en todos los órganos. Los macrófagos alveolares derivan de los monocitos sanguíneos (218). A nivel pulmonar se hallan en tres localizaciones : en el alveolo, en el tejido intersticial, y en la luz de las vías aéreas (219). Como se señaló antes, los macrófagos alveolares son las células predominantes entre los

leucocitos que se obtienen del lavado broncoalveolar.

Ambas son capaces de ejercer fagocitosis, procesar antígenos y generar mediadores. Está comprobada la activación inmunológica de los macrófagos por estímulos dependientes de los receptores IgG-Fc (220). En este trabajo, no se entra a considerar las funciones de fagocitosis, ni proceso de antígenos, ni secreción de interleuquinas.

Los macrófagos alveolares y monocitos sanguíneos liberan un amplio número de moléculas en respuesta a diversos estímulos, muchos de los cuales se suponen que juegan un papel importante en la patogenia del asma bronquial.

En la tabla VII se exponen los mediadores liberados por estas células con capacidad para intervenir en el asma bronquial (221). También se ha publicado que generan lipoxinas (222).

Posteriormente se expondrán con amplitud los estudios realizados en liberación de PGs y LTs en relación con su posible participación en el asma bronquial.

#### **4.2 -Receptores tisulares de eicosanoides.**

Una vez que los eicosanoides han sido elaborados por el tejido pulmonar o por las células residentes en el pulmón, ejercen sus efectos a través de receptores específicos tisulares. La evidencia experimental demuestra que los leucotrienos se ligan a los tejidos de forma reversible, saturable y con especificidad estereoquímica.

Los datos acumulados hasta hoy sugieren la existencia de receptores diferentes para LTB<sub>4</sub> y LTD<sub>4</sub>, y posiblemente, para LTE<sub>4</sub> (223). Se han descrito receptores para LTC<sub>4</sub> en un amplio número

de tejidos, como cerebro, hígado, riñón, y pulmón, pero los estudios realizados hasta ahora muestran que parece tener poca especificidad (218). El receptor para LTD<sub>4</sub> sólo se ha encontrado en pulmón (224) y parece específico y saturable. El receptor para LTE<sub>4</sub> parece muy similar al de LTD<sub>4</sub> (225) y ambos parecen ser glicoproteínas (224). El receptor para LTB<sub>4</sub> se ha detectado en la membrana de polimorfonucleares (226,227).

También se han descrito receptores para los prostanoides (228). Y existe una teoría, basada en múltiples estudios experimentales, para explicar de forma conjunta la acción de todos los eicosanoides a través de sus receptores. Según Smith (228) los eicosanoides actuarían a través de un receptor ligado a la proteína G para producir sus efectos celulares (fig 9). Se sabe que cuando diferentes proteínas G se activan por interacción con sus ligandos apropiados, se producen cambios en la concentración de segundos mensajeros (AMP cíclico, InsP<sub>3</sub>, InsP<sub>4</sub>, diacilglicerol o Ca<sup>2++</sup>), o de iones intracelulares (K<sup>+</sup> y/o quizás Na<sup>+</sup> e H<sup>+</sup>), por estimulación de la adenilato ciclasa, inhibición de la misma, activación de la fosfolipasa C, apertura o cierre de los canales de Ca<sup>2++</sup> o de K<sup>+</sup>, o posiblemente, promoviendo intercambio de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. La multitud de efectos biológicos producidos por los eicosanoides pueden ser entendidos si existieran varios tipos de receptores específicos para cada eicosanoide, con cada receptor acoplado a diferentes proteínas G, que median diferentes acontecimientos bioquímicos. Pueden incluso existir subtipos de receptores de eicosanoides acoplados a la misma proteína G, como parece ser el caso con los receptores beta y alfa<sub>2</sub> adrenérgicos.

#### 4.3 - Acciones fisiológicas de los eicosanoides.

Los efectos de estos mediadores se ejercen directamente sobre el músculo liso, vasos sanguíneos, células epiteliales, glándulas, leucocitos y células del sistema nervioso. Sus acciones resumidas se exponen en la Tabla VIII y IX (188).

En conjunto, los sulfidopéptidos leucotrienos ( $LTC_4$ ,  $D_4$  y  $E_4$ ) son más potentes broncoconstrictores que los PGs y Txs. Cuando se toma tejido pulmonar de pacientes con asma y se estimula con el alérgeno correspondiente, el curso y la intensidad de la broncoconstricción resultante son atribuibles a estos LTs puesto que no se modifica por la adición de inhibidores de la ciclooxigenasa, ni por antihistamínicos, y se suprime por inhibidores de la actividad 5-lipooxigenasa (229).

Los  $LTC_4$ - $D_4$ - $E_4$  son de 200 a 20.000 veces más potentes que la histamina estimulando la contracción de tejido pulmonar humano y de cobaya (230). Sin embargo, estos leucotrienos presentan solamente de 30 a 100 veces mayor potencia que la histamina en producir contracción de la tráquea humana y de cobaya. Esto parece indicar que son más activos sobre las vías aéreas pequeñas que sobre las grandes, y corresponde con estudios in vivo en el cobaya (231). No obstante, esta diferencia de acción se ha puesto en duda después de los trabajos de Smith y cols (232), en los que obtienen, tras la inhalación de los mismos LTs en humanos, acciones equivalentes sobre las vías aéreas pequeñas y grandes.

El  $LTE_4$  y probablemente otros LTs sensibilizan a las vías aéreas pulmonares para el efecto broncoconstrictor de otros agonistas, por lo que son posibles candidatos como uno de los productores de la hiperreactividad bronquial en el asma (233).

Las prostaglandinas producidas por los pulmones humanos son PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>alfa, PGE<sub>2</sub> y PGD<sub>2</sub>, en orden decreciente de cantidades, y tienen efectos opuestos sobre las vías aéreas. La actividad broncoconstrictora del TxA<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>alfa y PGD<sub>2</sub> es mucho mayor que la acción broncodilatadora de los PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>.

Nos interesa también conocer la actividad sobre leucocitos y otras células implicadas en las enfermedades alérgicas. La PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> y PGF<sub>2</sub>alfa son capaces de modular los acontecimientos iniciales de la respuesta inmediata de hipersensibilidad. La PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub> inhiben la degranulación de mastocitos elevando la concentración de AMP-C, y contrariamente, la PGF<sub>2</sub>alfa aumenta la degranulación de las células cebadas elevando la concentración de GMP-C (234).

El LTB<sub>4</sub> estimula la quimiotaxis y quimioquinesis de neutrófilos y eosinófilos, en potencia similar a la anafilotoxina C<sub>5a</sub> (235). Además de activar los neutrófilos, hace que liberen sus enzimas lisosomales y la generación de supeóxido (236). Y , junto con el 5-HETE, aumenta la expresión de receptores para C<sub>3b</sub> en neutrófilos y eosinófilos, que conduce a la amplificación de la respuesta inflamatoria local (237).

Se han descrito numerosas propiedades inmunoregulatoras para los diferentes productos derivados de lipooxigenasa y ciclooxigenasa, como se expone en las tablas VIII y IX, que no es tema de este trabajo.

Respecto a las lipoximas, se ha descrito que la LXA<sub>4</sub> contrae las tiras de parénquima pulmonar in vitro, con una curva dosis-respuesta paralela a la producida por el LTD<sub>4</sub>, siendo unas 10.000 veces menos potente que el LTD<sub>4</sub>. Esta acción no se afecta por

inhibidores de la 5-lipooxigenasa, ni por la indometacina. La LXA<sub>4</sub> no produce contracción en el tejido traqueal, y la LXB<sub>4</sub> no contrae parénquima ni tráquea (238).

Además de estos efectos que podríamos llamar primarios, se han descrito otros efectos secundarios, principalmente de los productos de la vía lipooxigenasa. Se definen como aquellos mediados por factores producidos en las células diana o tejido, en respuesta a la introducción de estímulos derivados de los productos del ácido araquidónico. Estos efectos se demuestran funcionalmente cuando la respuesta se previene por inhibidores farmacológicos, o antagonistas de mediadores, que actúan sobre mediadores diferentes a los que originaron el estímulo. Por ejemplo, el LTB<sub>4</sub> puede tener acción broncoconstrictora cuando se administra intravenoso, por inducir formación de TxA<sub>2</sub> en el tejido pulmonar (239). También los LTC<sub>4</sub>-D<sub>4</sub> y E<sub>4</sub> aumentan la adherencia de polimorfonucleares a las superficies, y disminuyen la adherencia de plaquetas a las superficies endoteliales lesionadas, a través de la generación secundaria y local de TxA<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub> (240). Los efectos secundarios del LTB<sub>4</sub> produciendo aumento de la permeabilidad de la microcirculación cutánea y la producción de hiperalgesia son dependientes de neutrófilos (241).

Hay muchos de estos efectos secundarios. Los eicosanoides de una célula pueden influenciar la producción de eicosanoides por otras células. Por ejemplo, el 15 HETE de eosinófilos, células epiteliales y endoteliales estimulan la actividad 5-lipooxigenasa en algunas células cebadas, e inhiben la expresada por macrófagos, neutrófilos y linfocitos (242).

La actividad de unos eicosanoides puede ser inhibida competitivamente por otros eicosanoides. Así la PGE<sub>2</sub> aumenta significativamente la marginación de neutrófilos en los tejidos, que es iniciada por LTB<sub>4</sub> (243). La acción broncodilatadora de la PGE<sub>2</sub> en las vías aéreas del cobaya puede ser revertida parcialmente por los efectos broncoconstrictores del LTC<sub>4</sub> (244).

Los eicosanoides también pueden modular los efectos de otros mediadores no relacionados. Así, si en el cobaya se administra una mínima cantidad de LTD<sub>4</sub> en aerosol, aumenta notablemente la contracción posterior inducida por histamina o por acetilcolina (245). Y de forma similar, se puede aumentar la hiperreactividad bronquial en pacientes asmáticos.

## 5 - EICOSANOIDES EN ENFERMEDADES ALÉRGICAS.

Se deduce que las acciones expuestas antes que los metabolitos del AA pueden jugar un papel importante en la patogenia de las enfermedades alérgicas. Las células que se consideran importantes en estas enfermedades están situadas en lugares en los que pueden entrar en contacto rápidamente con los agentes externos y con alergenos. Son prominentes en las superficies de las mucosas, piel, tracto gastrointestinal y aparato respiratorio, y son potentes productoras de estos metabolitos proinflamatorios.

No se conoce bien la forma en que entran en contacto los alergenos en las células consideradas como activadas de forma primaria por mecanismo IgE dependiente: mastocitos, basófilos, y probablemente macrófagos. Lo mismo ocurre respecto a otras células que son importantes en posteriores secuencias de la reacción, como son eosinófilos, neutrófilos y linfocitos.

Mientras que los metabolitos de la ciclooxigenasa se pueden dividir en metabolitos más o menos proinflamatorias y antiinflamatorias, los productos de la vía lipooxigenasa tiene, en general, sólo propiedades proinflamatorias. Se supone que los productos de la lipooxigenasa juegan un papel importante en estas enfermedades, dado que tienen notables propiedades en este sentido, como es la contracción del músculo liso, estimulación de la quimiotaxis y quimioquinesis de neutrófilos y eosinófilos, activación de los mismos, además de presentar propiedades inmunorreguladoras. Sin embargo, sólo en situaciones aisladas se han podido medir en los fluidos biológicos humanos de varias enfermedades alérgicas, cuyo resumen podemos ver en la tabla X

(188,195).

### 5.1 - Eicosanoides y asma humano. Estudios sobre su posible intervención.

Las acciones de los leucotrienos expuestas antes, especialmente los de los constituyentes de la antigua SRS-A, su liberación por tejidos pulmonares y células tras diversos estímulos, entre ellos el mediado por IgE, los hace ser firmes candidatos a ocupar un puesto muy destacado en la patogénesis del asma bronquial humano, aunque la demostración definitiva de esta teoría aún no se ha logrado de forma concluyente (246). Si aparece más claro su participación en numerosos trabajos realizados en animales de experimentación (247).

En cuanto a la implicación de las prostaglandinas, está aún menos demostrado. Los estudios hechos en asmáticos extrínsecos, en los que se pretende inhibir la vía ciclooxigenasa mediante la premedicación con indometacina y la posterior inhalación del antígeno adecuado muestran que no se produce ningún cambio respecto a la provocación sin premedicación (248). Sin embargo, en ninguno de los trabajos se ha demostrado que la dosis de indometacina administrada produzca inhibición de la vía ciclooxigenasa en el pulmón. Las acciones de la  $PGD_2$  induce a pensar que puede jugar algún papel en la complicada patogenia del asma.

Se han querido equiparar los estudios realizados en rinitis con el asma, dado que en la primera es mucho más accesible la recogida de exudados. Así, se ha demostrado la producción de  $LTC_4$  en el exudado nasal en voluntarios adultos alérgicos tras la

inhalación experimental de pólenes (249), y tras la exposición al aire frío (250). También se ha comprobado que se produce aumento significativo de los niveles de  $LTC_4$  en la secreción nasofaríngea de niños alérgicos a pólenes durante la estación polínica (251).

En el asma humano, el número de trabajos significativos es menor. Se ha demostrado que la inhalación de  $LTE_4$  en pacientes con asma aumenta la hiperreactividad bronquial a la histamina en forma significativa respecto a los controles (252). De forma indirecta, se deduce la participación de  $LTE_4$  en el asma alérgico al encontrar niveles incrementados del mismo en orina tras la provocación inhalativa (253).

Más demostrativos parecen los resultados de los estudios realizados en líquido de lavado broncoalveolar (LBA), en pacientes con asma moderado activo. En 1986 Murray y cols (254) no encontraron leucotrienos en el líquido de LBA tras la provocación inhalativa, pero sí detectaron la presencia de  $PGD_2$  en niveles elevados. Quizás la ausencia de LTs se deba a la recogida precoz de las muestras, puesto que analizan el líquido obtenido a los 9 minutos de la provocación. Posteriormente, Lam y cols (255) demuestran que se encuentra en dicho líquido un metabolito del  $LTB_4$ , el 20-OH- $LTB_4$ , así como pequeñas cantidades de  $LTD_4$  y  $LTE_4$ . No consiguieron detectar  $LTC_4$ , quizás porque se hubiese metabolizado rápidamente a  $LTD_4$  y  $E_4$ . Por el contrario, no se detecta ninguno de estos leucotrienos en los voluntarios sanos que utilizan como control.

También detectan la presencia de leucotrienos en el líquido de LBA Wardlaw y cols (256). Encuentran  $LTB_4$  y  $LTC_4$ , y menores

cantidades de LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub> en concentraciones incrementadas en los sujetos con asma activo, pero no en los que tenían historia de asma y que no presentaban síntomas en el momento de realizar el estudio, ni los sujetos controles.

Utilizando técnica similar de provocación inhalativa con alérgeno, Wenzel y cols (257) miden PGD<sub>2</sub>, Tx<sub>s</sub> (broncoconstrictores) y PGE<sub>2</sub> y 6-ceto-PGF<sub>1</sub>,alfa (broncodilatadores) a los 5 minutos de la provocación, en asmáticos alérgicos, asmáticos intrínsecos, sujetos atópicos no asmáticos y sujetos sanos. Tras la provocación, en los asmáticos extrínsecos se produce un incremento significativo de PGD<sub>2</sub> y Tx<sub>s</sub> sobre los restantes grupos; los atópicos no asmáticos tienen un mínimo incremento de estos mediadores, y no cambian en los restantes grupos. No se produce ningún cambio significativo en los niveles de PGE<sub>2</sub> ni 6-ceto-PGF<sub>1</sub>,alfa en ningún grupo, concluyendo que en los asmáticos alérgicos se produce un incremento de hasta 5 veces en los prostanoïdes broncoconstrictores, en tanto que no aumentan los broncodilatadores, por lo que sugiere que este cambio puede ser importante en la patogénesis del asma. No miden leucotrienos.

Parece, pues deducirse de estos estudios la participación de los leucotrienos y PGD<sub>2</sub> en el asma activo.

Otra forma de estudiar la participación de estos mediadores en el asma humano es empleando antagonistas de los mismo. Los estudios realizados con un antagonista de los receptores para LTD<sub>4</sub>, la sustancia llamada L-649,923, ha demostrado que es un inhibidor débil del LTD<sub>4</sub> inhalado en el hombre (258), y que tiene un pequeño efecto inhibitorio en la broncoconstricción inmediata

tras la inhalación de antígeno en sujetos con asma moderado (259). Empleando otro antagonista, el LY718813, antagonista de LTD<sub>4</sub> y E<sub>4</sub>, se ha encontrado que se reduce de forma significativa la respuesta al ejercicio en pacientes con asma moderado (260), y a la inhalación de aire frío (261). Cuando se emplea en provocación inhalativa con antígeno, se obtiene una reducción pequeña, pero significativa, en la respuesta broncoconstrictora inmediata, pero no en la tardía (262).

Otros autores (263) han tratado pacientes asmáticos con LY 171883 en doble ciego durante 6 semanas, midiendo los requerimientos de broncodilatadores, las variaciones del pico-flujo expiratorio a diario, y realizando espirometrias semanales. Tras el tratamiento con el antagonista, mejora el FEV<sub>1</sub> y se reduce de forma moderada la utilización de broncodilatadores.

En resumen, los estudios con líquido de lavado broncoalveolar comienzan, pues, a comprobar la presencia de eicosanoides en los pacientes con asma, aunque también se los puede encontrar en otras enfermedades pulmonares (256). Este método puede ser el más demostrativo, pero es difícil obtener un número considerable de pacientes, sobre todo que padezcan asma severo, y que no estén sometidos a tratamiento, especialmente con corticoides, a los que se les pueda realizar LBA, por lo que los pasos en este sentido serán lentos. Y respecto a los trabajos con fármacos antagonistas, los resultados obtenidos no parecen demasiado satisfactorios, quizás porque los productos empleados no son lo suficientemente potentes, o, lo que parece más plausible, porque en la patogenia del asma intervienen otros mediadores, además de los LTs.

## 5.2 - Eicosanoides y asma por intolerancia a AINE.

A pesar de que la teoría que implica una alteración en el metabolismo del ácido araquidónico en la patogenia del asma inducido por aspirina es la más lógica, los estudios realizados in vivo muestran resultados poco concluyentes hasta la actualidad. Reumirenos los más significativos.

Sería interesante el estudio del metabolismo de los eicosanoides en tejidos del tracto respiratorio de estos pacientes, pero es difícil poder acceder a ello. Al ser más factible, se ha estudiado en tejido de pólipos nasales de pacientes asmáticos con y sin intolerancia a AAS. En ambos casos, se produce una formación incrementada de  $\text{TxA}_2$  en los pólipos, en relación al tejido nasal sano, mientras que se detecta formación de  $\text{PGE}_2$  en el mismo rango que en los controles sanos (264).

Otra forma de estudiar el metabolismo de los eicosanoides es utilizando las células posiblemente implicadas en el asma. Así, Godard y cols (265) han encontrado que los macrófagos alveolares obtenidos por LBA de pacientes con asma intolerantes a la aspirina liberan menores cantidades de  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_2\alpha$  y  $\text{TXB}_2$  que los macrófagos de sujetos normales y de pacientes con asma extrínseco, apuntando la posible existencia de un defecto intrínseco en el metabolismo del ác. araquidónico en pacientes intolerantes. No realizaron determinaciones de LTs.

Dado que una posible alteración podría residir en la acción de los  $\text{TxA}_2$ ,  $\text{TxB}_2$ , broncoconstrictores, se ha administrado un inhibidor específico de la tromboxano sintetasa a pacientes con intolerancia a AINE. Se comprobó que no altera la sintomatología

de estos pacientes, aunque si se demostró que inhibe la generación de  $\text{TxA}_2$  en las plaquetas de los mismos (266).

Goetzl y cols (267) utilizan los basófilos circulantes para la medición de eicosanoides liberados en asmáticos intolerantes, asmáticos tolerantes y controles sanos y miden la liberación basal de  $\text{PGE}_2$  y  $\text{LTD}_4$  con estímulo de anti IgE humana, y su posible alteración al añadir aspirina. Encuentran que se produce una supresión mayor en la generación de  $\text{PGE}_2$  al añadir aspirina en los basófilos de asmáticos intolerantes, mientras que la generación de  $\text{LTD}_4$  se inhibe discretamente por la adición de aspirina en los sanos y en los asmáticos extrínsecos, y prácticamente no se inhibe en los asmáticos intolerantes.

Capron ha querido implicar a las plaquetas en esta enfermedad. Ha realizado trabajos en los que demuestra que las plaquetas humanas, que contienen receptores para IgE, cuando se sensibilizan de forma pasiva y se estimulan con el antígeno adecuado o con anti IgE humano, producen un proceso de activación plaquetaria selectivo, en virtud del cual liberan metabolitos de oxígeno citotóxicos, capaces de matar a las larvas del *squistosoma mansoni* (268). Estudian mediante esta técnica las plaquetas de asmáticos intolerantes, asmáticos tolerantes y controles sanos, que se comportan por igual en todos los grupos, en condiciones basales. Tras la administración in vitro de AAS, indometacina y flurbiprofen, se induce una más intensa activación en las plaquetas de los intolerantes que en las de los restantes grupos (269). Utilizan la misma técnica empleando monocitos periféricos de los mismos grupos de pacientes (los monocitos también producen mediadores capaces de matar parásitos (270)),

sin que encuentren que se produzca un fenómeno similar. Concluyen que las plaquetas de los asmáticos intolerantes a la aspirina se caracterizan por presentar una respuesta funcional, selectiva, frente a los fármacos inhibidores de la ciclooxigenasa, expresada por la generación de mediadores citotóxicos.

Se ha dado un paso adelante en estos estudios utilizando a los pacientes, tratándolos con diversos productos que inhiban alguno de los pasos metabólicos del A.A. y provocándolos posteriormente con aspirina. Basándose en los trabajos de Kuehl (271) que encuentran, *in vitro*, que la  $PGE_2$  y la  $PGI_2$  inhiben las etapas iniciales en la formación de LTs, y en los de Mugridge y cols (272), en los que la  $PGI_2$  contrarresta la acción broncoconstrictora de los leucotrienos en el músculo liso de cobaya, Nizankowska y cols (273) tratan a un grupo de asmáticos intolerantes con perfusión endovenosa de prostaciclina y con placebo, provocándolos a continuación con aspirina. En ambos casos, tratamiento con placebo y con  $PGI_2$ , no se produce ninguna protección frente a la provocación. Al mismo tiempo, determinan la activación de las plaquetas en estos pacientes, que es inhibida por la dosis de  $PGI_2$  administrada. De este trabajo deducen que la prostaciclina no ejerce ningún efecto regulador en los bronquios de los asmáticos intolerantes a la aspirina, y por otra parte, que la inhibición de la activación de las plaquetas por este producto, (a pesar de lo cual se produce broncoespasmo tras la provocación), hacen difícilmente creíble la teoría de Capron expuesta antes.

El mismo grupo de autores (273) estudian de igual forma el posible efecto protector que el Piriprost (U60,257), potente

inhibidor de la síntesis de leucotrienos por ser inhibidor específico de la 5-lipooxigenasa, debería tener en el asma inducido por aspirina. Encuentran que la administración de este inhibidor por vía inhalatoria no protege frente a la provocación con aspirina, concluyendo que, o bien este fármaco no es lo suficientemente eficaz in vivo, o bien que los leucotrienos no son los principales responsables de la broncoconstricción inducida por AAS, apuntando la posibilidad de que los mediadores causales sean otros eicosanoides, quizás las lipoximas u otros metabolitos todavía no concocidos.

Sin embargo, a pesar de estos últimos trabajos, todavía no se puede descartar la participación de los eicosanoides en este tipo de asma, a la luz de otros hallazgos. Así, Ferreri y cols (274) han cuantificado los niveles de  $PGE_2$ ,  $LTB_4$  y  $LTC_4$  en la secreción nasal de los siguientes grupos de pacientes: rinitis-asma por AAS, asma sin rinitis por AAS, rinitis-asma por intolerancia a AAS desensibilizado, asmáticos tolerantes y controles sanos. Tras la provocación con AAS encuentran aumento en el nivel de  $LTC_4$  solamente en el grupo rinitis-asma inducido por aspirina, y no en los restantes grupos, ni siquiera en el que padece asma por aspirina de forma exclusiva. No detectan alteraciones en la producción de  $PGE_2$  ni de  $LTB_4$  en ninguno de los grupos tras la administración de una pequeña dosis de AAS (100mgrs), pero si se administran dosis elevadas (650 mgrs), disminuye la producción de  $PGE_2$  en sanos, asmáticos tolerantes y en asmáticos intolerantes desensibilizados (no administraron esta dosis a los asmáticos intolerantes no desensibilizados por razones obvias).

En otro estudio realizado por Arni y cols (275) miden la hiperreactividad bronquial con histamina y  $LTE_4$  en sujetos con asma por intolerancia a AAS y con asma tolerantes. Se produce un marcado y selectivo incremento en la hiperreactividad por  $LTE_4$  en los intolerantes, incremento que disminuye de forma significativa cuando los sujetos intolerantes son sometidos a "desensibilización" con aspirina, y concluyen en la posible existencia de una "disregulación" de los receptores para  $LTE_4$  en las vías aéreas de los asmáticos por aspirina.

Y recientemente Christie y cols (276) han medido la concentración de  $LTE_4$  en orina en pacientes con y sin intolerancia a AINE. Existe una concentración basal incrementada en los asmáticos intolerantes, produciéndose un mayor aumento tras la provocación con AAS. La validez de la determinación de  $LTE_4$  en orina viene avalada por los estudios de Maltby y cols (277).

En conclusión, todavía no se ha definido cual o cuales puedan ser las alteraciones en el metabolismo de los eicosanoides en los asmáticos intolerantes a la aspirina, si es que se producen, ni cual o cuales son las células diana de estas posibles alteraciones.

## **6.- PAPEL DE LOS MACROFAGOS ALVEOLARES Y MONOCITOS PERIFERICOS EN EL ASMA BRONQUIAL.**

Es indudable que células como los eosinófilos y las células cebadas tienen un papel fundamental en la patogenia del asma bronquial. Pero es muy probable que también intervengan otras células.

Una razón importante para pensar en la intervención de los macrófagos alveolares en el asma bronquial es el hecho de que posean receptores de baja afinidad para IgE (278). La activación de los macrófagos por la unión antígeno-IgE, o por la unión con IgG-anti IgE demuestra que se produce el mismo mecanismo de puenteo del receptor que se requiere para la activación de los mastocitos (279). Aproximadamente el 10% de los monocitos periféricos y de los macrófagos alveolares humanos de sujetos no atópicos portan receptores para IgE (280). El número de estos receptores se incrementan en los sujetos atópicos, comparados con los normales, y así, Melerwicz y cols (280) encontraron que el 80% de los monocitos periféricos de los pacientes con dermatitis atópica severa contienen estos receptores, y que los pacientes con asma severo y con dermatitis atópica tratada con corticoides tienen el porcentaje más bajo encontrado de estos receptores. Otros estudios revelan que el 20% de los macrófagos alveolares de pacientes asma atópico moderado contienen receptores para IgE (281).

Además de esta razón, una relación potencial entre los fagocitos mononucleares y el asma atópico consisten en la posibilidad de que estas células orquesten o participen en la respuesta inflamatoria que se lleva a cabo en las vías aéreas de

los sujetos con asma atópico o extrínseco. Con los macrófagos apropiadamente posicionados para contactar con los alérgenos inhalados cuando llegan al epitelio de las vías aéreas, es plausible pensar que los macrófagos pueden liberar factores quimotácticos que son responsables de la migración directa de los neutrófilos y eosinófilos de las vías aéreas. A este respecto, es importante destacar que los macrófagos son capaces de liberar al menos 6 factores quimiotácticos para neutrófilos, como son:  $LTB_4$  (282), PAF (283), factor de necrosis de tumores (284),  $C_{5a}$  (285), factor de crecimiento derivado de plaquetas (286), y una molécula de Pm 10.000, que aún no ha sido completamente caracterizada (287). Es interesante señalar que la  $PGD_2$  (285) (supuestamente liberada por los macrófagos), potencia la quimiotaxis inducida por  $LTB_4$ , pero que no es por sí misma, un quimotáctico significativo para los neutrófilos. Además, los macrófagos son modificadores potenciales de la participación de los eosinófilos en el asma, y de la secreción de mediadores por estas células, pues liberan al menos dos sustancias que afectan directamente al eosinófilo, como son el  $LTB_4$ , potente quimotáctico para eosinófilos (288), y el PAF (289). Elsas y col (290) han publicado que los monocitos periféricos humanos liberan factores que aumentan dos funciones de los eosinófilos biológicamente importantes: la toxicidad para helmintos y la generación de productos de la 5-lipooxigenación. Otros autores han informado de la influencia de los monocitos como reguladores del metabolismo endógeno del ácido araquidónico en los eosinófilos (291,292). Recientemente se ha identificado un producto derivado de los macrófagos alveolares de asmáticos, que incrementa la

generación de LTC<sub>4</sub> por los eosinófilos humanos, como un factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos. Este factor no se ha encontrado usando macrófagos alveolares de individuos sanos (293).

Estos hechos hablan a favor de la interacción entre estos dos tipos de células como contribuyentes a la inflamación que se produce en las vías aéreas de los asmáticos.

Otro aspecto importante del asma es la obstrucción de la vía aérea por moco. De los múltiples factores que pueden favorecer este fenómeno, dos de ellos, el LTB<sub>4</sub>, y el ácido 5-hidroxiieicosatetraenoico, son producidos por los macrófagos. Además, sintetizan y liberan productos que influyen en la liberación de histamina por los basófilos (294) y por los mastocitos (295).

Existen numerosas experiencias que avalan la producción de estos mediadores proinflamatorios indicados antes en animales de experimentación. En 1978 R.Patterson (296) demostró que las células broncoalveolares obtenidas por LBA en monos sensibilizados, al ser inyectados en la tráquea de monos singénicos no sensibilizados, eran capaces de producir asma bronquial tras la provocación inhalativa específica. Puesto que los macrófagos alveolares forman el 90-95% de las células obtenidas por LBA, se puede sugerir que los macrófagos alveolares tienen un papel potencial en la patogenia del asma bronquial.

Dessaint y cols (297) demostraron la liberación de enzimas lisosomales y anión superóxido por los macrófagos peritoneales de rata activados por complejos IgE-antígeno; Bach y cols (289) han publicado que los macrófagos peritoneales de ratón son

capaces de liberar LTC<sub>4</sub>. Moscat y cols (299) demuestran la producción de LTC<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>, 5-HETE, PGF<sub>1</sub>alfa, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, en macrófagos peritoneales de ratón tras diversos estímulos. Rankin y cols han observado la liberación de LTB<sub>4</sub> (300) y LTC<sub>4</sub> (301) por los macrófagos alveolares de ratas normales activadas por IgE monoclonal unida a su antígeno específico, en forma de dosis dependiente.

Varios laboratorios han demostrado que los fagocitos mononucleares pueden tener un papel importante en las enfermedades humanas mediadas por IgE, a través de experimentos que examinan la activación de los monocitos periféricos humanos o de macrófagos alveolares en sujetos no atópicos, por mecanismo IgE dependiente. Así, Ferrari y cols (302) estimularon monocitos periféricos sanguíneos de sujetos normales con agregados químicos de IgE, y encontraron que estas células liberaban pequeñas cantidades de LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> y PGE<sub>2</sub>. Fuller y cols (303) estimularon macrófagos alveolares de pacientes con diversas enfermedades pulmonares no atópicas, con IgE-anti IgE, y observaron que estas células liberaban LTB<sub>4</sub>, PGF<sub>2</sub>alfa, TxB<sub>2</sub> y beta-glucuronidasa. Posteriormente, cuando los macrófagos alveolares de individuos normales se incuban bien con IgE y después se estimulan con anti IgE, o con suero de paciente atópicos y el alérgeno específico, o con anti IgE solamente, se observa liberación de enzimas lisosomales, tales como proteasas neutras y beta glucuronidasa (304).

También se han estudiado fagocitos mononucleares de pacientes atópicos. Un estudio preliminar revela la liberación de PAF tras la estimulación in vitro con antígeno (305). Además,

los macrófagos alveolares de pacientes con asma atópico liberan enzimas lisosomales en respuesta al estímulo con antígeno específico o con anti IgE (304). Es muy interesante señalar que los datos obtenidos en estos estudios sugieren que los macrófagos de sujetos con o sin asma no difieren a este respecto (304). Sin embargo, otros resultados revelan diferencias entre los macrófagos pulmonares de estos dos grupos de pacientes. Así, en primer lugar, Goddart y cols (306) observaron que los macrófagos alveolares de sujetos con asma atópico eran menos viables y fagocitaban Zimosan peor que las células de los sujetos controles no atópicos. Estos autores observaron también que existía una correlación positiva entre este déficit y el porcentaje de eosinófilos en el LBA de sus pacientes, sugiriendo que los eosinófilos o bien sus productos de secreción, puedan afectar de forma adversa a las capacidades funcionales de los macrófagos.

En segundo lugar, se ha visto que los macrófagos pulmonares de sujetos con asma atópico actúan peor como célula supresora, actividad determinada por su habilidad disminuida para modular las respuestas linfoproliferativas frente a mitógenos de las células T policlonales, comparadas con los sujetos controles (307). En tercer lugar, la explosión respiratoria de los macrófagos cultivados in vitro de sujetos con asma, en reposo y tras la estimulación, se incrementa al compararlo con lo observado en macrófagos de sujetos normales (308). Y por último, Carrol y cols (309) observaron que el número de monocitos sanguíneos periféricos que forman rosetas con hematies unidos a complemento se incrementa en pacientes tras la provocación inhalativa con alergen, pero no tras la broncoconstricción

inducida por histamina.

Más recientemente se han realizado estudios in vivo con humanos, que apuntan a que los macrófagos tienen un papel importante en el asma. Se ha medido la cantidad de betaglucuronidasa en el líquido de LBA y en los macrófagos obtenidos en un grupo de pacientes con asma y sensibilidad a ácaros, y en los que un segmento del pulmón fué estimulado con el antígeno de ácaros, instilado directamente con un broncoscopio de fibra óptica colocado en las vías aéreas periféricas. El nivel de beta-glucuronidasa en el líquido estaba elevado, y los niveles intracelulares de esta sustancia estaban disminuidos en los macrófagos, comparando con los obtenidos mediante la misma técnica en los sujetos controles. Estos hechos sugieren que el proceso secretor de los macrófagos estaba activado por el alérgeno (310). Se han estudiado con técnicas similares los metabolitos del ácido araquidónico (311). Se encontró  $PGD_2$ , potente broncoconstrictor, en el líquido de LBA en límites 150 veces superior al encontrado antes de la instilación de antígeno. La  $PGD_2$  es un producto de mastocitos (312), y puede ser liberado también por los macrófagos alveolares (313). Es posible, pero aún no se ha probado, que este mediador se origine, al menos en parte, en los macrófagos presentes en el pulmón y vías aéreas de estos pacientes. Usando la misma técnica de instilación local del antígeno, Metzger y cols (314) encontraron que el número de fagocitos mononucleares presente en el líquido de LBA se incrementa a las 48-96 h. tras el estímulo, sugiriendo que los macrófagos pueden tener un papel importante en los acontecimientos de la fase tardía del asma.

Todos estos estudios son muy importantes, pero también es cierto que existen productos secretores de otras células que regulan las funciones de los macrófagos, entre ellos el interferon gamma, que influye sobre la generación y liberación de mediadores por los macrófagos pulmonares humanos. El interferon gamma es una glicoproteína producida por los linfocitos en respuesta a varios estímulos (315). Rankin y cols han observado que esta linfoquina prima a los macrófagos humanos obtenidos por LBA para la liberación de  $LTB_4$  en respuesta a estímulo IgG (316), en forma dosis dependiente. El interferon gamma parece actuar, al menos en parte, incrementando el número, pero no la afinidad, de los receptores IgG en la superficie del macrófago, y es una respuesta específica para el interferon gamma, que no se obtiene con el alfa ni con el beta. Así pues, parece que la capacidad de los macrófagos para la síntesis de  $LTB_4$  puede ser regulada por, al menos, un producto linfocitario.

Se deduce de todos estos trabajos que los macrófagos alveolares pueden jugar un papel en la patogenia del asma. Además, se deben considerar otros aspectos. Las células cebadas que se encuentran en las vías aéreas son escasas en número, comparadas con los macrófagos alveolares, y difícilmente pueden llegar a tener contacto directo con los alérgenos las que se encuentran en la mucosa y submucosa, a menos que el alérgeno penetrase a través de la barrera epitelial. Esto es una razón más para considerar el papel privilegiado que los macrófagos alveolares puedan jugar en la patogénesis del asma extrínseco, dada su posición en la interfase aire/tejido.

Los monocitos periféricos humanos, al igual que los

macrófagos alveolares, tienen las mismas propiedades de respuesta cuando son estimulados por ionoforo de calcio, partículas opsonizadas con  $C_{3b}$  y zimosan no opsonizado (317). La importancia de su participación en la patogenia del asma se pone de manifiesto en un trabajo de Kay (318) sobre asma corticorresistente in vivo, y por el de Wyllie y cols (319) en los que demuestran diferencias significativas en el comportamiento de los monocitos periféricos entre los pacientes con asma corticorresistente y corticosensibles.

El hecho de que los monocitos periféricos y macrófagos produzcan los mismos mediadores, los trabajos referidos más arriba y el conocido equilibrio existente entre monocitos periféricos y macrófagos alveolares (320) hace pensar que se pueden realizar estudios en los monocitos periféricos, que reflejen la actividad de los macrófagos alveolares .

## **VI.- HIPOTESIS DE TRABAJO**

De lo expuesto con anterioridad se deduce que desconocemos con exactitud la secuencia de liberación y grado de intensidad de la participación de los mediadores químicos en la patogenia del asma. La mayoría de los trabajos de investigación se ha hecho en animales de experimentación sensibilizados, y en humanos, en el asma extrínseco, generalmente tras provocación inhalativa. Sería deseable poder determinar los niveles de los mediadores en sangre periférica en los pacientes con asma activo, y así se ha hecho con la histamina (16, 17), factor quimiotáctico de los neutrófilos (18), y PAF (321), encontrándolos incrementados tras la provocación inhalativa. Sin embargo, otros mediadores, como son los eicosanoides, no son aptos para este tipo de determinación, dado su rápido metabolismo e inactivación, por lo que se piensa hoy que actúan como hormonas locales que son rápidamente inactivadas.

La idea del papel predominante que los eicosanoides puedan jugar en el asma es antigua. Desde que se describió la sustancia de reacción lenta de la anafilaxia (SRS-A) en 1938 (322), ha sido un firme candidato como mediador principal en el asma humano, aunque en la actualidad se le hayan añadido otros. La identificación de esta sustancia con los leucotrienos  $C_4$ - $D_4$ - $E_4$  (322), realizada entre 1979 y 1980, condujo a una serie de estudios que han destacado sus acciones como importante mediador de la hipersensibilidad inmediata en el hombre, por sus actividades broncoconstrictoras, principalmente. Esto, junto con las actividades quimiotácticas del  $LTB_4$ , broncoconstrictoras (entre otras) del  $TxB_2$ ,  $PGD_2$ ,  $PGF_1$  alfa, broncodilatadoras de la  $PGE_2$  y  $PGI_2$ , sus actividades sobre vasos sanguíneos, capaces de

producir edema, y sus amplios efectos secundarios, confiere a los eicosanoides un especial protagonismo en la complicada patogenia del asma. No obstante, es indudable que no será la actuación de ellos sólo lo que conduce a la enfermedad, sino imbricados en la actuación de los restantes mediadores descritos.

El hecho de que sean liberados por un amplio número de células intervinientes en el asma, y los hallazgos efectuados hasta ahora en animales de experimentación así lo avalan.

Por las razones apuntadas antes, no es posible determinarlos en sangre periférica de los pacientes, por lo que se ha recurrido a otros estudios para demostrar su participación. En este sentido, es destacable la medición de  $LTE_4$  efectuada en orina de pacientes con asma extrínseco tras la provocación inhalativa (253), y en el asma con intolerancia a AAS (276). Se han hecho también determinaciones en el líquido de LBA tras la provocación inhalativa y tras la ingesta de aspirina, en los trabajos referidos antes, generalmente en la fase inmediata del asma, en los que se muestran resultados poco definitivos.

Es menos conocido el papel que puedan tener en el asma intrínseco, aunque se asuma que sea similar. Dado que se desconocen las causas de este tipo de asma, es difícil encontrar un animal de experimentación que lo simule. Se ha estudiado experimentalmente en la hiperreactividad bronquial inducida por ozono, destacando la liberación de  $LTB_4$  como primer mediador aislado (117, 118, 119).

Otra posibilidad de estudio es la de medir la liberación de mediadores por las células efectoras implicadas en el asma, como se está haciendo en la actualidad.

Las células implicadas son múltiples, desde la conocida desde más antiguo y primitiva protagonista única del asma, la célula cebada, a los eosinófilos, de gran importancia patogénica, macrófagos alveolares, neutrófilos, y recientemente, plaquetas. Es destacable que todas estas células, excepto los neutrófilos, son portadoras de receptores para IgE, de mayor o menor afinidad. Es muy probable que en la patogenia del asma extrínseco los acontecimientos se inicien con la reacción antígeno-mastocito, liberador de prácticamente todos los múltiples e importantes mediadores implicados (324), que a su vez pondrían en "movimiento" a las otras células, cuya acción combinada, liberación de otros mediadores, etc., daría lugar a la aparición de inflamación-fase tardía, y como consecuencia, a la hiperreactividad bronquial inespecífica. A su vez, estas células se influyen en su comportamiento unas a otras, sin olvidar la presencia de linfocitos, predominantemente de tipo T<sub>h</sub> helper (325), que modularía a muchas de ellas.

En este trabajo se pretende estudiar la participación de una de estas células, los **monocitos** sanguíneos, en la patogenia del asma, mediante la determinación de algunos de los mediadores más importantes, los **metabolitos del A.A.**, cuando son sometidos a diversos estímulos.

El hecho de elegir a los **monocitos** periféricos como células de trabajo se debe a la importancia que tienen los macrófagos alveolares como célula predominante en el líquido de lavado broncoalveolar en sanos, su hallazgo incrementado en el LBA de asmáticos, sobre todo en la fase tardía (314) (en estado de activación (310)), y a su probable implicación en las fases

inmediata y tardía del asma, además de su actuación como células presentadoras de antígeno. La similitud entre macrófagos alveolares y monocitos periféricos (318,319,320), hace que se puedan estudiar a estos últimos de forma menos lesiva para el paciente. Además, la inclusión en este trabajo de pacientes con asma severo, como se verá después, dificultaría la práctica de LBA, ya que esta técnica está sólo bien establecida en pacientes con asma moderado.

En cuanto a los eicosanoides estudiados, se han elegido para su cuantificación los que tienen propiedades broncoconstrictoras más acusadas, los LTC<sub>4</sub>-D<sub>4</sub>-E<sub>4</sub>, la PGD<sub>2</sub>, y el TxB<sub>2</sub>. Y también el LTB<sub>4</sub>, potente quimiotáctico, que puede atraer a otras células al lugar de la reacción.

Ya se ha comentado sobradamente las características de los leucotrienos sulfidopéptidos y su hallazgo en el líquido de LBA (254, 255, 256, 257), así como su posible implicación en la producción de la hiperreactividad bronquial.

La elección de la PGD<sub>2</sub> viene avalada por los siguientes hechos: fué inicialmente considerada como producto exclusivo de los mastocitos, pero en la actualidad se ha demostrado que es producida por los macrófagos peritoneales de ratón (299) y probablemente por los macrófagos alveolares humanos (285), y en una mínima cantidad, por las plaquetas (216). Y en este trabajo se pretende saber si se produce también por los monocitos humanos periféricos.

El TxB<sub>2</sub> se considera hoy de importancia en la producción de hiperreactividad bronquial (326), dado su carácter broncoconstrictor y la cantidad en que se produce.

En cuanto a la **selección de los grupos de pacientes**, se ha querido considerar tanto el asma extrínseco como el intrínseco. El extrínseco es más fácil de conocer mediante experimentación en animales y humanos, como se señaló antes. Para este trabajo se ha elegido el asma extrínseco por antonomasia, el producido por sensibilidad a pólenes, y se ha estudiado en la fase inactiva de la enfermedad, fuera de la época primaveral, para conocer su situación basal.

El asma intrínseco constituye un campo patogénico casi totalmente desconocido, y se ha querido comprobar aquí si hay alguna diferencia en la liberación de mediadores entre este tipo de asma, el extrínseco y los sanos. Dentro del asma intrínseco se han considerado tres grupos, el asma moderado y el asma severo, córticodependiente, de evolución más grave. Y finalmente, dentro de este tipo de asma, se incluye el intrínseco con intolerancia a AINE. La patogenia de este asma constituye hoy día un desafío científico. La lógica nos dice que la intolerancia se debe producir por alteraciones en el metabolismo de los eicosanoides, al ser modificada la vía ciclooxigenasa por la ingesta de AINE. Si fuese así, y la inhibición de la vía ciclooxigenasa condujese a la desviación del metabolismo del A.A. a la formación incrementada de leucotrienos, como se ha dicho, todos los asmáticos deberían empeorar tras la ingesta de AAS, cosa que no sucede, es más, una mínima proporción de ellos mejoran tras la administración de AINE (327). Quizás la alteración sea secundaria a alguna otra vía de activación, por ejemplo, una producción alterada de tromboxanos. No se sabe. De todas formas, debe ser una anomalía añadida posteriormente al

desencadenamiento del asma, puesto que los pacientes toleran AINE durante más o menos tiempo, hasta que un día inician la intolerancia, con episodios de agudizaciones asmáticas que en ocasiones los lleva a la UVI.

Por las razones antes apuntadas, los estudios sobre esta teoría se deben realizar en las células efectoras. Se ha estudiado en basófilos periféricos (267) como célula equivalente a los mastocitos, aunque no totalmente, puesto que no producen  $PGD_2$ , y la diversidad actualmente conocida de mastocitos hace más difícil su equivalencia. En este trabajo se estudian en monocitos, otra posible célula efectora, en gran parte equivalente a macrófagos alveolares.

Y se ha querido estudiar la liberación de eicosanoides en los primeros 30 minutos tras los estímulos, tanto en la reacción por alérgeno como en la posible inhibición por aspirina, pues es en este tiempo en el que se producen las crisis de asma, tanto en el asma extrínseca (fase inmediata), como en la provocación por aspirina.

Los estímulos empleados son los siguientes:

1º. IgG anti IgE, como estímulo de los receptores IgE de los monocitos.

2º. Ionóforo de calcio A.23187, que al abrir los canales de calcio libera los mediadores contenidos en las células al máximo.

3º. Zimosán opsonizado como estímulo de los receptores  $C_{3b}$  de los monocitos, para estudiar otra forma de estimulación inmunológica diferente a la IgE.

4º. Inhibición de la liberación inespecífica producida por el ionóforo de calcio con AAS, inhibidor de la vía

ciclooxigenasa.

Con estas bases se pretende investigar los puntos que siguen:

1º Si los monocitos periféricos humanos son productores de  $PGD_2$ .

2º Si existe una diferencia significativa en la producción basal de eicosanoides por los monocitos circulantes en los distintos tipos de asma, en comparación con el grupo control.

3º Si el comportamiento tras el estímulo con anti IgE es diferente entre el grupo control y el grupo con asma extrínseco (los enfermos atópicos portan más receptores para IgE que los sanos), en cuanto a la cantidad de eicosanoides o a algún tipo de ellos.

4º Si existe diferencia con este estímulo entre el asma extrínseco y el intrínseco (no se ha publicado si los monocitos de los asmáticos intrínsecos tienen más receptores para IgE), tanto en la cantidad de cada uno de los eicosanoides como en el predominio de alguno de ellos.

5º Si el estímulo con ionóforo de calcio induce diferencias en las cantidades de eicosanoides liberados por los distintos tipos de asma y por los sanos.

6º Estudiar los mismos puntos tras la liberación por estímulo de los receptores de complemento.

7º Si la inhibición de la vía ciclooxigenasa produce diferencias entre los monocitos de intolerantes y de los otros grupos de asmáticos, intentando probar si es cierta la teoría de mayor producción de leucotrienos en estos casos, o si se produce alguna otra anomalía.

Todo ello nos puede conducir a conocer mejor la forma de participación de los monocitos en el asma, en general, y en los distintos grupos estudiados, en particular.

**VII.- MATERIALES Y METODOS.**

## 1.- MATERIALES UTILIZADOS.

- Suero fisiológico estéril (Lab.Brown)
- Lymphoprep: Metrizoato sódico (9,6% p/v) y Ficoll (5,6% p/v) (Lab. Nycomed AS)
- Solución salina blanceada de Hank (HBSS) modificada con 0,35 g/l de bicarbonato (Lab. Flow)
- Medio de cultivo RPMI 1640 con buffer 20 mM HEPES pH 7,4 (Lab. Flow)
- Suero de ternera fetal (Lab.Seralab)
- L-glutamina estéril (Lab.Flow)
- Antibiótico (Penicilina 5000 UI/ml + Estreptomina 5000 µg/ml) estéril (Lab.Flow)
- Medio de cultivo RPMI completo: contiene RPMI 1640 con buffer 20 mM HEPES pH 7,4 + antibiótico al 4% + L glutamina al 2% + suero de ternera fetal al 10%
- Buffer fosfato salino (PBS) con  $CA^{2+}$  y  $MG^{2+}$
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Lab.Merck)
- Etanol (Lab.Merck)
- Ionóforo de Calcio A 23187, 10 mg/ml en DMSO (Lab.Calbiochem)
- Ac.Acetilsalicílico (Lab.Sigma)
- Zimosán (Lab.Sigma)
- Pool de sueros humanos
- IgG de cabra anti IgE huamana policlonal, 700 µg/ml (Lab.Serotec)
- Líquido de centelleo, Cocktail 22 Normascent (Lab.Scharlau)
- Acido araquidónico (H3) Amersahan 1 µCi/ml
- Tubos de ensayo
  - Contenedores de plástico de 25 ml con tapón, estériles

- Tubos de poliestireno de 100 x 16 mm estériles con tapón (Lab.Flow)
- Tubos de poliestireno de 13 x 75 mm con tapón (Lab.Soria Greiner)
- Tubos de microcentrifuga de polipropileno Eppendorf de 1,5 ml (Lab AMS)
- Tubos de microcentrifuga de polipropileno Eppendorf de 3 ml (Lab. AMS)
- Tubos para centelleo 4 ml (Lab.Beeckman)
- Pipetas (Tecnoramma)
- Placas Costar 3406 con 6 pocillos de 35 mm. de diámetro, de plástico (Costar)
- Cámara de Neubauer
- Pipetas graduadas estériles de 1 ml, 10 ml, 25 ml. (Costar)
- Pipetas Glison de 10, 20, 100, 1000  $\mu$ l
- Puntas desechables para estas pipetas
- Pipetas Pasteur de plástico estériles
- Pipetus
- Pipetas Pasteur de cristal
- Filtro milipore 0,2  $\mu$  (Lab Flow)
- Centrífuga Sorvall GLC -2B
- Centrífuga Sorvall RC-S, refrigerada
- Cámara de flujo laminar Talstar
- Estufa para cultivos Heraeus
- Contador beta LKB Wallac - 1217 Racketa
- Agitador magnético (Selectra)
- "Vortex" (Fisson)

## **2.- PACIENTES**

Han sido estudiados cinco grupos de pacientes asmáticos y un grupo de controles sanos, con la siguiente distribución:

- Grupo A: constituido por 6 controles sanos
- Grupo B: formado por 6 pacientes con asma extrínseco por sensibilización a pólenes
- Grupo C: integrado por 6 pacientes con asma intrínseco moderado
- Grupo D: incluye a 6 pacientes con asma intrínseco severo
- Grupo E: formado por 6 pacientes con asma intrínseco con intolerancia a AINE.

El diagnóstico de asma se hizo siguiendo los criterios dados en 1981 por el Comité de la Sociedad Torácica Americana (3).

Los pacientes asmáticos presentaban rinitis asociada.

En todos los sujetos estudiados se realizó espirometría basal. Ninguno era alérgico a penicilina ni estreptomycinina.

Las características clínicas de cada grupo son las siguientes:

### Grupo A

Las características de edad, sexo y FEV<sub>1</sub> constan en la tabla XI. En ninguno de los individuos existían antecedentes personales o familiares de atopia. No estaban sometidos a ningún tratamiento.

### Grupo B

En la tabla XII constan las características clínicas de edad, sexo, años de evolución de su enfermedad, niveles de IgE, eosinofilia en sangre y exudado nasal, y FEV<sub>1</sub>. No estaban sometidos a tratamiento al estar libres de síntomas, pues fueron

estudiados fuera de la estación de polinización. Es por ello que los niveles de IgE estaban discretamente incrementados en la mayoría de ellos, y no existía eosinofilia en sangre periférica ni en exudado nasal. Así mismo, las cifras de FEV<sub>1</sub> estaban dentro de los límites normales. Todos ellos tenían pruebas cutáneas y RAST positivo a pólenes de gramíneas, y en dos de ellos también a polen de olivo, siendo negativas a los restantes neumoaergenos. Ninguno había sido previamente tratado con hiposensibilización.

### Grupo C

Se muestra en la tabla XIII la edad, sexo, años de evolución, tratamiento, niveles de IgE, eosinofilia en sangre periférica y en esputo/exudado nasal, y las cifras de FEV<sub>1</sub> basal. En todos fueron negativas las pruebas cutáneas a 15 neumoaergenos (polvo, ácaros, pólenes de árboles, malezas y gramíneas, hongos ambientales y epitelios de perro y gato). En todos, excepto en uno, los niveles de IgE estaban dentro de límites normales. Todos estaban sometidos a tratamiento con teofilina retardada, broncodilatadores beta adrenérgicos en inhalación y corticoides inhalados (budesonida o beclometasona).

Han sido clasificados como asma moderado en el sentido de su evolución clínica, la no necesidad de corticoides sistémicos para el mantenimiento de una situación estable y el no haber presentado más de 2-3 agudizaciones importantes al año.

Las extracciones de sangre para el estudio se hicieron previa supresión de teofilinas retardadas desde 24 h. antes y de inhaladores beta y corticoides 12 horas antes.

#### Grupo D

Sus parámetros clínicos aparecen reflejados en la tabla XIV.

Se realizaron las mismas determinaciones que en los grupos anteriores. Las pruebas cutáneas a 15 neumoalergenos fueron negativas.

Se clasificaron como asma severo al requerir corticoides sistémicos para el mantenimiento de una situación clínica relativamente estable, y sufrieron más de 6 agudizaciones importantes al año, que requerían incremento de las dosis de corticoides sistémicos administrados, y en alguna ocasión, ingreso hospitalario. De ellos, 4 pacientes tomaban 6 metilprednisolona en días alternos, y 2 a diario. La extracción de sangre se realizó en el día que no tomaban corticoides (los que tenían dosificación en días alternos), y en los otros dos, en horas previas a la toma correspondiente. Se suspendió la administración de teofilina retardada 24 horas antes, pero no se pudo suspender la inhalción de beta adrenérgicos ni de corticoides inhalados.

#### Grupo E

Fueron estudiados los mismos parámetros que en los grupos anteriores (tabla XV). No se incluyeron pacientes asmáticos que habían tenido pruebas cutáneas positivas previas a la iniciación de intolerancia a AINE. Las pruebas cutáneas a 15 neumoalergenos fueron negativas,

El diagnóstico de intolerancia a AINE se hizo siguiendo los criterios que parecen en la tabla V, con los resultados que se muestran en la tabla XVI, . destacando que, de forma habitual, se suspenden las provocaciones con los AINE potencialmente

peligrosos cuanto tenemos provocaciones positivas a dos AINE, comprobando también tolerancia a antiinflamatorios "menores", habitualmente bien tolerados. Se incluye como provocación positiva en la paciente nº 1 la toma de pirazolonas de motu proprio, que requirió ingreso en la UVI, y que no le fué administrado posteriormente.

Es de destacar que el tratamiento de este grupo de pacientes no es tan homogéneo como en los grupos anteriores. Una paciente, nº 6, no se administraba ningún fármaco de forma habitual, sólo inhaladores beta adrenérgicos esporádicos, pues sus síntomas bronquiales eran mínimos, destacando en ella los motivados por rinitis y poliposis nasal, que trataba con esteroides tópicos. La paciente nº 2 sólo se administraba de forma habitual budesonida inhalada, y utilizaba los broncodilatadores beta dos de forma esporádica, no a diario.

Entre los que tomaban corticoides sistémicos, una mantenía ingesta diaria de 6 metil-prednisolona (nº 3), y los restantes lo tomaban en días alternos. Los criterios de supresión de la medicación fueron los mismos que en los grupos anteriores, según los fármacos que tomaban.

### 3.- METODOS

#### 3.1.- Obtención de monocitos.

En todos los sujetos estudiados se realizó extracción de 40 ml. de sangre venosa heparinizada, en condiciones estériles. Los pasos siguientes se realizaron en campana de flujo laminar Talstar 1. Se añade a la sangre 40 ml de suero fisiológico estéril para conseguir dilución de células. Seguidamente se procedió a la separación de células monocitoides utilizando gradiente de Lymphoprep de la siguiente forma: se depositan 4 ml de Lymphoprep en la base de cada uno de 20 tubos de poliestireno de 100 x 16 mm. estériles. Sobre ello, se depositan otros 4 ml. de la solución sangre-suero fisiológico, dejándolo escurrir por las paredes del tubo para que no se mezcle con el Lymphoprep. Para ello se utilizaron pipetas graduadas estériles de 10 y 25 ml, con Pipetus.

Una vez cerrados, estos 20 tubos se centrifugan durante 30 minutos a 2000 rpm en centrífuga Sorwall GLC-2B. Se obtiene depósito de las células hemáticas, excepto los monocitoides, en la base del tubo, sobre ello Lymphoprep, seguido de un anillo de células monocitoides, y por encima, plasma (fig 10).

A continuación se toma la interfase o anillo de células monocitoides con una pipeta estéril Pasteur de plástico, y se deposita en 6 contenedores de plástico de 25 ml. estériles, con tapón. Se añade 15 ml de HBSS en cada uno y se centrifuga durante 12 min a 2000 rpm, en centrífuga Sorwall GLC-2B. Una vez obtenido el pellet celular, se decanta el sobrenadante, y se procede a la adición de otros 15 ml. de HBSS, siguiendo el método anterior, y repitiendo la operación hasta 3 veces. Una vez finalizados los

lavados, se reducen todos los pellets a uno, se añade 10 ml. de HBSS. y se procede a contar el número de células monocitoides en cámara de Neubauer. Para ello se utiliza la solución siguiente:

100  $\mu$ l de la solución celular

700  $\mu$ l de PBS

200  $\mu$ l de Azul Tripan

De esta mezcla, se toman 10  $\mu$ l que se colocan en la cámara de Neubauer. Se comprueba la viabilidad de las células, que es de un 90% por término medio, y se cuentan las células. Una vez obtenido este número, se calculan las contenidas en los 10 ml. primitivos.

Tras nuevo centrifugado a 2000 rpm durante 12 min en la misma centrífuga, se añaden 20 ml de RPMI-completo, se homogeniza la mezcla, y se depositan 2 ml de la misma en cada uno de 10 pocillos de placas de cultivo Costar 3046 ( se utilizan 2 placas), para aplicación posterior de 5 estímulos por duplicado.

Tras incubación durante 20 h. a 37°C en estufa Heraeus para que los monocitos se adhieran al fondo de los pocillos, se procede a aspirar el sobrenadante y se lavan por tres veces con 1 ml de PBS con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>. Estos pasos ya no se realizan en condiciones de esterilidad. Las células adheridas al fondo de los pocillos son monocitos, en tanto que los linfocitos han sido eliminados con los lavado. Seguidamente se procede a la adición de estímulos, que se indicarán más tarde.

### 3.2.- Comprobación de la capacidad de los monocitos para liberar eicosanoides.

Se realizó el siguiente experimento, utilizando sangre de individuos sanos: tras la obtención de los monocitos adheridos a la placa, se marcaron las células con Ac. araquidónico ( $H_3$ )  $3\mu Ci/ml$ , y se dejó incubar a  $37^{\circ}C$  en estufa Heraeus durante toda la noche. Al día siguiente se procedió a añadir estímulos por duplicado con 1 ml de RPMI 1640, considerado como blanco, zimosan opsonizado (Zim-op)  $160\ \mu l$  en 1 ml de RPMI 1640, e ionóforo de calcio A 23187,  $10\ \mu M$  en 1 ml de RPMI 1640. Se incubaron durante 30 minutos en estufa a  $37^{\circ}C$ , y se detuvo la reacción mediante frío. Seguidamente se aspiró el sobrenadante, se centrifugó a 2000 rpm a  $4^{\circ}C$  en centrífuga refrigerada Sorvall RC-S, y se procedió a contar la radioactividad de una alícuota de  $50\ \mu l$  en contador beta.

Paralelamente, se procedió al raspado de las células adheridas a los pocillos, con  $500\ \mu l$  de Triton X100, contanto  $50\ \mu l$  del líquido obtenido en contador beta. Los resultados en dpm y el porcentaje de liberación se pueden ver en la tabla XVII.

Se comprueba que el porcentaje de liberación tras los estímulos con Ionóforo de Calcio y Zimosán opsonizado es significativamente superior a la liberación basal.

### 3.3.- Relación del número de células sembradas con la producción de LTB<sub>4</sub>

A fin de conocer si se podía relacionar la cantidad de eicosanoides producidos con el número de células sembradas, seprocedió al siguiente experimento, utilizando sangre de un

individuo sano:

Una vez obtenido el pellet de células monocitoides, se distribuyeron en 4 pocillos por duplicado, a concentraciones crecientes de las células. Tras la correspondiente incubación y lavados indicados antes, se estimularon todos los pocillos con ionóforo de calcio A 23187, 10  $\mu$ M en 1 ml de RPMI-1640. Se incubaron a 37°C durante 30 minutos, se obtuvo el sobrenadante, se centrifugó a 2000 rpm durante 12 min en centrífuga refrigerada Sorvall RC-S, a 4°C, y se procedió a la determinación de la cantidad de LTB<sub>4</sub> liberado en cada pocillo, siguiendo el protocolo que se describirá posteriormente. Los resultados obtenidos se exponen en la fig 11 y muestran una relación lineal entre el número de células sembradas y la cantidad de LTB<sub>4</sub> liberado. Por ello, los resultados finales del estudio se presentan expresados en la cantidad de eicosanoide liberado por 1 millón de células, en 1 ml (volumen del estímulo).

#### 3.4.- Estímulos empleados

Se busca en primer lugar la producción basal de eicosanoides por las células, y para ello se añadieron a dos pocillos el líquido de cultivo, RPMI 1640 descrito en materiales, a volumen de 1 ml. Las alteraciones encontradas con otros estímulos se referirán a éste, denominado blanco o producción basal.

La selección de los siguientes estímulos se hizo según la experiencia previa de Moscat y cols (299) en el caso de ionóforo de calcio A 23187 y de Zimosán opsonizado, y según Goetzl y cols (267) para la concentración de ácido acetilsalicílico.

Para conocer la concentración idónea de IgG anti IgE, se

llevó a cabo el siguiente experimento, utilizando sangre de una paciente con asma por sensibilización a pólenes:

Se siguieron los pasos descritos hasta la obtención de monocitos adheridos a la placa, y se procedió a estimularlos, por duplicado, con concentraciones decrecientes de la solución basal conteniendo 700  $\mu\text{g/ml}$  de anti IgE: 10  $\mu\text{l}$ ; 1  $\mu\text{l}$ ; 0,1  $\mu\text{l}$ ; 0,01  $\mu\text{l}$ ; 0,001  $\mu\text{l}$ , todas las diluciones en 1 ml de RPMI 1640 como volúmen final, cuantificándose la producción de  $\text{LTB}_4$ . Los resultados obtenidos fueron:

Blanco -----	10,1 $\text{pg}/10^6$ cels/1 ml.
10 $\mu\text{l}$ anti IgE -----	8,6 $\text{pg}/10^6$ cels/1 ml.
1 $\mu\text{l}$ anti IgE -----	14,4 $\text{pg}/10^6$ cels/1 ml.
0,1 $\mu\text{l}$ -----	15,2 $\text{pg}/10^6$ cels/1 ml.
0,01 $\mu\text{l}$ -----	20,2 $\text{pg}/10^6$ cels/1 ml.
0,001 $\mu\text{l}$ -----	40,5 $\text{pg}/10^6$ cels/1 ml.

(fig 12).

Se eligió la última concentración para el estudio (0,001  $\mu\text{l}$ )

También se comprobó el efecto que los diluyentes empleados en otros estímulos, (etanol para el ac. acetilsalicílico, y DMSO para el ionóforo de calcio), pudieran tener sobre la liberación de eicosanoides. Para ello, se realizó un cultivo similar a los anteriores, utilizando sangre de un individuo sano, y se prepararon los estímulos a las mismas concentraciones utilizadas para preparar la solución de ácido acetilsalicílico, ionóforo de calcio, además del estímulo con ionóforo de calcio 10  $\mu\text{M}$ , y de ácido acetil salicílico  $5 \cdot 10^{-6}$  M con posterior adición de ionóforo, siempre en RPMI-1640, 1 ml. Se cuantificó la producción de  $\text{LTB}_4$ , obteniéndose los siguientes resultados:

Blanco -----	1,7 pg/10 <sup>6</sup> cels/ml
Etanol -----	7,7 pg/10 <sup>6</sup> cels/ml
DMSO -----	2,2 pg/10 <sup>6</sup> cels/ml
Ionof.Ca -----	65,5 pg/10 <sup>6</sup> cels/ml
AAS+Ionof.Ca ----	52,2 pg/10 <sup>6</sup> cels/ml

(fig 13)

Se comprueba que el estímulo con DMSO es mínimo, y con etanol es algo mayor, como está descrito (299), aunque prácticamente no significativo en la producción con el estímulo de aspirina.

En base a todo ello, los estímulos que se utilizan en este trabajo son los siguientes:

- Blanco o basal: 1 ml RPMI-1640
- IgG anti IgE: solución de 0,001 µl en 1 ml de RPMI-1640
- Ionóforo de Ca 23187, diluido en DMSO, 10 µM en 1 ml de RPMI-1640
- Zimosán opsonizado, conteniendo 160 µg en 1ml de RPMI-1640,
- Solución de AAS 5.10<sup>-6</sup> M en 1 ml de RPMI-1640, con posterior adición de Ionóforo de Ca 23187, 10 uM

### 3.5.- Método de adición de estímulos en los pacientes estudiados.

Una vez obtenidos los monocitos adheridos a la placa de cultivo, se procede a añadir los estímulos antes indicados: en la primera placa, se añade 1 ml de RPMI 1640 en los pocillos marcados 1 y 2; en los marcados 3 y 4, se añade la solución de anti IgE; el ionóforo de Ca 23187 se añade en el 5 y 6. En la 2ª

placa , en el 7 y 8 solución de AAS  $5.10^{-6}$  M; en el 9 y 10, zimosán opsonizado.

Se incubaba a 37°C en estufa Heraeus durante 30 minutos, y se extraen las placas. La 1ª placa se coloca en hielo para detener la reacción, procediéndose a la extracción del sobrenadante por aspiración, y depositándolo en los correspondientes tubos de polistereno de 13 x 75 mm, que se mantienen en frío. Estos tubos se centrifugan a 4°C en centrífuga refrigerada de Sorvall RC-S a 2000 rpm durante 12 minutos, para separar los posibles restos celulares que se hubiesen podido arrastrar al aspirar la placa, y se vuelve a aspirar el sobrenadante.

En la placa 2ª se procede a la adición de Ionóforo de Ca en los pocillos 7 y 8, en la misma proporción que en los 5 y 6, y se procede a una nueva incubación de la placa durante 30 minutos en estufa Heraeus a 37°C. Seguidamente se procede como con la placa 1ª para la extracción del sobrenadante.

A continuación, los líquidos sobrenadantes se alicuotan en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y se almacenan a -20°C hasta que se procede a la cuantificación de eicosanoides.

### 3.6.- Cuantificación de eicosanoides

Para la determinación de eicosanoides se utilizaron kits comerciales de radioinmunoensayo, siguiendo las indicaciones del fabricante, Amershan Internacional (UK).

En todos, el ensayo está basado en la competición entre el eicosanoide a estudiar, no marcado, y una cantidad fija de eicosanoide marcada con tritio, para unirse a una cantidad limitada de un anticuerpo, que tiene alta afinidad y

especificidad para el eicosanoide a determinar. La cantidad de ligando radioactivo unido al anticuerpo será inversamente proporcional a la concentración de ligando no radiactivo añadido. La medida de la radioactividad ligada a proteína permite cuantificar la cantidad de eicosanoide en la muestra a determinar.

La separación del eicosanoide ligado a proteína del líquido no unido se consigue por absorción del eicosanoide libre a dextrano-carbon activado, seguida de centrifugación. La medida de radioactividad en el sobrenadante cuantifica la cantidad de ligando radioactivo unido a anticuerpo. La concentración del eicosanoide a determinar en la muestra se calcula mediante una curva standard. (fig 14)

Seguidamente se detallan los protocolos seguidos para la determinación de cada eicosanoide.

### 3.6.1- Leucotrieno B<sub>4</sub>

El kit contiene cantidades de reactivos suficientes para la construcción de una curva standard (11 tubos por duplicado) y para cuantificar 50 muestras por duplicado.

Los reactivos a utilizar son los siguientes:

- LTB<sub>4</sub> standard, 10 ng, liofilizado.
- LTB<sub>4</sub> (H<sup>3</sup>) ~ 18,5 KBq ~ 0,5 µCi en 250 µl de metanol: agua: ác.acético (60:40:0.01), ph 5,6.
- Antisuero LTB<sub>4</sub> liofilizado.
- Buffer de ensayo; liofilizado que en reconstitución contiene buffer tris HCl 0,05 M, pH 8,6, conteniendo 0,1% p/v de gelatina.

- Dextrano recubierta de carbón activado: liofilizado que tras la reconstitución contiene 2% p/v de suspensión de carbón activado con 0,4% p/v de dextrano en buffer tris HCl 0,05 M, ph 8,8, conteniendo 0,1% p/v de gelatina.

La reconstitución de los reactivos se hace con agua destilada (buffer de ensayo, dextrano-carbón activado) y con buffer de ensayo para LTB<sub>4</sub> (H<sup>3</sup>), antisuero y standards, siguiendo las instrucciones del fabricante.

El protocolo de ensayo es como sigue:

Día 1º

1º Se preparan las diluciones de standard de LTB<sub>4</sub> con buffer de ensayo en tubos de microcentrífuga de polipropileno de 1,5 ml, obteniéndose las cantidades de 1,6 pg; 3,1 pg; 6,2 pg; 12,5 pg; 25 pg; 50 pg; 100 pg; y 200 pg. Se deben preparar una hora antes de realizar el radioinmunoensayo para minimizar cualquier efecto de absorción del LTB<sub>4</sub> a las paredes de los tubos.

2º Tras marcar convenientemente los tubos de microcentrífuga de polipropileno de 3 ml como cuentas totales (TC), tubos de unión no específica (NSB), tubos cero standard (Bo), los standards indicados en el punto 1º y las muestras a determinar, se depositan 200 µl del buffer de ensayo en los tubos NSB y TC, y 100 µl en los marcados Bo.

3º Se pipetea 100 µl de cada dilución de standards en los tubos apropiados, y 100 µl de cada muestra a determinar en los tubos apropiados.

4º Se añaden 100 µl de LTB<sub>4</sub> (H<sup>3</sup>) en todos los tubos.

5º Seguidamente se pipetea 100 µl del antígeno en todos los

tubos, excepto en los marcados NSB y TC.

6º Se agitan todos los tubos en "vortex" durante 2-5 segundos para mezclar los reactivos y se dejan incubar durante toda la noche a 4ºC.

Día 2º

7º Se agita el dextrano-carbón activado durante 10 minutos, utilizando un agitador magnético.

8º Se depositan 200 µl del buffer de ensayo en los tubos marcados TC.

9º Mientras se sigue agitando la solución de dextrano-carbón activado, se pipetea 200 µl del mismo en todos los tubos, excepto en los marcados TC.

10º Se agita cada tubo inmediatamente después de la adición del dextrano-carbón activado al último tubo.

11º Se centrifugan todos los tubos a 2000 g. durante 10 minutos, a 4ºC en centrífugas refrigerado Sorvall RC-S.

12º Inmediatamente después de la centrifugación, se decanta el sobrenadante en tubos de centelleo, cuidando no alterar el pellet de dextrano-carbón activado.

13º Se añade a cada tubo el líquido de centelleo y se cuentan en contador β.

El cálculo de los resultados se lleva a cabo utilizando la media de cuentas por minuto (cpm) de cada pareja de tubos. Se calcula el porcentaje normalizado ligado de cada standard y muestra utilizando la siguiente ecuación:

$$B/B_0\% = \frac{(\text{cpm de estándar o muestra} - \text{cpm NSB})}{(\text{cpm } B_0 - \text{cpm NSB})} \times 100$$

La curva standard se confecciona utilizando el porcentaje normalizado obtenido, como función del  $\text{Log}_{10}$  de la concentración de  $\text{LTB}_4$ , para lo que se utiliza papel semilogarítmico, colocándolo en el eje de ordenadas, y los  $\mu\text{g}$  contenidos en cada standard en el eje de abscisas. Los  $\mu\text{g}$  de  $\text{LTB}_4$  contenidos en cada muestra se calculan sobre esta curva (fig.15).

La especificidad del antisuero frente a  $\text{LTB}_4$  es la siguiente:

Compuesto	Reactividad cruzada % (desplazamiento 50% B/B <sub>0</sub> )
$\text{LTB}_4$ -----	100
20-OH- $\text{LTB}_4$ -----	0,4
6-trans $\text{LTB}_4$ -----	0,4
$\text{LTC}_4$ -----	< 0,05
$\text{LTD}_4$ -----	< 0,05
5 - HETE-----	< 0,05
12 - HETE-----	< 0,05
$\text{T}_x\text{B}_2$ -----	< 0,05
$\text{PGF}_{2\alpha}$ -----	< 0,05
A. A.-----	< 0,05

### 3.6.2.- Leucotrieno C<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>

El kit contiene cantidades de reactivo suficientes para la construcción de una curva standard (10 tubos por duplicado) y para cuantificar 52 muestras por duplicado.

Los reactivos a utilizar son los siguientes:

- $\text{LTC}_4$  standard, 50 ng en 250  $\mu\text{l}$  de buffer fosfato 0,05 M,

ph 6,9:etanol (2:,1)

- LTC<sub>4</sub>(H<sup>3</sup>) ~ 18,5 k Bq ~ 0,5 µCi en etanol: agua: ac.acético  
(60:40:0,1) ph 6,9

- Antisuero específico peptido-leucotrieno liofilizado.

- Buffer de ensayo: solución compuesta de buffer fosfato  
0,05 M ph 7,4, conteniendo ClNa 0,14 M y gelatina 0,01%

- Dextrano recubierto de carbón activado: solución  
conteniendo carbón activado 1,6% y dextrano 0,32% en buffer de  
ensayo.

La reconstitución de los reactivos se hace con buffer de  
ensayo.

El protocolo de ensayo es como sigue:

Dia 1º

1º Se preparan las diluciones de standard de LTC<sub>4</sub> con buffer  
de ensayo, en tubos de microcentrífuga de polipropileno de 1,5  
ml, obteniéndose las cantidades 12,5 pg; 25 pg; 50 pg; 100 pg;  
200 pg; 400 pg y 800 pg. Se deben preparar 1 hora antes de  
realizar el radioinmunoensayo, como se indica en el protocolo de  
LTB<sub>4</sub>.

2º Tras marcar convenientemente los tubos de microcentrífuga  
de polipropileno por duplicado (Eppendorf) de 3 ml como cuentas  
totales (TC), tubos de unión no específica (NSB), tubos cero  
standard (B<sub>0</sub>), los standards indicados en el punto 1º, y las  
muestras a determinar, se depositan 100 µl de cada standard en  
los tubos apropiados, y 100 µl de cada muestra en los tubos  
apropiados.

3º Se pipetea 100 µl de LTC<sub>4</sub>(H<sup>3</sup>) en todos los tubos

4º Se pipetea 100 µl de antisuero en todos los tubos,

excepto en los marcados NSB

5º Se pipetea 100  $\mu$ l de buffer de ensayo en los tubos que contienen standards y muestras, 200  $\mu$ l en los tubos TC y B<sub>0</sub>, y 300  $\mu$ l en los tubos NSB

6º Se agitan todos los tubos en el "vortex" y se incuban toda la noche a 4ºC

Día 2º

7º Se colocan todos los tubos en baños de agua con hielo y se dejan equilibrar durante 15 minutos

8º Al mismo tiempo, se coloca el frasco de dextrano-carbón activado en baño de agua-hielo y se agita durante 10 minutos usando un agitador magnético

9º Se pipetea 250  $\mu$ l de buffer de ensayo en los tubos TC

10º Se pipetea 250  $\mu$ l de la suspensión dextrano-carbón activado, mientras se agita, en todos los tubos, excepto en los TC

11º Se agita cada tubo en el "vortex" inmediatamente después de la adición del dextrano-carbón activado en el último tubo

12º Se dejan reposar todos los tubos en baño de agua-hielo durante 15 minutos

13º Se centrifugan todos los tubos a 2000 g durante 15 minutos a 4º C en centrifuga refrigerada Sorval RC-S

14º Tras centrifugación, se colocan todos los tubos en baño de agua-hielo e inmediatamente se decanta el sobrenadante en tubos de centelleo, cuidando no alterar el pellet dextrano-carbón activado.

15º Se añade a cada tubo el líquido de centelleo y se cuenta en contador  $\beta$ .

El cálculo de los resultados se lleva a cabo utilizando la media de cuentas obtenidas por minuto (cpm) de cada pareja de tubos.

Se calcula el porcentaje normalizado ligado de cada standard y muestra utilizando la siguiente ecuación:

$$B/B_0\% = \frac{(\text{cpm de estándar o muestra} - \text{cpm NSB})}{(\text{cpm } B_0 - \text{cpm NSB})} \times 100$$

La curva standard se confecciona utilizando el porcentaje normalizado obtenido como función del  $\text{Log}_{10}$  de la concentración  $\text{LTC}_4$ , para lo que se utiliza papel semilogaritmico, colocándolo en el eje de ordenadas, y los pg contenidos en cada standard en el eje de abscisas. Los picogramos de  $\text{LTC}_4$  contenidos en cada muestra se calculan sobre esta curva (fig 16).

La especificidad del antisuero frente a  $\text{LTC}_4/\text{D}_4/\text{E}_4$  es la siguiente:

Compuesto	Reactividad cruzada % (desplazamiento 50%B/B <sub>0</sub> )
$\text{LTC}_4$ -----	100
$\text{LTD}_4$ -----	64
$\text{LTE}_4$ -----	64
11-Trans $\text{LTD}_4$ -----	30
11-Trans $\text{LTE}_4$ -----	24
$\text{LTB}_4$ -----	< 0,001
$\text{PGE}_2$ -----	< 0,001
$\text{TxB}_2$ -----	< 0,001
A.A -----	< 0,001
glutation -----	< 0,001

### 3.6.3.- Leucotrieno C<sub>4</sub> específico (anticuerpo monoclonal)

El kit contiene cantidades de reactivos suficientes para la construcción de una curva standard (10 tubos por duplicado) y para cuantificar 39 muestras por duplicado.

Los reactivos a utilizar son los siguientes:

- LTC<sub>4</sub> standard, 50 ng/ml en buffer fosfato 0,05 M, ph 6,9: etanol (2:1)
- LTC<sub>4</sub> (H<sup>3</sup>) ~ 37 k Bq ~ 1,0 μ Ci en etanol: agua : acético (60:40:0,01) ph 6,9.
- Antisuero específico : conteniendo anticuerpo monoclonal específico para LTC<sub>4</sub> diluido en buffer de ensayo.
- Buffer de ensayo: solución conteniendo buffer fosfato 0,1 M, ph 7,2, gelatina 0,1% y timerosal 0,001%.
- Dextrano recubierto de carbón activado en buffer de ensayo.

La reconstitución de los reactivos, en este caso sólo de LTC<sub>4</sub>(H<sup>3</sup>) se realiza con buffer de ensayo.

El protocolo de ensayo es como sigue:

Día 1º

1º Se preparan las diluciones de LTC<sub>4</sub> standard con buffer de ensayo, en tubos de microcentrifuga de polipropileno de 1,5 ml, obteniéndose las cantidades de 8 pg; 16 pg; 31 pg; 62 pg; 125 pg; 250 pg; y 500 pg. Se deben preparar 1 hora antes de realizar el radioinmunoensayo, como se indica en el protocolo para LTB<sub>4</sub>.

2º Tras marcar convenientemente los tubos de microcentrifuga de polipropileno de 3 ml por duplicado como cuentas totales (TC), tubos de unión no específica (NSB), tubos cero standard (B<sub>0</sub>), los

standards indicados en el punto 1 y las muestras a determinar, se pipetea 500  $\mu$ l de buffer de ensayo en los tubos marcados TC, 200  $\mu$ l en los marcados NSB, y 100  $\mu$ l en los marcados B<sub>0</sub>.

3º Se pipetea 100  $\mu$ l de cada standard o muestra en los tubos apropiados.

4º Se pipetea 100  $\mu$ l de LTC<sub>4</sub>(H<sup>3</sup>) en todos los tubos.

5º Se pipetea 100  $\mu$ l de antisuero en todos los tubos, excepto en los marcados NSB.

6º Se agitan seguidamente todos los tubos en el "vortex" y se incuban durante 16-20 horas a 2-8°C

Día 2º

7º Se colocan todos los tubos en baño agua-hielo y se dejan equilibrar durante 15 minutos.

8º Se coloca el frasco conteniendo el dextrano-carbón activado en baño agua-hielo y se agitan durante 10 minutos utilizando un agitador magnético.

9º Mientras se sigue agitando, se añade 500  $\mu$ l de dextrano-carbón activado a todos los tubos, excepto los marcados TC, y se mezclan en el "vortex".

10º Se incuban todos los tubos en el baño de agua-hielo durante 10 minutos y a continuación se centrifugan a 2000 g durante 10 minutos a 4°C, en centrífuga refrigerada Sorvall RC-S.

11º Tras la centrifugación, se decanta el sobrenadante en los tubos de centelleo, inmediatamente, cuidando de no alterar el pellet de dextrano-carbón activado.

12º Se añade líquido de centelleo y se cuenta en contador beta.

El cálculo de los resultados se lleva a cabo utilizando la media de cuentas por minuto (cpm) de cada pareja de tubos.

Se calcula el porcentaje normalizado ligado de cada standard y muestra utilizando la siguiente :

$$B/B_0\% = \frac{(\text{cpm de estándar o muestra} - \text{cpm NSB})}{(\text{cpm } B_0 - \text{cpm NSB})} \times 100$$

La curva standard se confecciona utilizando el porcentaje normalizado obtenido como función del  $\text{Log}_{10}$  de la concentración de  $\text{LTC}_4$ , para lo que se utiliza papel semilogarítmico, colocándolo en el eje de ordenadas, y los pg contenidos en cada standard en el eje de abscisas. Los pg de  $\text{LTC}_4$  contenidos en cada muestra se calculan sobre esta curva (fig 17).

La especificidad del antígeno frente a  $\text{LTC}_4$  es la siguiente:

Compuesto	Reactividad cruzada % (desplazamiento 50%B/B <sub>0</sub> )
$\text{LTC}_4$ -----	100
$\text{LTD}_4$ -----	5,4
$\text{LTE}_4$ -----	0,5
11-trans $\text{LTD}_4$ -----	< 0,001
11-trans $\text{LTE}_4$ -----	< 0,001
$\text{LTB}_4$ -----	< 0,001
glutation -----	< 0,001
L cisteina -----	< 0,001
$\text{PGE}_2$ -----	< 0,001
$\text{TxB}_2$ -----	< 0,001
$\text{PGD}_2$ -----	< 0,001

#### 3.6.4.- Prostaglandina D<sub>2</sub>

El kit contiene cantidades de reactivos suficientes para la construcción de una curva standard (10 tubos por duplicado) y para cuantificar 40 muestras por duplicado.

Los reactivos que se utilizan son los siguientes:

- PGD<sub>2</sub> standard: 3ng liofilizada
- PGD<sub>2</sub>(H<sup>3</sup>) ~ 37 k Bq ~ 1 µCi en metanol: agua: acetonitrilo (3:2:1)
- Antisuero PGD<sub>2</sub>, liofilizado
- Buffer de ensayo: concentrado de fosfato que en dilución contiene aproximadamente 0,05 M de buffer fosfato, ph 7,3, gelatina 0,1% y mertiolate 0,01%.
- Dextrano recubierto de carbón activado: conteniendo aproximadamente 1% de Nort A (carbón activado) y 0,05% de dextrano T 70 en buffer fosfato 0,01 M, ph 7,3.

La reconstitución de los reactivos se hace con agua destilada (buffer de ensayo, antisuero, standard), y con buffer de ensayo en el caso de PGD<sub>2</sub>(H<sup>3</sup>), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El protocolo de ensayo es como sigue:

Día 1º

1º Se preparan las diluciones del standard de PGD<sub>2</sub> con buffer de ensayo en tubos de microcentrífuga de polipropileno de 1,5 ml obteniendo las cantidades de 3,1 pg; 6,2 pg; 12,5 pg; 25 pg; 50 pg; 100 pg; 200 pg. Se deben preparar 1 hora antes de comenzar el radioinmunoensayo, como se indica en el protocolo de LTB<sub>4</sub>.

2º Tras marcar convenientemente los tubos de microcentrífuga

de polipropileno de 3 ml por duplicado como cuentas totales (TC), tubos de unión no específica (NSB), tubos cero standard ( $B_0$ ), los standards indicados con el punto 1º y las muestras a determinar, se depositan 100  $\mu$ l de las diluciones standard en los tubos apropiados, y 100  $\mu$ l de las muestras a determinar en los tubos apropiados.

3º Se añade 100  $\mu$ l de  $PGD_2(H^3)$  en todos los tubos.

4º Se pipetea 100  $\mu$ l de antisuero en todos los tubos, excepto en los marcados NSB.

5º Se pipetea 100  $\mu$ l de buffer de ensayo en los tubos marcados standars y muestras, 200  $\mu$ l en los marcados TC y  $B_0$ , y 300  $\mu$ l en los marcados NSB.

6º Tras mezclar todos los tubos en el vortex, se procede a incubar durante toda la noche a 4ºC.

Día 2º

7º Se colocan todos los tubos en baño de agua-hielo y se dejan equilibrar durante 10 minutos, al tiempo que el dextrano-carbón activado se mezcla en un agitador magnético.

8º Se pipetea 500  $\mu$ l de buffer de ensayo en los tubos marcados TC, y 500  $\mu$ l de dextrano-carbón activado en todos los restantes, mezclando cada tubo después de su adición,

9º Se dejan todos los tubos en reposo en el baño de agua-hielo durante 10 minutos.

10º Se centrifugan todos los tubos a 2000 g durante 10 minutos a 4º C en centrífuga Sorvall RC-S.

11º Inmediatamente después se decanta el sobrenadante en los tubos de centelleo. Se ha de cuidar no alterar el pellet de dextrano-carbón activado.

12º Se añade a cada tubo liquido de centelleo y se cuenta en un contador beta.

El cálculo de los resultados se lleva a cabo utilizando la media de cuentas por minutos (cpm) de cada pareja de tubos.

Se calcula el porcentaje normalizado ligado de cada standard y muestra utilizando la siguiente ecuación:

$$B/B_0\% = \frac{(\text{cpm de estándar o muestra} - \text{cpm NSB})}{(\text{cpm } B_0 - \text{cpm NSB})} \times 100$$

La curva standard se confecciona utilizando el porcentaje normalizado obtenido como función del  $\text{Log}_{10}$  de la concentración de  $\text{PGD}_2$ , para lo que se utiliza papel semilogarítmico, colocándolo en el eje de ordenadas, y los pg contenidos en cada standard en el eje de abscisas. Los pg contenidos en cada muestra se calculan sobre esta curva (fig 18).

La especificidad del antisuero frente a PGD es la siguiente:

Compuesto	Reactividad cruzada % (desplazamiento 50%B/B <sub>0</sub> )
PGD <sub>2</sub> -----	100
PGJ <sub>2</sub> -----	7
PGF <sub>2</sub> α -----	0,04
PGE <sub>2</sub> -----	0,002
TxB <sub>2</sub> -----	0,3
A.A -----	0,002

### 3.6.5.- Tromboxano B<sub>2</sub>

El kit contiene cantidades de reactivos suficientes para la construcción de una curva standard (9 tubos por duplicado) y para cuantificar 41 muestras por duplicado.

Los reactivos a utilizar son los siguientes:

- Standard A, conteniendo 3 ng/ml de TxB<sub>2</sub> en buffer de ensayo.
- Standard B, conteniendo 1,1 ng/ml de TxB<sub>2</sub> en buffer de ensayo.
- Standard C, conteniendo 0,4 ng/ml de TxB<sub>2</sub> en buffer de ensayo.
- Standard D, conteniendo 0,13 ng/ml de TxB<sub>2</sub> en buffer de ensayo.
- Standard E, conteniendo 0,05 ng/ml de TxB<sub>2</sub> en buffer de ensayo.
- TxB<sub>2</sub>(H<sup>3</sup>) ~ 37 kBq ~ 1 µCi en buffer de ensayo.
- Antisuero específico diluido en buffer de ensayo.
- Buffer de ensayo, conteniendo buffer fosfato con gelatina y timerosal.
- Dextrano recubierto de carbón activado en buffer de ensayo.

En este caso, no es necesario reconstituir los reactivos.

El protocolo de ensayo es como sigue:

Día 1

1º Se marcan tubos de microcentrífuga de polipropileno de 3 ml por duplicado como cuentas totales (TC), tubos de unión no específica (NSB), tubos cero standard (B<sub>0</sub>), standards A a E y muestras a determinar.

2º Se pipetea 200  $\mu$ l de buffer de ensayo en los tubos marcados TC y NSB, y 100  $\mu$ l en los marcados B<sub>0</sub>.

3º Se pipetea 100  $\mu$ l de TxB<sub>2</sub>(H<sup>3</sup>) en todos los tubos.

4 Se pipetea 100  $\mu$ l de cada standard de TxB<sub>2</sub> en los tubos apropiados, y 100  $\mu$ l de las muestras a determinar en los tubos apropiados.

5º A continuación se pipetea 100  $\mu$ l de antisuero en los tubos marcados B<sub>0</sub>, standards y muestras.

6º Se agitan todos los tubos y a continuación se centrifugan durante 15 segundos a 1000 g, y de nuevo se mezcla el contenido de cada tubo por agitación en "vortex".

7º Se incuban todos los tubos a temperatura ambiente durante 1 hora, y seguidamente a 4ºC durante 16-20 horas.

Día 2º

8º Se colocan todos los tubos en hielo y se pipetea 1 ml de buffer de ensayo en los tubos marcados TC, se mezcla el contenido con "vortex" y se decanta en tubo de centelleo.

9º Se transfiere el dextrano-carbón activado a un vaso de vidrio, se coloca en hielo y se agita usando un agitador magnético.

10º Se pipetea 1 ml de dextrano-carbón activado a cada tubo, y posteriormente se mezcla el contenido con "vortex" cada 2 minutos, hasta completar la adición. Posteriormente se agitan de nuevo con el "vortex".

11º Se incuban los tubos a 0ºC durante 9 minutos.

12º Inmediatamente después se centrifugan a 1000 g durante 10 minutos, a 4ºC en centrifuga refrigerada Sorvall RC-S.

13º Se decanta el sobrenadante en tubos de centelleo, y se

añade líquido de centelleo, llevándolos a contar en contador  $\beta$ .

El cálculo de los resultados se lleva a cabo utilizando la media de cuentas por minuto (cpm) de cada pareja de tubos.

Se calcula el porcentaje normalizado ligado de cada standard y muestra usando la siguiente ecuación:

$$B/B_0\% = \frac{(\text{cpm de estándar o muestra} - \text{cpm NSB})}{(\text{cpm } B_0 - \text{cpm NSB})} \times 100$$

La curva standard se confecciona utilizando el logaritmo  $B/B_0\%$  en lugar del porcentaje normalizado, para lo cual se utiliza papel logaritmico. El resultado  $B/B_0\%$  se coloca en el eje de abscisas y los standard en el de ordenadas, resultando un trazado lineal.

El valor obtenido de las muestras se calcula sobre esta curva (fig. 19).

La especificidad del antisuero utilizado frente a  $TxB_2$  es la siguiente:

Compuesto	Reactividad cruzada % (desplazamiento 50%B/B <sub>0</sub> )
$TxB_2$ -----	100
$PGD_2$ -----	1,2
$PGF_{2x}$ -----	0,15
$PGE_1$ -----	0,05
$PGE_2$ -----	0,05

## VIII.- RESULTADOS

Se muestra en la fig 20 el estudio estadístico en el análisis del FEV<sub>1</sub> de cada grupo estudiado. Se utilizó el test de t de student para muestras independientes. Vemos en ella que no existe diferencia estadísticamente significativa al comparar el grupo A con en el B, pero sí es significativa al comparar el grupo A con el C ( $p < 0,05$ ), y con el D ( $p < 0,005$ ), en tanto no lo es con el E.

Se confirma así la situación clínica expuesta en materiales: los asmáticos polínicos están en situación asintomática, el asma intrínseco moderado y el asma intrínseco severo presenta obstrucción de las vías aéreas, y el asma con intolerancia a AAS, al ser un grupo menos homogéneo en cuanto a su situación clínica, no parece tener obstrucción bronquial. En realidad, observando las cifras absolutas, solamente dos pacientes presentan dicha obstrucción, en el tiempo en que se realizó el estudio.

En la tabla XVIII se expone el **número de células sembradas** por pocillo en cada uno de los 30 sujetos estudiados.

#### 1.- CUANTIFICACION DE EICOSANOIDES TRAS LOS DISTINTOS ESTIMULOS.

En la tabla XIX se muestran las cantidades obtenidas en el grupo A; en la tabla XX, los resultados del grupo B; en la tabla XXI, los del grupo C; en la tabla XXII, los del grupo D; y en la tabla XXIII los del grupo E. En el caso de las determinaciones de TxB<sub>2</sub>, se ha de resaltar que en la mayoría de las ocasiones ha habido que recurrir a cuantificar diluciones del sobrenadante obtenido del cultivo, ya que la cuantificación del sobrenadante como tal sobrepasaba los límites superiores de la curva standard del sistema empleado.

El resultado que se señala como indeterminado indica que los niveles del eicosanoide correspondiente eran inferiores al límite inferior de la curva standard del sistema empleado.

Dado que la determinación de  $LTC_4/D_4/E_4$  comprende todos los leucotrienos sulfidopéptidos, se intentó calcular la cantidad específica de  $LTC_4$  producida. Para ello se utilizó el kit comercial con anticuerpo monoclonal específico para  $LTC_4$  descrito en métodos. Los resultados del conteo de una serie de alicuotas estudiadas mostraron que el anticuerpo específico para  $LTC_4$  no reconoce su existencia en el sobrenadante de los cultivos utilizados. Se puede explicar este resultado asumiendo que las cantidades medidas con el anticuerpo para  $LTC_4/D_4/E_4$  corresponden mayoritariamente a  $LTD_4/E_4$  y no a  $LTC_4$ , probablemente porque este último leucotrieno se metaboliza rápidamente a  $LTD_4/E_4$ .

## 2.- CALCULO ESTADISTICO

Dada la amplia dispersión de los resultados absolutos obtenidos, que imposibilitaban su estudio estadístico, se recurrió a su conversión en logaritmos para poder aplicarlo.

Los datos se procesaron utilizando un paquete estadístico de Hewlett Packard, aplicando el test de t de student para muestras independientes y muestras apareadas. Se ha considerado diferencia estadísticamente significativa valores de  $p < 0,05$ .

En las figuras siguientes se muestran los resultados del cálculo de la media y desviaciones típicas de cada grupo, en la producción basal y tras los correspondientes estímulos, así como las diferencias significativas halladas.

3.- DIFERENCIAS ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LA BASAL DE CADA GRUPO Y LOS ESTIMULOS EMPLEADOS.

- **Grupo A** (sanos): en la fig 21 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de  $LTB_4$ , en el que se observa que no se produce diferencia estadísticamente significativa tras el estímulo con anti IgE, mientras que sí lo es tras el estímulo con zimosán opsonizado ( $p < 0,005$ ), ionóforo de calcio ( $p < 0,005$ ) y de AAS + ionóforo de calcio ( $p < 0,0005$ ).

En la figura 22 podemos ver los resultados en la determinación de  $LTC_4/D_4/E_4$  con resultados similares, pues no hay diferencia tras el estímulo con anti IgE, y sí tras zimosán opsonizado ( $p < 0,05$ ), ionóforo de calcio ( $p < 0,05$ ) y de AAS + ionóforo de calcio ( $p < 0,05$ ).

Observamos en la figura 23 los resultados de la determinación de  $PGD_2$  similares a los anteriores: no hay diferencia significativa tras el estímulo con anti IgE, y sí tras zimosán opsonizado ( $p < 0,005$ ), ionóforo de calcio ( $p < 0,05$ ), y de AAS + ionóforo de calcio ( $p < 0,05$ ).

En la figura 24 se muestran los resultados para la determinación de  $TxB_2$ . En este caso, la diferencia no es significativa tras los estímulos con anti IgE, zimosán opsonizado, ni AAS + ionóforo de calcio, siendo únicamente significativa tras el estímulo de ionóforo de calcio ( $p < 0,005$ ).

- **Grupo B** (polínicos): podemos ver los resultados de la determinación de  $LTB_4$  en la figura 25. La diferencia no es estadísticamente significativa tras el estímulo con anti IgE, ni tras AAS + ionóforo de calcio, y si lo es tras los estímulos con zimosán opsonizado ( $p < 0,05$ ), y con ionóforo de calcio ( $p < 0,05$ ).

Vemos en la fig. 26 los cálculos obtenidos en la determinación de  $LTC_4/LTD_4/LTD_4$ . En este caso, existe diferencia significativa tras todos los estímulos: anti IgE ( $p<0,05$ ), zimosan opsonizado ( $p<0,0005$ ), ionóforo de calcio ( $p<0,0005$ ), y tras AAS + ionóforo de calcio ( $p<0,005$ ).

En la figura 27 se exponen los resultados obtenidos para la determinación de  $PGD_2$ . También en este caso, no existe diferencia significativa tras el estímulo con anti IgE, pero sí lo son tras el estímulo con zimosán opsonizado ( $p<0,05$ ), tras ionóforo de calcio ( $p<0,05$ ), y de AAS + ionóforo de calcio ( $p<0,05$ ).

En la figura 28 se representan los resultados obtenidos en la determinación de  $TxB_2$ , no siendo significativa la diferencia para el estímulo con anti IgE, ni tras AAS+ ionóforo de calcio, y sí en el caso del estímulo con zimosan opsonizado ( $p<0,005$ ) y con ionóforo de calcio ( $p<0,00005$ ).

- **Grupo C** (asma intrínseco moderado): vemos en la figura 29 la representación de las diferencias estadísticamente significativas en la determinación de  $LTB_4$ . No es significativa para el estímulo con anti IgE, y sí para el estímulo con zimosan opsonizado ( $p<0,005$ ), ionóforo de calcio ( $p<0,005$ ), y de AAS + ionóforo de calcio ( $p<0,05$ ).

En la figura 30 se exponen las diferencias obtenidas en la producción de  $LTC_4/D_4/E_4$ , siendo significativas para todos los estímulos: anti IgE ( $p<0,05$ ), zimosan opsonizado ( $p<0,005$ ), ionóforo de calcio ( $p<0,005$ ), y de AAS + ionóforo de calcio ( $p<0,005$ ).

Se muestran en la figura 31 los cálculos obtenidos para la determinación de  $PGD_2$ : no son significativos para el estímulo con

anti IgE, zimosan opsonizado, ni AAS + ionóforo, siendo significativa solamente para el estímulo con ionóforo de calcio ( $p < 0,05$ ).

En la figura 32 se exponen los resultados en la determinación de  $\text{TxB}_2$ , en el que no es significativa estadísticamente la diferencia en el estímulo con anti IgE, y sí lo son en el estímulo con zimosan opsonizado ( $p < 0,05$ ), ionóforo de calcio ( $p < 0,05$ ), y tras AAS + ionóforo de calcio ( $p < 0,05$ ).

- **Grupo D** (asma severo): en la figura 33 se representan las diferencias obtenidas tras los estímulos en la determinación de  $\text{LTB}_4$ , no siendo significativa en el estímulo con anti IgE, y sí tras zimosan opsonizado ( $p < 0,05$ ), ionóforo de calcio ( $p < 0,05$ ), y con AAS + ionóforo de calcio ( $p < 0,05$ ).

En la figura 34 vemos los resultados en la determinación de  $\text{LTC}_4/\text{D}_4/\text{E}_4$ . En este caso, sí son significativas las diferencias tras el estímulo con anti IgE ( $p < 0,05$ ), zimosan opsonizado ( $p < 0,05$ ), e ionóforo de calcio ( $p < 0,005$ ), y no lo es tras AAS + ionóforo de calcio.

En la figura 35 vemos igualmente los cálculos en la determinación de  $\text{PGD}_2$ . Las diferencias no son significativas en el estímulo con anti IgE, ni tras AAS + ionóforo, y sí lo son tras el estímulo con zimosan opsonizado ( $p < 0,05$ ), y tras ionóforo de calcio ( $p < 0,05$ ).

Y en la figura 36 se muestran los resultados en la producción de  $\text{TxB}_2$ . No son significativas tras el estímulo con anti IgE, ni tras zimosan opsonizado, ni tras AAS + ionóforo, siéndolo únicamente tras el estímulo con ionóforo de calcio ( $p < 0,05$ ).

- **Grupo E** (asma con intolerancia a AINE): se expone en la figura 37 el cálculo en la producción de  $LTB_4$ . La diferencia no es estadísticamente significativa tras el estímulo con anti IgE, y sí lo son tras el estímulo con zimosan opsonizado ( $p < 0,05$ ), ionóforo de calcio ( $p < 0,05$ ), y tras AAS + ionóforo de calcio ( $p < 0,05$ ).

En la figura 38 vemos la representación en la producción de  $LTC_4/D_4/E_4$ . No son significativas las diferencias tras el estímulo con anti IgE, ni ionóforo de calcio, y sí lo son tras estímulo con zimosan opsonizado ( $p < 0,05$ ), y tras AAS+ ionóforo de calcio ( $p < 0,05$ ).

La representación de las diferencias estadísticas en la producción de  $PGD_2$  se muestran en la figura 39. No es significativa tras el estímulo con anti IgE, y sí frente a los restantes: zimosan opsonizado ( $p < 0,05$ ), ionóforo de calcio ( $p < 0,05$ ), y AAS + ionóforo de calcio ( $p < 0,05$ ).

En el caso de la producción de  $TxB_2$ , vemos los resultados obtenidos en la figura 40. No son significativas las diferencias en el estímulo con anti IgE, ni tras AAS + ionóforo de calcio, pero sí lo son frente a zimosan opsonizado ( $p < 0,05$ ), e ionóforo de calcio ( $p < 0,005$ ).

#### 4.- COMPARACION DE LA PRODUCCION DE EICOSANOIDES TRAS EL ESTIMULO CON IONOFORO DE CALCIO Y TRAS AAS + IONOFORO DE CALCIO.

- **Grupo A:** la diferencia no es estadísticamente significativa en la producción de  $LTB_4$ ,  $LTC_4/D_4/E_4$  ni  $PGD_2$ , y sí lo es en la producción de  $TxB_2$  ( $p < 0,05$ ). (figura 41).

- **Grupo B:** la diferencia no es estadísticamente

significativa en la producción de  $LTB_4$ ,  $LTC_4/D_4/E_4$  ni  $TxB_2$ , y si lo es en la producción de  $PGD_2$  ( $p < 0,05$ ). (figura 42).

- **Grupo C:** la diferencia no es estadísticamente significativa en la producción de  $PGD_2$ , ni  $LTC_4/D_4/E_4$ , y sí lo es en la producción de  $LTB_4$  ( $p < 0,05$ ), y de  $TxB_2$  ( $p < 0,005$ ). (figura 43).

- **Grupo D:** la diferencia no es significativa en la producción de  $LTB_4$ ,  $LTC_4/D_4/E_4$ , ni  $TxB_2$ , y sí lo es en la producción de  $PGD_2$  ( $p < 0,05$ ). (figura 44).

- **Grupo E:** la diferencia no es significativa en la producción de  $LTB_4$ ,  $LTC_4/D_4/E_4$ , ni  $PGD_2$ , y si lo es en la producción de  $TxB_2$  ( $p < 0,005$ ). (figura 45).

#### 5.- COMPARACION ENTRE EL GRUPO A (CONTROLES SANOS) Y LOS RESTANTES GRUPOS.

Se muestra en la figura 46 los resultados obtenidos en la producción de  $LTB_4$ , comparando la producción basal y los distintos estímulos. Hemos de destacar que sólo se obtiene diferencias estadísticamente significativas en la **producción basal** entre el **grupo A** (sanos) y el **grupo D** (asma intrínseco severo), con  $p < 0,05$ . En las restantes comparaciones, no se producen diferencias significativas.

En la figura 47 vemos la producción de  $LTC_4/D_4/E_4$ . En este eicosanoide, se obtienen diferencias estadísticamente significativas en los siguientes caso: en la **producción basal** entre el **grupo A** (sanos) y el **B** (polínicos) con  $p < 0,05$ ; en el estímulo con **zimosan opsonizado** entre el **grupo A** y el **B**, con  $p < 0,005$ , y entre el **grupo A** y el **C** (asma moderado) con  $p < 0,05$ ;

en el estímulo con **ionóforo de calcio** también existen diferencias significativas entre el **grupo A** y el **B**, con  $p < 0,005$ , y entre el **A** y el **C**, con  $p < 0,05$ . Igualmente, con el estímulo de **AAS + ionóforo de calcio**, las diferencias son significativas entre el **grupo A** y el **B**, con  $p < 0,05$ ; y el **grupo A** y el **C**, con  $p < 0,05$ .

En la figura 48 se muestran las diferencias en la producción de **PGD<sub>2</sub>**. Es significativa la diferencia entre la producción basal del **grupo A** y el **B**, con  $p < 0,05$ ; y en el estímulo con **anti IgE** entre el **grupo A** y el **B**, con  $p < 0,05$ . No son significativas las restantes comparaciones.

Y en la figura 49 vemos las diferencias en la producción de **TxB<sub>2</sub>**. Solamente es significativa tras el estímulo con **zimosan opsonizado** entre el **grupo A** y el **grupo E** (intolerantes a AAS), con  $p < 0,05$ .

## **IX.- DISCUSSION**

1.- HALLAZGOS EN LA PRODUCCION BASAL DE EICOSANOIDES DE INDIVIDUOS SANOS.

Se debe señalar, en primer lugar, que los monocitos circulantes obtenidos en este trabajo se muestran como células capaces de producir y liberar los eicosanoides estudiados en cantidades mensurables mediante técnicas de radioinmunoensayo, con algunas excepciones, en las que las cantidades son menores que el límite inferior que puedan detectar estos métodos. Sin duda, incrementando el número de células sembradas se podrían haber obtenido cantidades mayores. Pero para ello la extracción de sangre a los pacientes habría tenido que ser mucho mayor.

Las cifras medias obtenidas en la producción basal del grupo de controles sanos son las siguientes:

LTB <sub>4</sub> .....	4,27 pg x 10 <sup>6</sup> cels x ml.
LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub> .....	22,50 pg x 10 <sup>6</sup> cels x ml.
PGD <sub>2</sub> .....	4,95 pg x 10 <sup>6</sup> cels x ml.
TxB <sub>2</sub> .....	567,66 pg x 10 <sup>6</sup> cels x ml.

Destaca la mayor producción de TxB<sub>2</sub>, metabolito del TxA<sub>2</sub>, en cantidades mucho mayores a cualquiera de los restantes, e incluso a la suma de los mismos, tanto en condiciones basales como tras cualquier estímulo empleado. Le sigue en cantidad, aunque a una gran distancia, el LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub> y en cantidades inferiores, aunque similares entre sí, la PGD<sub>2</sub> y el LTB<sub>4</sub>.

$$\text{TxB}_2 \gg \text{LTC}_4/\text{D}_4/\text{E}_4 > \text{PGD}_2 - \text{LTB}_4$$

Estos datos concuerdan en parte con los datos publicados (195) respecto a la mayor producción de TxB<sub>2</sub>, pero no en relación con los restantes metabolitos, pues aparece en éstos el LTB<sub>4</sub> en niveles superiores a los leucotrienos sulfidopéptidos.

En cuanto a las cantidades absolutas, es difícil establecer comparaciones, puesto que cada laboratorio emplea métodos y estímulos diferentes.

Es de destacar la demostración de que los monocitos humanos liberan  $\text{PGD}_2$  de forma espontánea, hecho que no he encontrado publicado en la literatura revisada. Se confirma con ello la primera premisa de este trabajo. Es lógico que así ocurra, al igual que sucede en los macrófagos peritoneales de ratón (299), y como se sospecha de los macrófagos alveolares humanos.

Volvemos a señalar que cuando se empleó anticuerpo monoclonal específico para  $\text{LTC}_4$  no se obtuvo reconocimiento del mismo en el sobrenadante de los cultivos, por lo que se puede deducir que las cantidades detectadas con el anticuerpo para  $\text{LTC}_4/\text{D}_4/\text{E}_4$  corresponden mayoritariamente a  $\text{LTD}_4/\text{E}_4$ , probablemente por metabolización del primero en los dos siguientes.

## 2.- ANALISIS DE LA RESPUESTA A ESTIMULOS EN TODOS LOS GRUPOS.

Los monocitos son capaces de responder a los estímulos específicos e inespecíficos empleados. Antes de considerar la actuación de los estímulos, se debe hacer un breve comentario sobre el utilizado con anti IgE. Ya se ha señalado anteriormente que los monocitos portan receptores para IgE de baja afinidad. Usualmente, para estudiar su acción se procede a incubar a los monocitos con IgE, específica o inespecífica, y posteriormente se añade el antígeno adecuado, o anti IgE. Aquí no se ha realizado el paso previo de incubación, pues se pretende estudiar la situación habitual en los pacientes, y se supone que estos monocitos contienen IgE unida a sus receptores, procedente de la IgE circulante, en cada caso.

Analizaremos, en primer lugar, la acción de cada uno de los estímulos en cada grupo estudiado.

En conjunto, el estímulo con anti IgE en la dilución utilizada aparece como el más pobre de todos los empleados, pues solamente induce liberación estadísticamente significativa frente a las correspondientes basales en la producción de LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub> en los grupos B, C, y D, en tanto no estimula en los sanos ni en los intolerantes a AINE.

Este hecho parece lógico en el caso de los asmáticos polínicos, pues ya se ha indicado antes que los monocitos de los atópicos contiene mayor número de receptores para IgE que los sanos (280). Pero según los resultados hallados, probablemente los asmáticos intrínsecos, moderados y severos, también tengan incrementados estos receptores.

De todas formas, este estímulo no es capaz de inducir incremento de producción de los restantes eicosanoides estudiados. No obstante, desde el punto de vista clínico, puede ser suficiente para la inducción de asma, puesto que los leucotrienos sulfidopéptidos son los mayores broncoconstrictores de todos los eicosanoides.

El zimosan opsonizado se muestra como un estímulo excelente en todos los grupos, con las siguientes excepciones: no estimula la producción de  $\text{TxB}_2$  en los sanos ni en los asmáticos severos, ni la producción de  $\text{PGD}_2$  en los asmáticos moderados. Significa que el estímulo de los receptores de  $\text{C}_3\text{b}$  del complemento es capaz de producir cantidades significativamente incrementadas en todos los grupos en la liberación de todos o algunos de los eicosanoides broncoconstrictores y del quimotáctico estudiado.

Cuando se emplea el estímulo de ionóforo de calcio, estimula la producción de todos los eicosanoides en todos los grupos, excepto la de  $\text{LTC}_4/\text{D}_4/\text{E}_4$  en los intolerantes a AAS. Esto es, cuando se emplea un estímulo inespecífico capaz de actuar sobre los canales de calcio, se incrementa la liberación de todos los eicosanoides estudiados en todos los grupos, con la excepción señalada. Parece ser el estímulo más amplio.

Si se añade ácido acetilsalicílico (inhibidor de la vía ciclooxigenasa) antes del estímulo con ionóforo de calcio, se sigue produciendo liberación significativa respecto a la basal de cada grupo, en el grupo de los sanos, en la producción de  $\text{LTB}_4$ ,  $\text{LTC}_4/\text{D}_4/\text{E}_4$  y  $\text{PGD}_2$ , pero no en la de  $\text{TxB}_2$ . Se puede interpretar como inhibición de la liberación inducida por el ionóforo de calcio.

En los asmáticos polínicos, la liberación sigue siendo significativa respecto a la basal en LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub> y PGD<sub>2</sub>, pero no en LTB<sub>4</sub> ni TxB<sub>2</sub>. Se puede interpretar, de igual forma, que se ha inhibido su liberación.

En los asmáticos moderados, no se produce diferencia significativa respecto a la basal en la liberación de PGD<sub>2</sub>, pero sigue siendo significativa en los restantes. En este grupo de enfermos, la inhibición de liberación se habría producido en PGD<sub>2</sub>.

El grupo de asmáticos severos se comporta de forma diferente. Aquí no se produce diferencia significativa respecto a la basal en la liberación de LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>, PGD<sub>2</sub> ni TxB<sub>2</sub>, y solo sigue siendo significativa la liberación de LTB<sub>4</sub>. Por lo tanto, la inhibición de la vía ciclooxigenasa en este grupo sería más amplia.

Y en los asmáticos intolerantes a AAS, solamente no se produce diferencia estadísticamente significativa respecto a la basal en la liberación de TxB<sub>2</sub>, permaneciendo inalterados los restantes eicosanoides, por lo que podría deducirse que se ha inhibido a este nivel. Pero si recordamos, el estímulo con ionóforo de calcio no inducía liberación de LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub> en este grupo, en tanto que la adición de AAS sí induce liberación del mismo ¿se ha estimulado su producción?. Analizaremos más ampliamente este estímulo con posterioridad.

En conjunto, las diferencias estadísticamente significativas halladas en cada grupo respecto a su basal y tras los diferentes estímulos parecen configurar un comportamiento peculiar en cada uno de ellos (tabla XXIV):

**Grupo A:**

- El estímulo con anti IgE no incrementa la liberación de ningún eicosanoide.
- El estímulo de los receptores para C<sub>3</sub>b induce incremento en la liberación de todos los eicosanoides, excepto TxB<sub>2</sub>.
- La apertura de los canales de calcio es capaz de inducir incremento de la liberación de todos ellos.

**Grupo B:**

- El estímulo con anti IgE induce liberación significativa de LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>.
- El estímulo de los receptores para C<sub>3</sub>b induce liberación significativa de todos los eicosanoides.
- De igual forma, la apertura de los canales de calcio es capaz de inducir incremento en la liberación de todos los eicosanoides.

**Grupo C:**

- El estímulo con anti IgE induce liberación significativa de LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>.
- El estímulo de los receptores para C<sub>3</sub>b no incrementa la producción de PGD<sub>2</sub>, pero sí de todos los restantes.
- La apertura de los canales de calcio incrementa la liberación de todos los eicosanoides.

**Grupo D:**

- En este grupo, también se induce incremento de liberación de LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub> tras estímulo con anti IgE.
- El estímulo de los receptores para C<sub>3</sub>b incrementa la producción de todos los eicosanoides, excepto de TxB<sub>2</sub>.
- La apertura de los canales de calcio induce liberación

significativa de todos los eicosanoides.

**Grupo E:**

- El estímulo con anti IgE no induce incremento en la producción de ningún eicosanoide.
- El estímulo de los receptores para  $C_3b$  incrementa la liberación de todos los eicosanoides.
- La apertura de los canales de calcio induce aumento de liberación de todos, excepto  $LTC_4/D_4/E_4$ .

Se configura así un perfil diferente de producción de eicosanoides en cada grupo.

En segundo lugar, **analizaremos la comparación de los diferentes grupos con el grupo control de individuos sanos:**

El grupo B, de pacientes con asma por sensibilización a pólenes, presenta las siguientes diferencias significativas (figura 50): en la producción basal de  $LTC_4/D_4/E_4$  y de  $PGD_2$ ; en la producción de  $PGD_2$  tras estímulo con anti IgE; en la producción de  $LTC_4/D_4/E_4$  tras estímulo con zimosán opsonizado, ionóforo de calcio y de AAS + ionóforo de calcio. Es el grupo donde se encuentran mayor número de diferencias significativas respecto al sano, especialmente en la producción de  $LTC_4/D_4/E_4$ , seguido de la producción de  $PGD_2$ . Todos los estímulos producen un eicosanoide broncoconstrictor en mayor grado que los sanos.

El grupo C, asma intrínseco moderado, presenta incremento en la producción de  $LTC_4/D_4/E_4$  tras los estímulos con zimosán opsonizado, ionóforo de calcio y de AAS + ionóforo de calcio, sin que existan diferencia entre las producciones basales ni tras la adición de anti IgE (figura 51).

El grupo D, asmáticos intrínseco severos, sólo presenta diferencia significativa en la producción basal de  $LTB_4$ , que no es directamente broncoconstrictor. No se obtienen diferencias significativas con el grupo control con los diferentes estímulos empleados (figura 52).

El grupo E, muestra la única diferencia significativa respecto al control en la producción de  $TxB_2$  tras el estímulo con zimosan opsonizado (cuya liberación no se incrementa el grupo control con este estímulo), y no en la producción basal ni con los restantes estímulos (figura 53).

Tenemos así que el grupo cuyos monocitos se muestran más "activos" es el de los pacientes polínicos, estudiados en fase libre de síntomas, seguido por el grupo de asma intrínseco moderado, en tanto que los otros dos grupos, D y E, muestran mínimas diferencias.

Se pueden interpretar estos hechos pensando que los monocitos de los asmáticos polínicos tienen mayor capacidad de respuesta que los de los otros grupos, precisamente porque han sido estudiados en fase de inactividad de la enfermedad, manteniendo intacta su capacidad de respuesta. Y el hecho de que basalmente produzcan más  $LTC_4/D_4/E_4$  y  $PGD_2$  (potentes broncoconstrictores), como que estas células están permanentemente "activadas", siendo capaces de incrementar aún más la producción de eicosanoides con los distintos estímulos.

Sigue en orden de capacidad de respuesta el grupo de asma intrínseco moderado. En este caso, el hecho de no encontrar diferencias en la producción basal de eicosanoides probablemente indique que los monocitos no están "activados" de forma basal,

aunque si son capaces de responder significativamente al estímulo de los receptores para  $C_{3b}$  y a la apertura de los canales de calcio, en mayor cantidad que los de los sanos, y precisamente liberando el eicosanoide con mayor capacidad broncoconstrictora.

Se producen aquí dos diferencias respecto al comportamiento de los asmáticos extrínsecos: la "activación" basal y la respuesta frente a anti IgE de los extrínsecos, frente a la inactividad en este sentido de los intrínsecos. Aunque antes se ha visto, al analizar los grupos separadamente, que los intrínsecos eran capaces de liberar  $LTC_4/D_4/E_4$  cuando eran estimulados con anti IgE, sin embargo esta liberación no es significativa, en el grado que lo es la de los asmáticos extrínsecos.

Y en cuanto a la "no activación " basal de los monocitos, quizás puede influir la medicación a que estaban sometidos, fundamentalmente la acción de la teofilina retardada oral, pues la inhalación de broncodilatadores  $\beta_2$  y de corticoides apenas si produce niveles circulantes de estos fármacos. Esta es una posibilidad teórica, puesto que no se ha encontrado nada descrito a este respecto.

El grupo de asma intrínseco severo apenas muestra diferencia significativa respecto al sano, tan sólo en la producción basal de  $LTB_4$ . Esta producción basal incrementada puede significar la capacidad del leucotrieno quimiotáctico para atraer a otras células que participan en el asma, como son neutrófilos y eosinófilos. Y en este caso, si puede explicarse la no diferencia en la respuesta a los estímulos por la acción de la medicación, corticoides orales, pues aunque se hizo la extracción de sangre

para el estudio 24 horas después de la última dosis, es posible que la acción de este fármaco perdure en los monocitos. O bien, que realmente no posean la capacidad incrementada de respuesta de los grupos anteriores.

Igual ocurre en el caso del asma con intolerancia a AINE. Sólo existe diferencia en la producción de  $\text{TxB}_2$  tras estímulo con zimosán opsonizado. En este caso, la acción de la medicación es menos explicativa, puesto que los pacientes incluidos no estaban sometidos al mismo tratamiento, e incluso solo tomaban corticoides orales dos de ellos.

Otra posibilidad teórica para explicar estas diferencias con el grupo control podría ser que los monocitos circulantes tuviesen mayor o menor participación en la patogenia del asma, dependiendo de la etiología del mismo. Puede pensarse que tienen una participación activa, de "primera línea" en el asma extrínseco fundamentalmente, y en menor medida, en el asma intrínseco moderado, del que desconocemos su etiología.

En el asma intrínseco severo no parece actuar como célula de activación primaria sino solamente por su capacidad incrementada basal para liberar  $\text{LTB}_4$ . Este eicosanoide, capaz de atraer otras células como neutrófilos y eosinófilos al lugar de la reacción, podría estar amplificando una respuesta, actualmente desconocida.

Y de forma similar ocurriría en los asmáticos intolerantes a AAS. Solamente se diferencia del grupo basal en la liberación de  $\text{TxB}_2$ , por estímulo de los receptores para  $\text{C}_{3b}$ . El  $\text{TxB}_2$  tiene capacidad broncoconstrictora, entre otros.

Todos estos resultados nos llevan a pensar que existen

grupos patogénicos definidos dentro del asma, no sólo el extrínseco e intrínseco, sino dentro de este último. El perfil de liberación de los mediadores estudiados frente a los diferentes estímulos, y su comportamiento diferente respecto a los sanos así parece indicarlo. ¿Son etiológicamente diferentes los tres grupos de asma intrínseco?. Es muy probable que sea así. Desde el punto de vista clínico, vemos con frecuencia pacientes afectos de asma intrínseco con mala evolución desde el principio de la enfermedad, sin que influya el tratamiento correctamente aplicado desde el comienzo, en tanto que otros casos son asma moderados a lo largo de toda la vida.

Siempre dentro del campo de las posibilidades teóricas, es muy probable que en cada tipo de asma actúe en mayor o menor medida uno o varios de los numerosos mediadores implicados en la patogenia del asma. Y/o que en cada tipo de asma actúe como célula primordial desencadenante una o varias de las implicadas, siendo amplificada su acción por las restantes. Y así, se puede pensar que en el asma extrínseco el monocito actúa como célula de implicación primaria; y en el asma intrínseco (como grupo global), como una célula amplificadora de respuesta. Y dentro del último grupo, parece que la amplificación es más acusada en el asma moderado que en los otros dos grupos en los que los hemos subdividido. Según esta idea, para poder llegar a conocer bien estas posibilidades, los estudios habrán de hacerse en grupos perfectamente definidos en cuanto a su etiología, si se conoce, su evolución y el tratamiento al que están sometidos.

Según Schleimer (328), presumiblemente muchos de los monocitos que migran a los tejidos se diferencian en macrófagos

tisulares. Esta aseveración, además de las razones de similitud entre monocitos periféricos y macrófagos alveolares apuntadas antes (317, 320), inducen a pensar que los resultados obtenidos en este trabajo podrían aplicarse a los macrófagos alveolares.

### 3.- COMPARACION CON LOS DATOS DE LA LITERATURA.

Aunque la metodología de este trabajo y los estímulos empleados difiere de la de los trabajos publicados revisados, se puede establecer una comparación. Se debe señalar que no se han encontrado trabajos que utilicen estímulos con ionóforo de calcio ni zimosán opsonizado en asmáticos.

Estimulando monocitos humanos de individuos normales con agregados de IgE - anti IgE (302), se ha detectado la producción de pequeñas cantidades de LTC<sub>4</sub> y PGE<sub>2</sub>. En nuestro caso no ocurre así, pero hemos de tener en cuenta que, como se señaló antes, no se ha procedido a "enriquecer" la cantidad de IgE que pueda ir unida a estas células de modo natural en nuestros individuos sanos.

Igual sucede si lo comparamos con el estudio de Füller y cols (303), realizado con macrófagos alveolares obtenidos en diversas enfermedades no atópicas, que tras el estímulo de IgE - anti IgE liberan LTB<sub>4</sub>, PGF<sub>2α</sub> y TxB<sub>2</sub>. Si consideramos los grupos de asma intrínseco estudiados aquí como enfermedad no atópica, vemos que en los grupos C y D, al estimularlos con anti IgE, se produce un incremento en la liberación de LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>, aunque no es significativa al compararlo con el grupo control. No coinciden, pues, los eicosanoides liberados, pero de nuevo resaltamos que el estímulo empleado por Füller no es igual al nuestro.

Recordemos los hallazgos publicados en estudio de exudado nasal y líquido de LBA.

Se ha demostrado que en el exudado de la rinitis por sensibilización a pólenes se produce un incremento de la cantidad de LTC<sub>4</sub> tras la provocación con el antígeno (249), y que en la

secreción nasofaríngea de niños polínicos también se encuentra LTC<sub>4</sub> durante la estación de polinización (251). En el líquido de LBA de pacientes con asma alérgico, tras la provocación inhalativa, se ha encontrado aumento de PGD<sub>2</sub> a los 9 minutos de la misma (254), y en otro trabajo (255), de LTB<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y E<sub>4</sub>, sin que se detectara LTC<sub>4</sub>, incremento que no se producía en los controles sanos. Wenzel y cols (257), encontraron, a los 5 minutos de la provocación inhalativa en el asma extrínseco, incremento de PGD<sub>2</sub> y de TxS, hecho que no se produce en el asma intrínseco. Y tras la instilación local del alérgeno, se ha encontrado aumento de PGD<sub>2</sub> (311).

En este trabajo se encuentra que los monocitos de los asmáticos polínicos producen un incremento significativo respecto a su basal en la producción de LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub> tras estímulo con anti IgE, aunque al compararlo con el grupo control la diferencia no es significativa. Pero sí lo es la producción de PGD<sub>2</sub> tras el mismo estímulo. Se puede pensar por ello, que los eicosanoides encontrados in vivo tras la provocación inhalativa están producidos, al menos parcialmente, por los macrófagos alveolares.

#### 4.- ACTUACION DEL ACIDO ACETIL SALICILICO EN LA LIBERACION DE EICOSANOIDES.

Es sobradamente conocida la acción del AAS y otros AINE como inhibidor de la vía ciclooxigenasa. Sin embargo, en este estudio, su actuación sobre los monocitos aparece diferente, en cada grupo estudiado.

En el grupo de los **controles sanos**, la adición de AAS antes del estímulo con ionóforo de calcio sigue produciendo liberación significativa respecto a su basal en la liberación de  $LTB_4$ ,  $LTC_4/D_4/E_4$ , y  $PGD_2$ , pero no en la de  $TxB_2$ . Si se comparan las liberaciones producidas por ionóforo de calcio y AAS+ionóforo de calcio entre sí estadísticamente, sólo se obtiene significación en la producción de  $TxB_2$ , con  $p < 0,05$ . Se puede interpretar que en este grupo, el AAS ha inhibido la formación de este eicosanode, exclusivamente.

En el grupo de los **asmáticos extrínsecos por sensibilización a pólenes**, al comparar la liberación con su basal, sigue siendo significativa en  $LTC_4/D_4/E_4$  y  $PGD_2$ , pero no en la de  $LTB_4$  ni  $TxB_2$ . Pero al comparar entre sí la liberación inducida por ionóforo de calcio y de AAS + ionóforo de calcio, sólo se obtiene diferencia estadísticamente significativa en la producción de  $PGD_2$  ( $p < 0,05$ ). Así pues, en este grupo el ác. acetilsalicílico ha actuado inhibiendo la formación de la prostaglandina.

Al tomar el grupo de los **asmáticos intrínsecos moderados**, no se produce diferencia significativa respecto a su basal en la liberación de  $PGD_2$ , pero sigue siendo significativa en los restantes. Y al comparar ambos estímulos entre sí, se obtienen diferencias significativas en la liberación de  $LTB_4$  ( $p < 0,05$ ) y de

**TxB<sub>2</sub>** (p<0,005). En este grupo se inhibe la producción de tromboxano, como ocurre en los controles sanos, pero también parece inhibirse la del leucotrieno B<sub>4</sub>, aunque sabemos que los AINE no actúan a nivel de la vía lipooxigenasa.

En el grupo de **asma intrínseco severo** no se produce diferencia significativa respecto a su basal en la liberación de LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>, PGD<sub>2</sub>, ni TxB<sub>2</sub>, y sólo sigue siendo significativa la liberación de LTB<sub>4</sub>. Comparando los dos estímulos entre sí, la diferencia significativa se produce únicamente a nivel de PGD<sub>2</sub> (p<0,05) y no en las restantes, como ocurre en el grupo de asma extrínseco. Aquí también la aspirina actúa inhibiendo la liberación de la prostaglandina estudiada.

Y en el grupo de **asma intrínseco con intolerancia a AINE**, no se produce liberación significativa respecto a su basal en al TxB<sub>2</sub>, permaneciendo significativa la liberación de los restantes eicosanoides. Si recordamos datos anteriores, el estímulo con ionóforo de calcio no induce liberación significativa respecto a su basal de LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub> en este grupo, en tanto sí es significativa si previamente se adiciona AAS. Podría parecer que el ác. acetilsalicílico potencie la liberación de este mediador en este grupo. No obstante, al comparar estadísticamente entre sí la liberación inducida por ambos estímulos, sólo se obtiene significación en la producción de TxB<sub>2</sub>, a semejanza de lo que sucede en el grupo control. Y en este sentido, el grupo de los intolerantes a AINE es el único que se comporta exactamente igual al de los controles sanos.

Tenemos así (tabla XXV) que el ác. acetilsalicílico actúa en todos los grupos a nivel de los metabolitos de la vía

ciclooxigenasa, en unos inhibiendo la producción de  $\text{TxB}_2$  (controles sanos, asma intrínseco moderado y asma intrínseco con intolerancia a AINE), y en los otros dos, inhibiendo la producción de  $\text{PGD}_2$  (asmáticos polínicos y pacientes con asma intrínseco severo). En este último grupo se ha de tener en cuenta la posibilidad de que la medicación con corticoides orales pueda haber influido en alguna forma, como se comentaba antes al comparar la producción de eicosanoides con el grupo control.

Se perfilan dos posibles acciones del AAS en la inhibición que induce sobre la vía ciclooxigenasa, que varían según el grupo de pacientes estudiados. Y aparece también una posible acción sobre la liberación de  $\text{LTB}_4$  en el grupo de asma intrínseco moderado.

Lo más destacable del estudio empleando ác. acetilsalicílico es que no se objetivan diferencias en el comportamiento de los monocitos de los pacientes intolerantes a AINE. No parece que exista ningún defecto metabólico en este sentido, al menos en estas células.

Cuando en un trabajo parecido se han empleado basófilos como célula de estudio, Goetzl y cols. (267) encontraron que la aspirina produce una supresión mayor en la generación de  $\text{PGE}_2$  en los asmáticos intolerantes, mientras que la generación de  $\text{LTD}_4$  se inhibe discretamente en los sanos y en los asmáticos extrínsecos, y prácticamente no se inhibe en los asmáticos intolerantes. Señalan estos autores que la patogenia de la crisis de asma inducida por AINE podría estar causada por una combinación de mayor inhibición de la producción de  $\text{PGE}_2$ , y no inhibición de  $\text{LTD}_4$ , de forma que no se compensara la acción broncoconstrictora del leucotrieno con la broncodilatadora de la prostaglandina.

Pero sabemos que la acción broncoconstrictora de los leucotrienos es muy superior a la broncodilatadora de la  $PGE_2$ , por lo que una pequeña diferencia en la producción de esta última no parece que pueda ser determinante. Y en cuanto a los restantes grupos, se tendría que objetivar una clara mejoría clínica de los asmáticos extrínsecos cuando ingieren AAS, que habitualmente no sucede. El grupo de asmáticos que mejoran con aspirina es muy reducido y generalmente intrínseco.

Otro punto a dilucidar es la inhibición producida sobre el  $LTB_4$  por la aspirina en nuestro grupo de asma intrínseco moderado, así como la objetivada por Goetzl y cols (267) sobre el  $LTD_4$  en su grupo de controles sanos y asma extrínseco. La explicación posible de esta inhibición se puede buscar en la acción de  $PGE_2$  y  $PGI_2$ , que, según Kuehl (271) pueden inhibir in vitro las etapas iniciales de la formación de leucotrienos. Estas dos prostaglandinas no han sido determinadas en nuestro trabajo, por lo que no se puede comprobar si sucede así. Pero para que ocurriese esto, el AAS tendría que haber incrementado uno o los dos prostanoides, en lugar de inhibir su formación, y a su vez, la  $PGE_2$  o la  $PGI_2$  incrementadas habrían inhibido la formación de leucotrienos. Sin embargo, en el trabajo de Goetzl se encuentra disminución de  $PGE_2$ , sobre todo en los intolerantes, en tanto que la inhibición de  $LTD_4$  se produce de forma discreta en los tolerantes. Por lo tanto, es posible que exista otra vía mediante la cual el AAS puede inhibir la formación de algunos leucotrienos en algunos casos.

Sería lógico pensar que, según la teoría patogénica ampliamente aceptada, en los asmáticos intolerantes a AINE la

inhibición a algún nivel de la vía ciclooxigenasa potenciara la producción de LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>, que no se demuestra utilizando basófilos ni monocitos.

Estos hallazgos no invalidan, sin embargo, esta teoría, puesto que en ambos trabajos se han utilizado células circulantes y no las equivalentes residentes en pulmón, aunque, como se ha señalado antes, la similitud entre monocitos y macrófagos alveolares es muy estrecha.

También puede suceder que el defecto, si existe, se localice en otras de las múltiples células intervinientes en la patogenia del asma, como puede deducirse del trabajo de Christie y cols. (276), que encuentran mayor concentración basal de LTE<sub>4</sub> en orina de asmáticos intolerantes, incrementada tras la provocación con AAS. Y del estudio publicado por Ferreri y cols. (274) en exudado nasal, en el que tras la provocación con aspirina se produce incremento de LTC<sub>4</sub> solamente en los pacientes que padecen rinitis y asma con intolerancia a AINE, y no en los restantes grupos estudiados.

O bien, que en estos pacientes el defecto resida en los receptores de los mediadores, como insinúan los trabajos de Arni y cols. (275), aunque no se explica de qué forma los AINE pueden actuar sobre los receptores.

En resumen, estamos ante una serie de hechos discordantes : in vivo, se demuestran incrementos de LTE<sub>4</sub> en orina, y de LTC<sub>4</sub> en exudado nasal tras la provocación con aspirina; in vitro, no se encuentran alteraciones significativas en las células estudiadas ; los trabajos de Nizankowska y cols. (273) in vivo utilizando inhibidores de leucotrienos a distintos niveles no demuestran que

se produzca protección tras la provocación con aspirina. Por lo tanto, permanece aún en la incógnita la forma en que los AINE inducen crisis asmáticas en un grupo de pacientes con asma intrínseco.

## **X. - CONCLUSIONES**

1º.- La técnica seguida para el aislamiento de monocitos periféricos y su respuesta frente a diversos estímulos liberando eicosanoides muestra que es una metodología válida para el estudio de estas células en el hombre.

2º.- Se demuestra producción y liberación de  $PGD_2$  por los monocitos periféricos humanos, tanto en individuos sanos como en pacientes afectos de asma bronquial. No se ha hallado descripción similar en la literatura revisada.

3º.- El rango de liberación de eicosanoides estudiados, tanto en individuos sanos como todos los grupos de pacientes es :



4º.- No se ha detectado  $LTC_4$  aislado, por lo que se estima que son los  $LTD_4 / LTE_4$  los que constituyen la porción mayoritaria de los leucotrienos sulfidopéptidos encontrados, probablemente por metabolización del primero a los segundos.

5º.- El estímulo con anti IgE es el más pobre de los empleados en todos los grupos, siendo el estímulo con ionóforo de calcio A 23187 el más potente, seguido del estímulo con zimosán opsonizado.

6º.- Existe diferencia en la producción basal de eicosanoides respecto al grupo control de individuos sanos solamente en el grupo de pacientes con asma por sensibilización a pólenes (mayor producción de  $PGD_2$  y de  $LTC_4 / LTD_4 / LTE_4$ ), y en el grupo de

pacientes con asma intrínseco severo (mayor producción de  $LTB_4$ ). En el primer caso, puede concluirse que los monocitos de los pacientes con asma extrínseco están permanentemente "activados", produciendo mayor cantidad de estos mediadores broncoconstrictores de forma basal. En el segundo caso, se puede interpretar que los monocitos de pacientes con asma intrínseco severo tienen mayor capacidad basal para producir y liberar el leucotrieno quimiotáctico para eosinófilos y neutrófilos.

7º.- Se encuentran diferentes perfiles de incremento de producción de los distintos eicosanoides respecto a la basal de cada grupo, siendo el grupo de asmáticos por sensibilización a pólenes el que presenta mayor número de diferencias significativas. Se debe resaltar que existe una mayor producción de  $LTC_4/LTD_4/LTE_4$  respecto a su basal tras el estímulo con anti IgE en el grupo de asma extrínseco y en los grupos de asma intrínseco moderado y severo, pero no en los individuos sanos ni en los asmáticos intolerantes a AINE.

8º.- Al comparar la liberación de eicosanoides tras los estímulos en los distintos grupos de enfermos con el grupo de individuos sanos se encuentran nuevamente diferencias en el comportamiento de cada uno de ellos, siendo el grupo de asma por sensibilización a pólenes el que muestra mayor número de las mismas, en la producción de  $PGD_2$  y de  $LTC_4/LTD_4/LTE_4$ . Le sigue en número de diferencias significativas el asma intrínseco moderado (en liberación de  $LTC_4/LTD_4/LTE_4$ ), y a continuación, el asma intrínseco con intolerancia a AINE (en la producción de  $TxB_2$ ). El

asma intrínseco severo no muestra diferencia significativa respecto al control en la liberación de ningún eicosanoide tras los estímulos, aunque cabe pensar que los resultados puedan estar influenciados por el tratamiento con corticoides sistémicos.

9º.- Basándose en todos los datos anteriores, se sostiene la teoría de que la fisiopatología del asma puede ser diferente en cada uno de los grupos estudiados: en el asma extrínseco, los monocitos (o sus equivalentes, los macrófagos alveolares) actuarían como célula de "primera línea", al estar permanentemente "activados" para la producción de eicosanoides broncoconstrictores, en tanto que no ocurre así en los asmáticos intrínsecos. Solamente en el subgrupo de asmáticos intrínsecos severos se puede considerar que existe alguna forma de "activación" respecto a la producción del eicosanoide quimiotáctico.

10º.-El comportamiento de los monocitos en la liberación de eicosanoides cuando se inhibe la vía ciclooxygenasa mediante ác. acetilsalicílico muestra también diferencias en cada grupo. Solamente el grupo de los asmáticos intolerantes a AINE se comporta igual que el grupo de individuos sanos, inhibiéndose la formación de  $\text{TxB}_2$ . El grupo de asma extrínseco se comporta igual que el asma intrínseco severo, inhibiéndose la liberación de  $\text{PGD}_2$ . El grupo de asma intrínseco moderado se comporta igual que los sanos en cuanto a que se inhibe la liberación de  $\text{TxB}_2$ , pero además, muestra inhibición en la liberación de  $\text{LTB}_4$ .

11º.-Como consecuencia del punto anterior, se debe señalar que no se detecta ninguna anomalía en los monocitos de pacientes con asma e intolerancia a AINE cuando se inhibe la vía metabólica de la ciclooxigenasa mediante aspirina.

XI.- FIGURAS

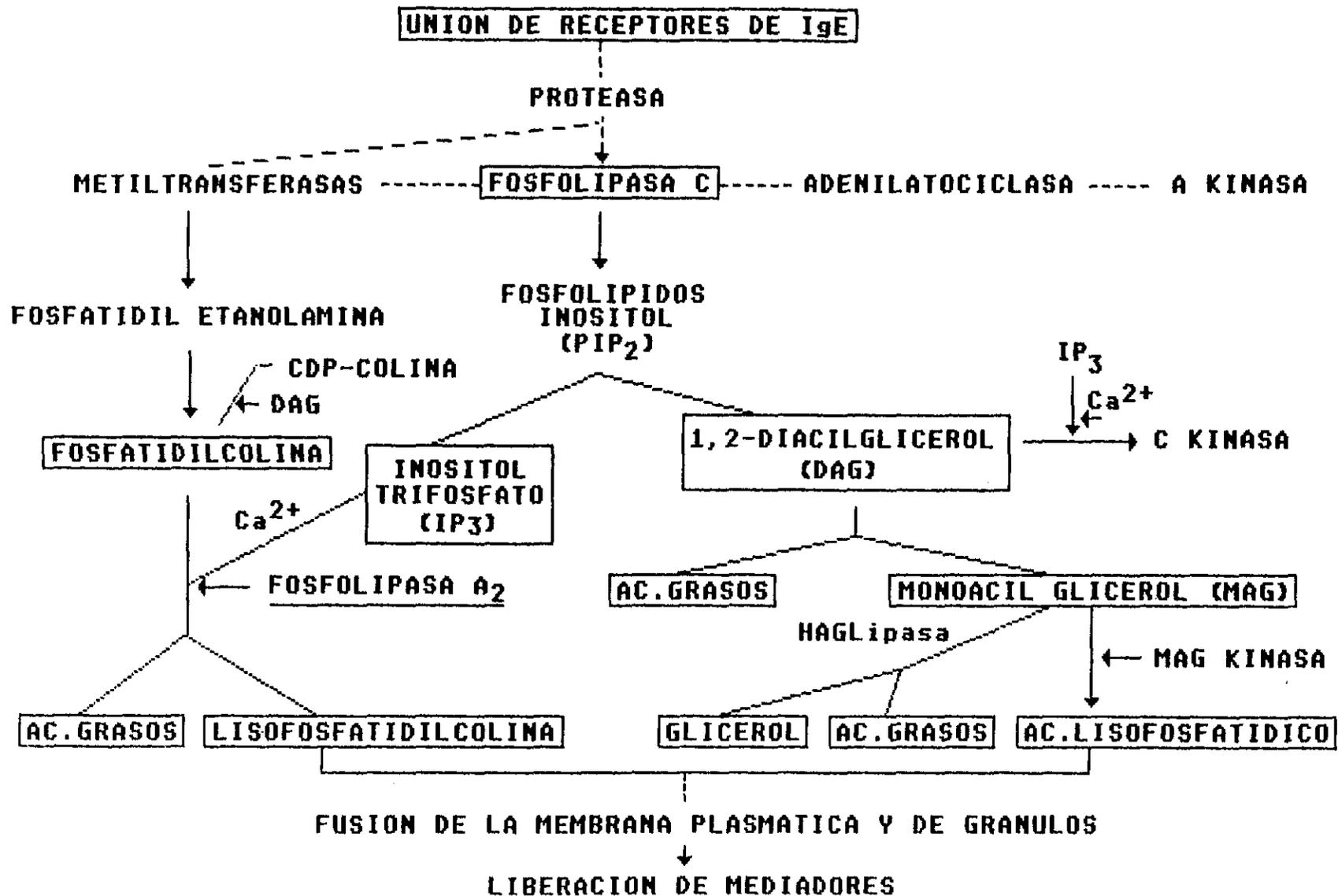


FIG.1.- ESQUEMA DEL PROCESO DE MEMBRANA PARA LA LIBERACION DE MEDIADORES QUIMICOS

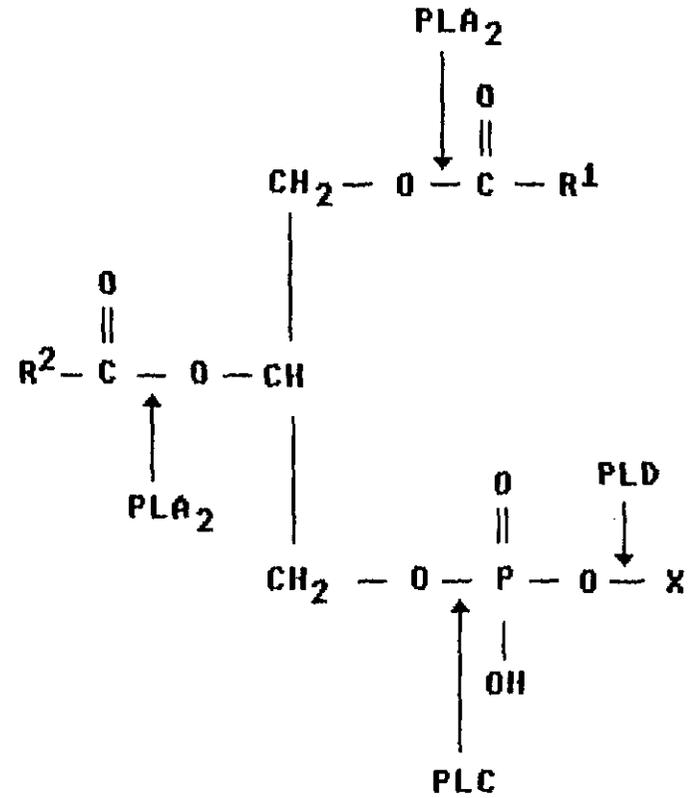


FIG.2.- REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LOS FOSFOLIPIDOS.  
 R1 Y R2= GRUPOS ACILGRASOS  
 X= BASE (COLINA, ETANOLAMINA, SERINA, INOSITOL)  
 PL= FOSFOLIPASAS

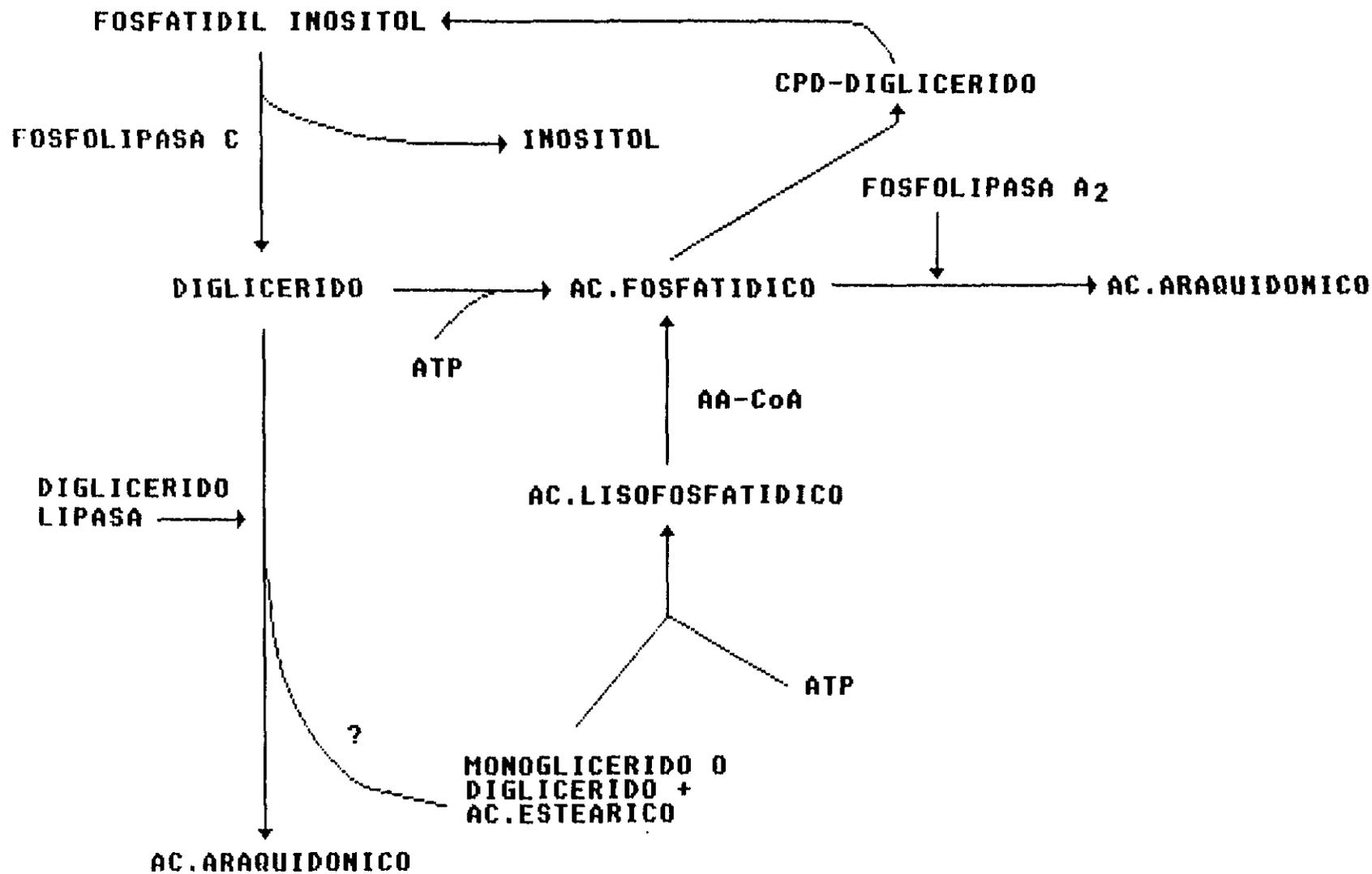


FIG.3.- VIA DE GENERACION DEL AC.ARAQUIDONICO A PARTIR DE FOSFATIDILINOSITOL

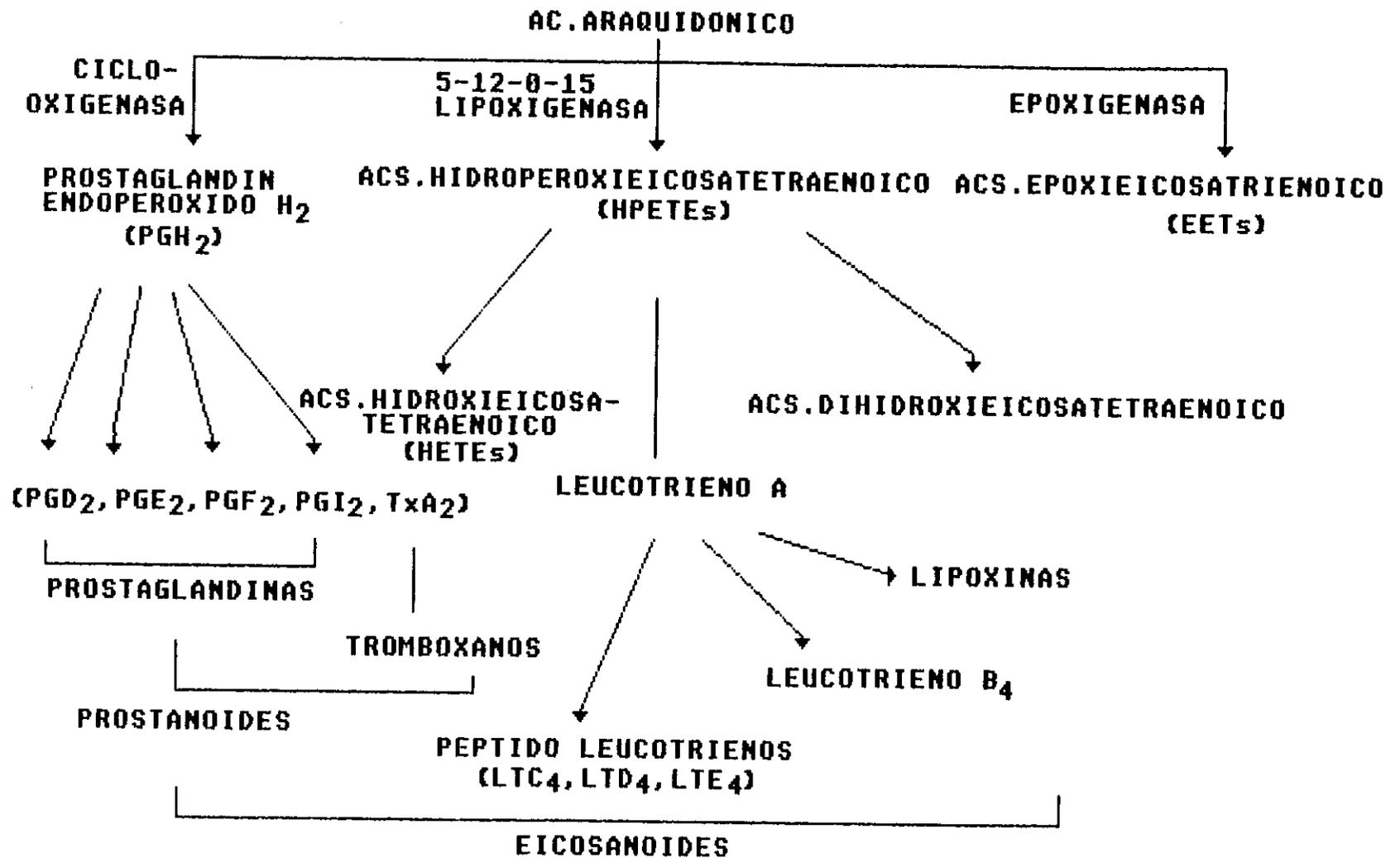


FIG.4.- RESUMEN DE LAS VIAS METABOLICAS DEL AC. ARAQUIDONICO

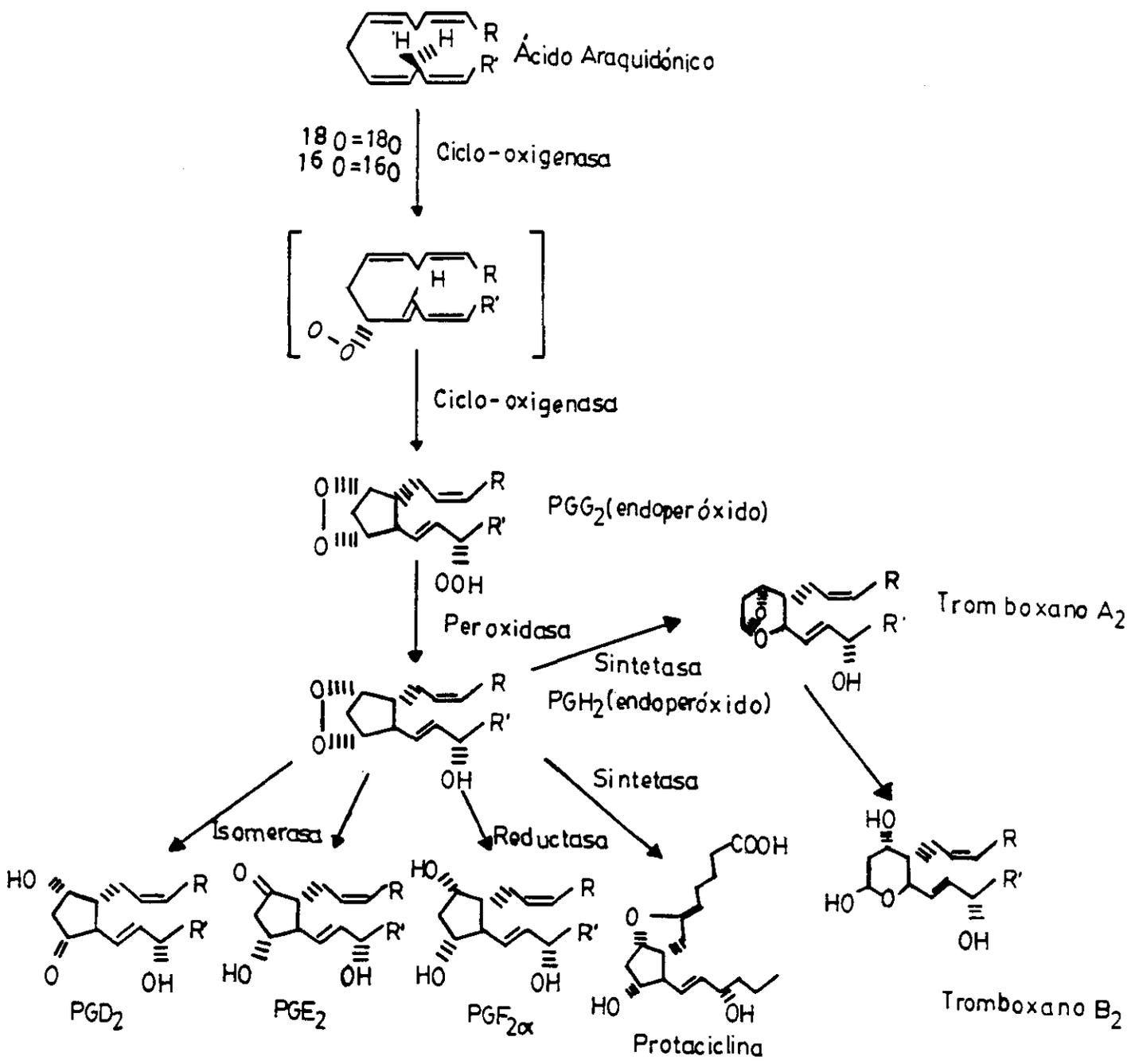


FIG. Nº 5 MECANISMO DE BIOSÍNTESIS DE PROSTAGLANDINAS Y TROMBOXANOS.

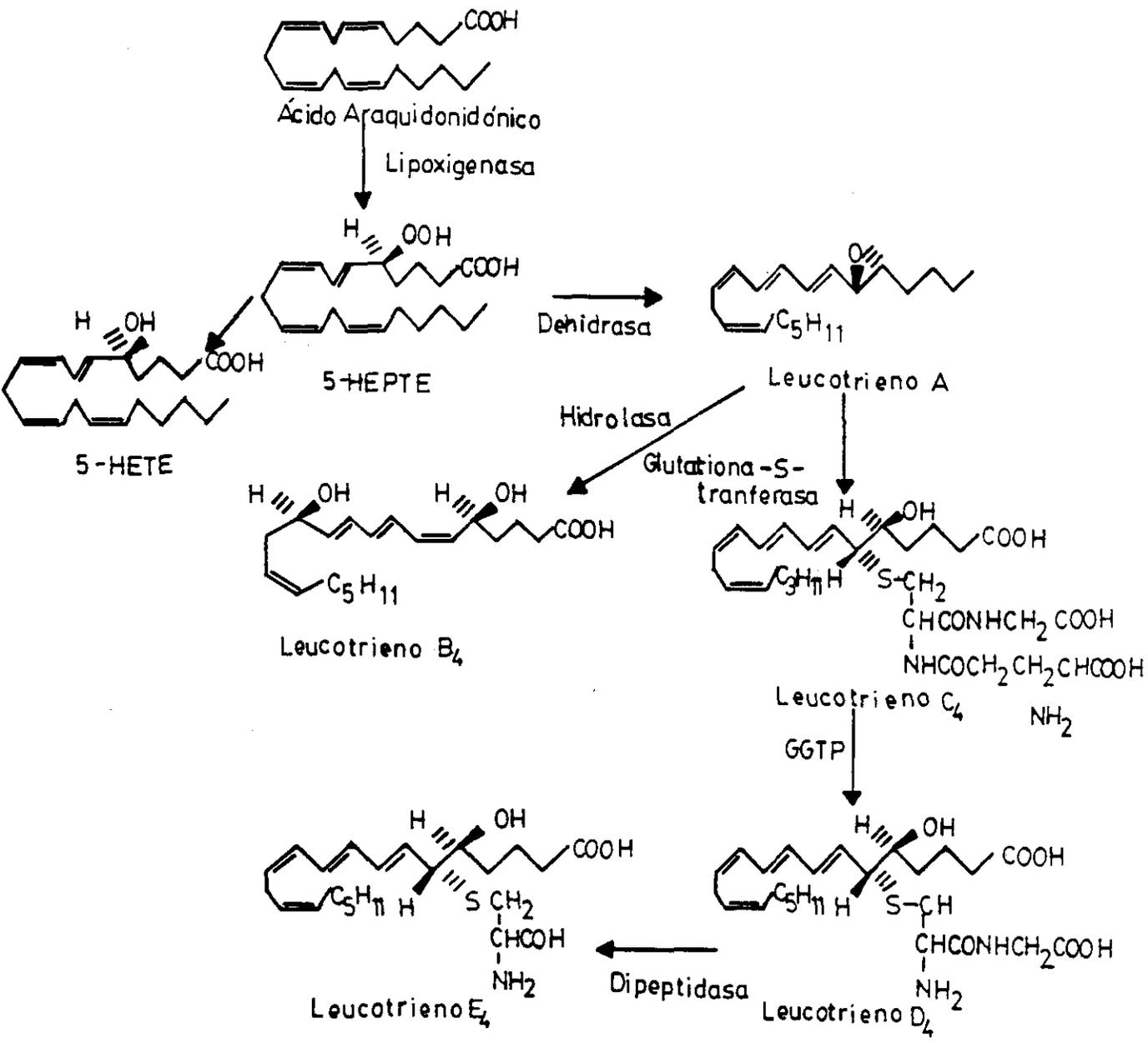


FIG. N° 6 . FORMACIÓN DE LEUCOTRIENOS.

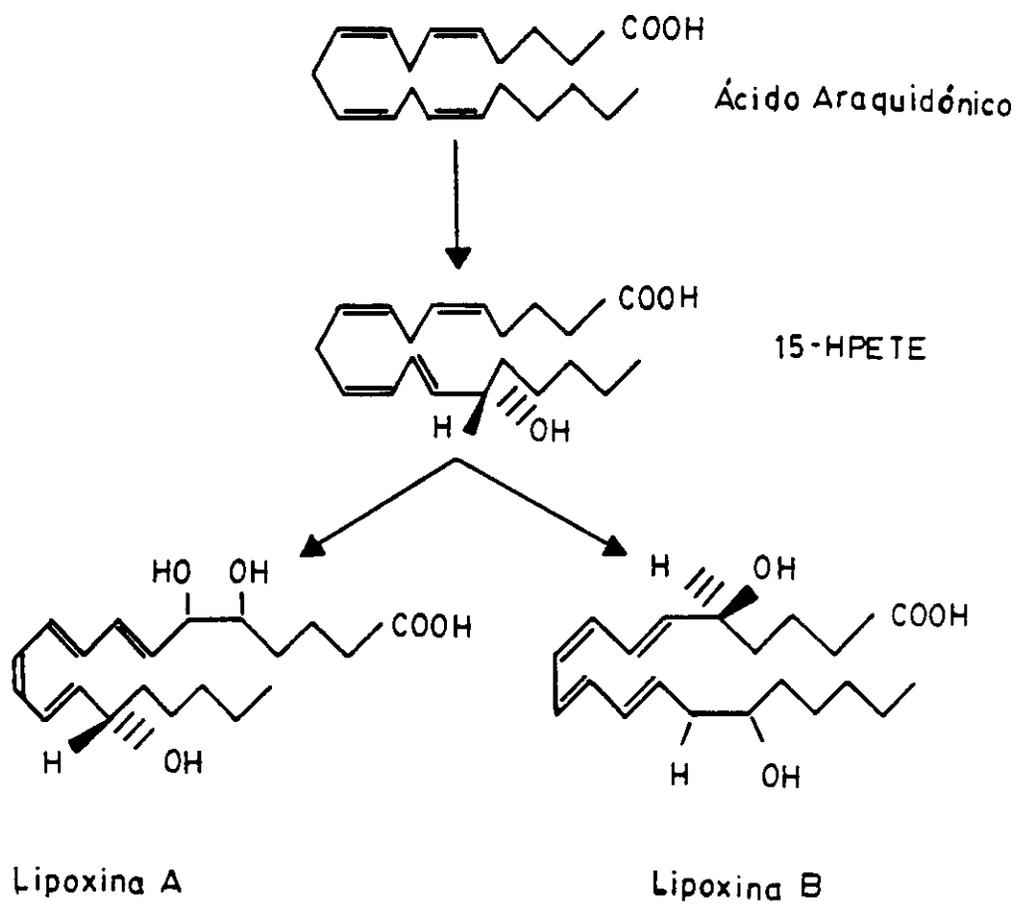


FIG. Nº 7 FORMACIÓN DE LIPOXINAS.

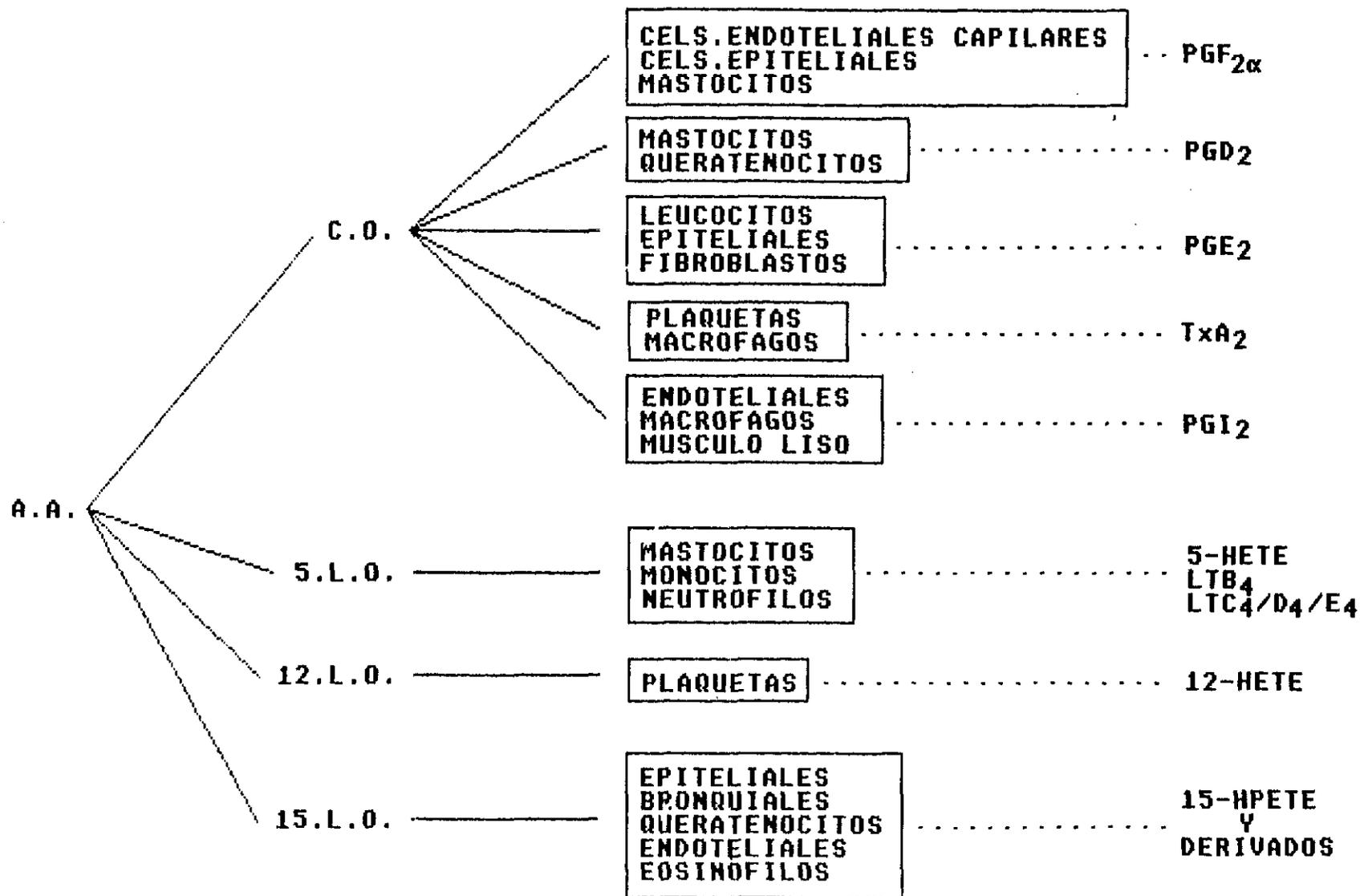


FIG.8.- PRODUCCION DE EICOSANOIDES POR LAS DISTINTAS CELULAS

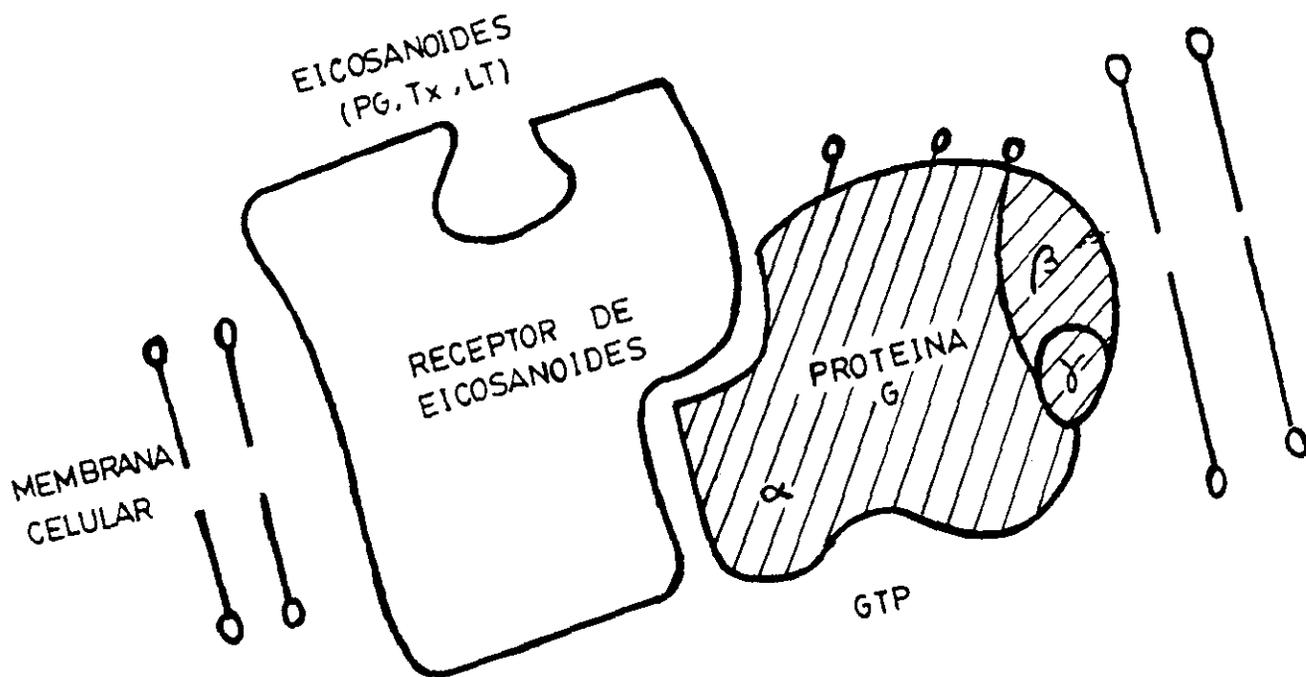


FIG. Nº9 . MODELO TEÓRICO DE RECEPTOR DE EICOSANOIDES

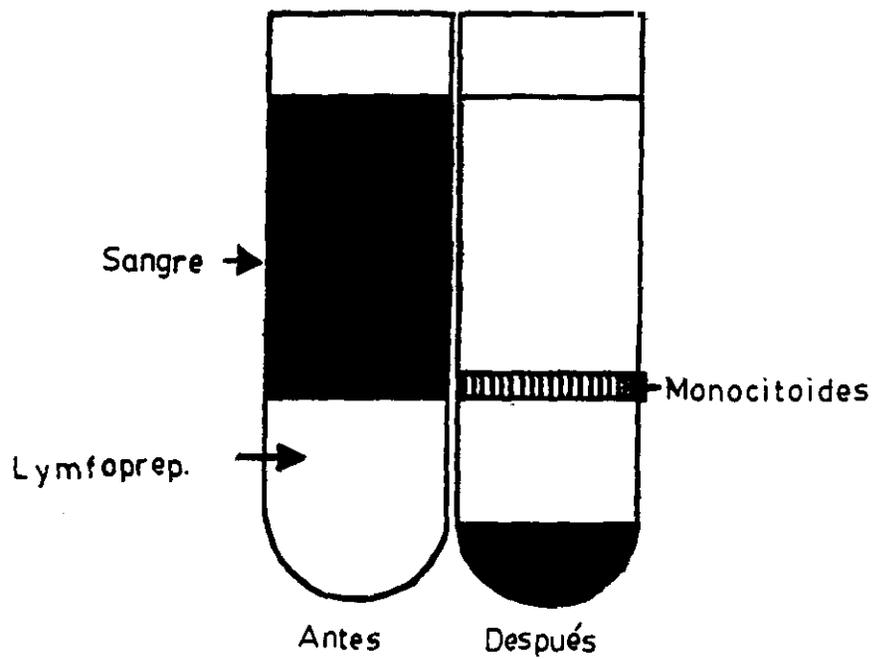


FIG. N°10 . ANTES Y DESPUÉS DE LA CENTRIFUGACION.

PRODUCCION DE  $\text{LTB}_4$  EN RELACION CON EL NÚMERO DE CÉLULAS  
TRAS ESTÍMULO CON IONÓFONO A-23187

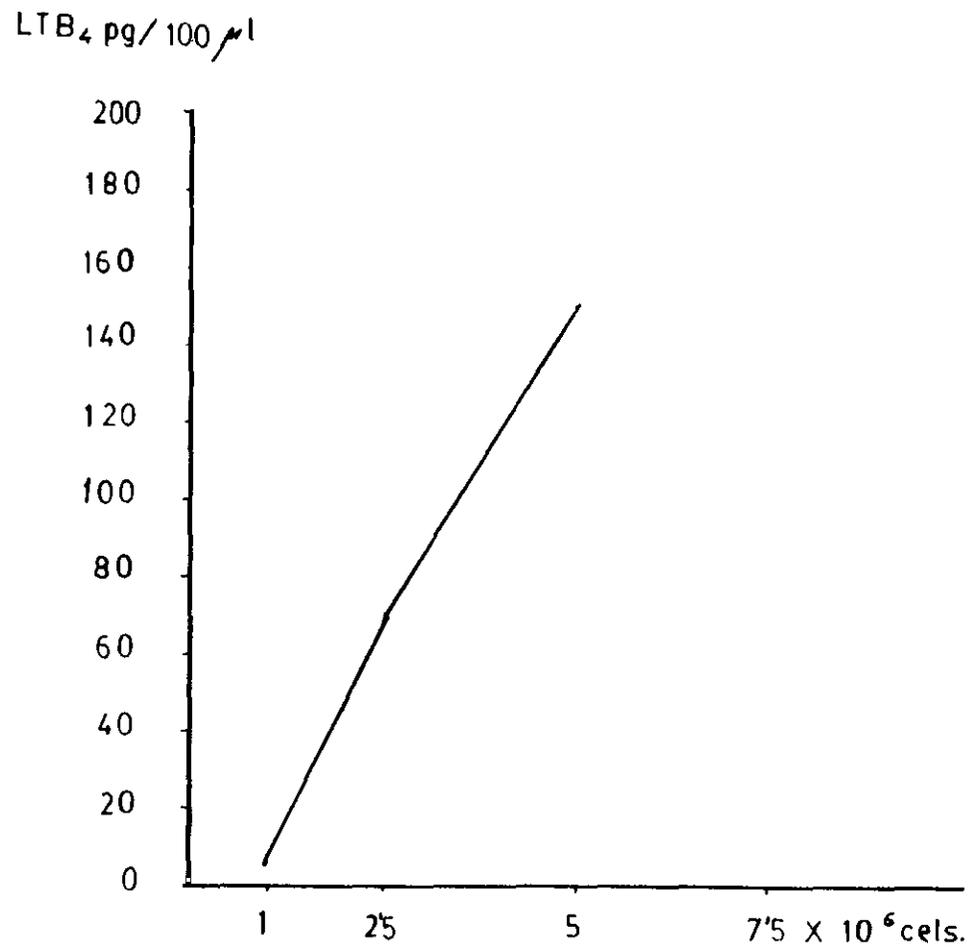


FIG. 1 1

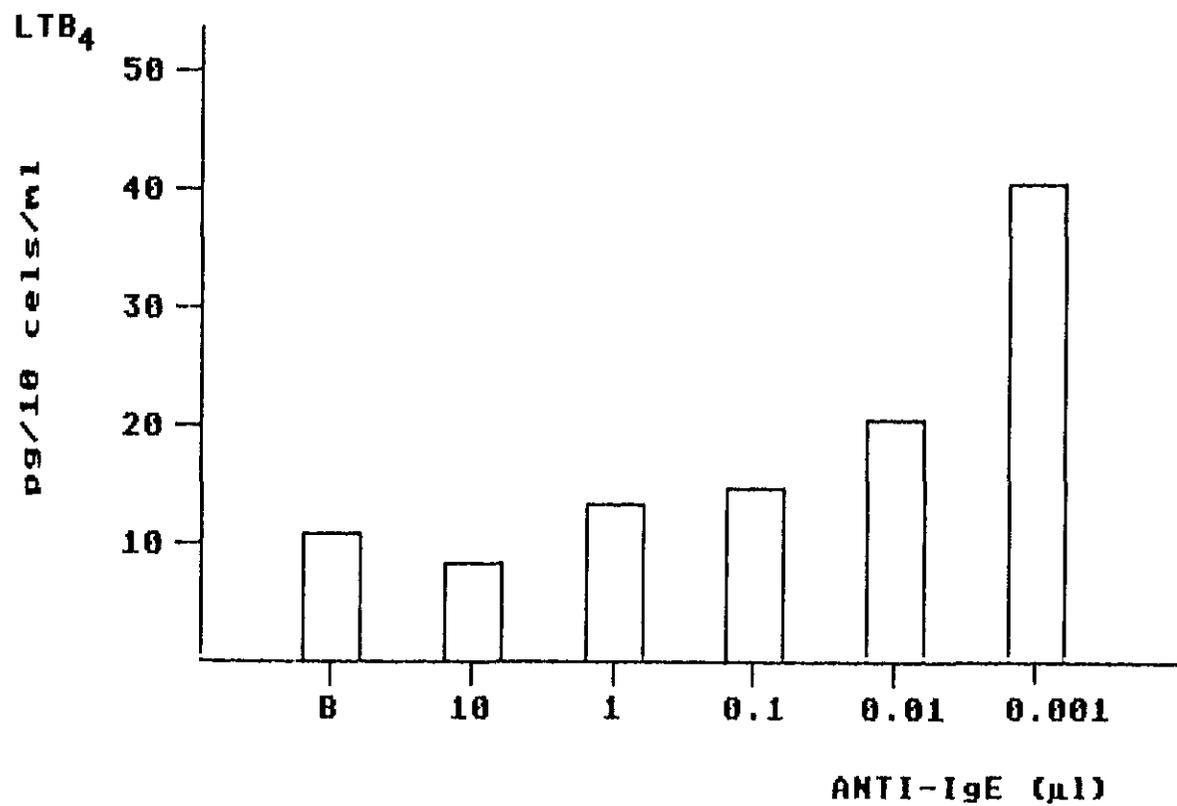


FIG.12.- ESTIMULO DILUCIONES ANTI-IgE EN LA PRODUCCION DE LTB<sub>4</sub>

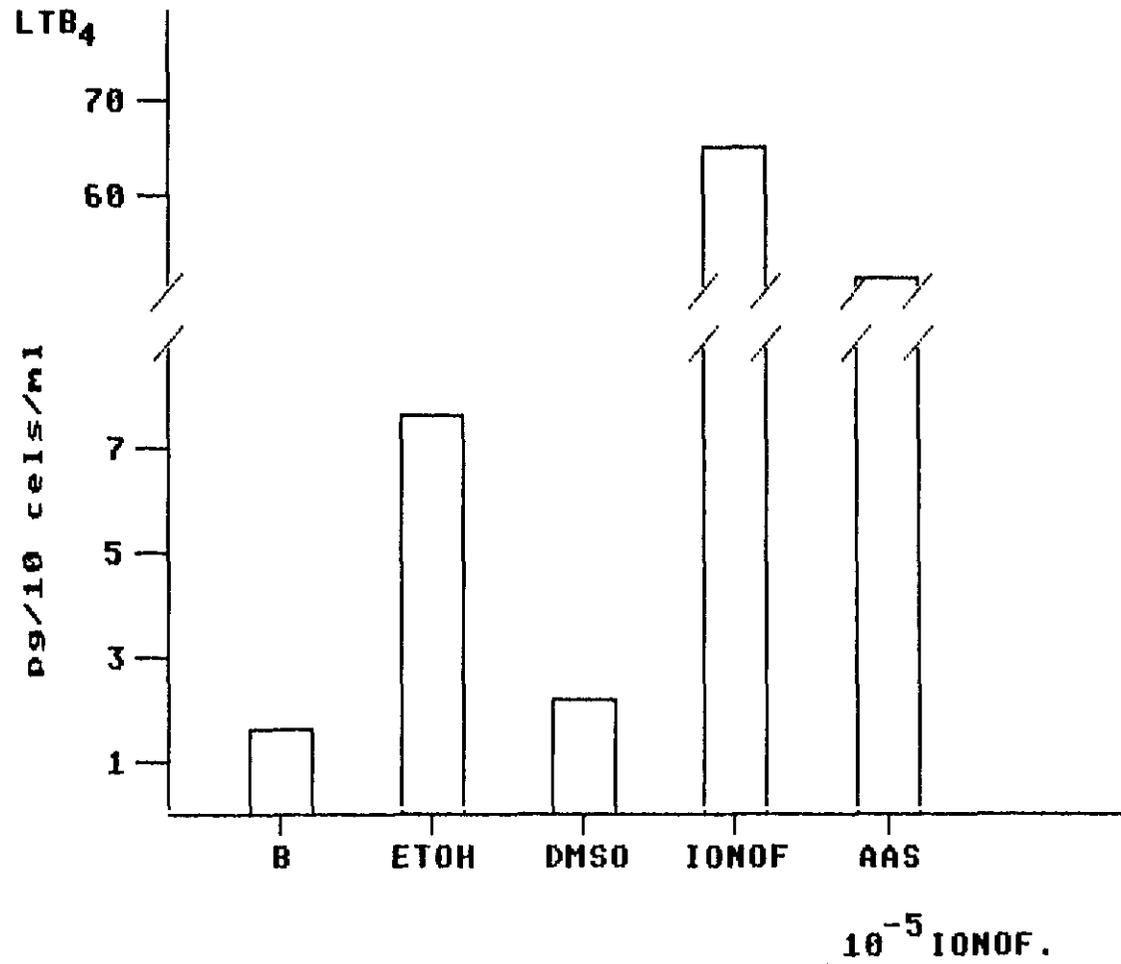


FIG.13.- COMPROBACION DE DILUYENTES EN LA PRODUCCION DE LTB<sub>4</sub> EN SANOS

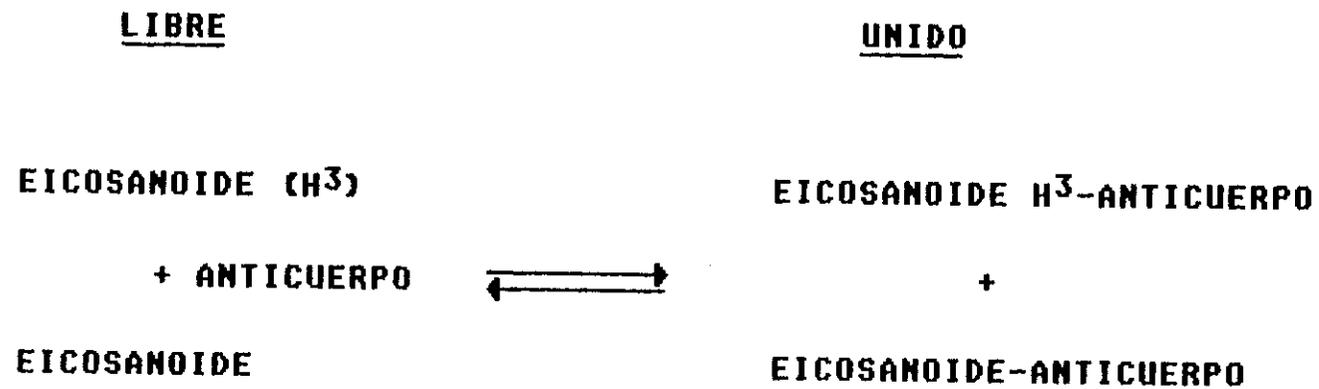


FIG.14.- ESQUEMA TEORICO DEL RADIOINMUNOENSAYO PARA CUANTIFICAR EICOSANOIDES

**Leukotriene B<sub>4</sub> [<sup>3</sup>H] assay system**

code TRK.940

High sensitivity assay

Leukotriene B<sub>4</sub> standard curve

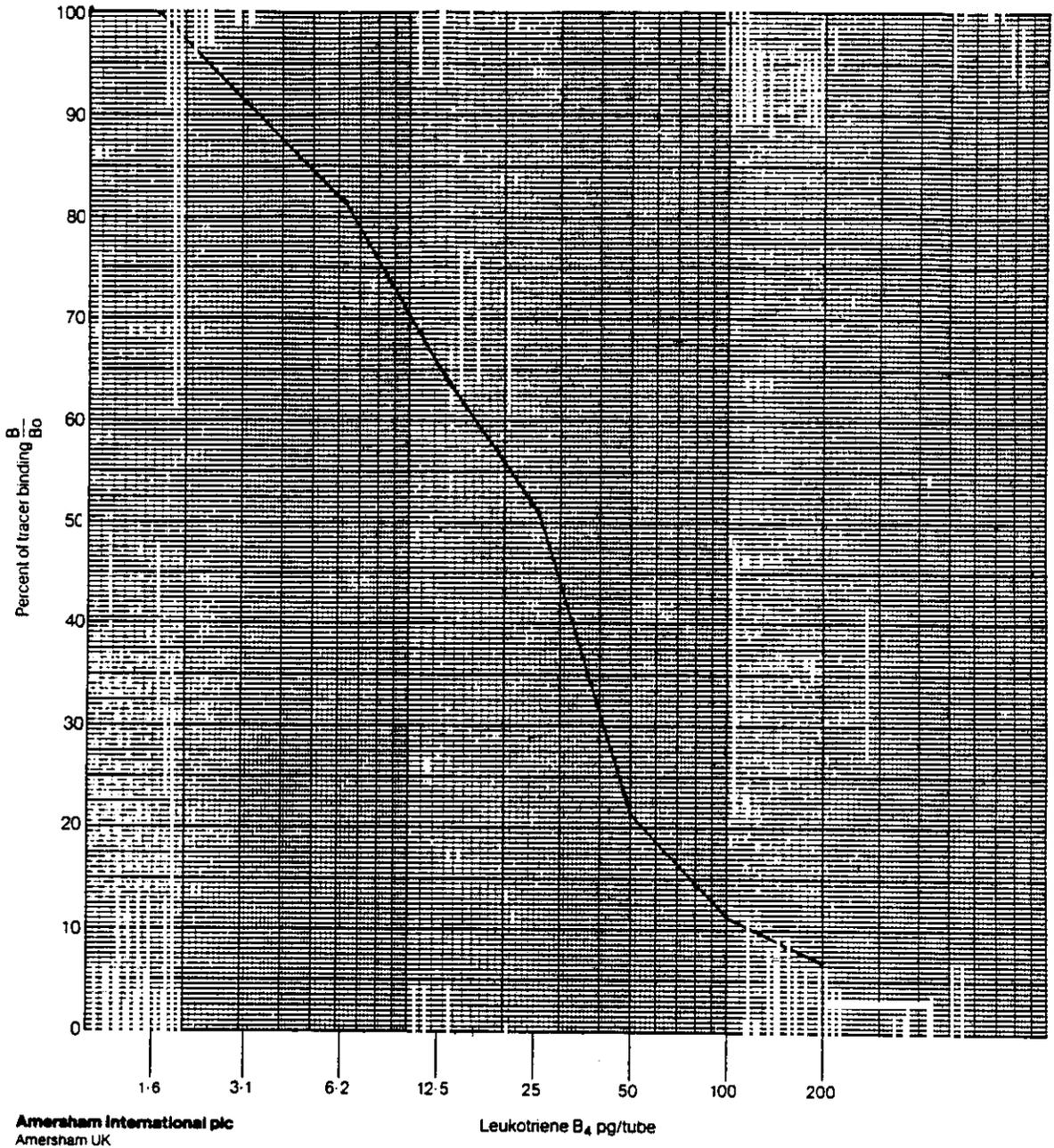
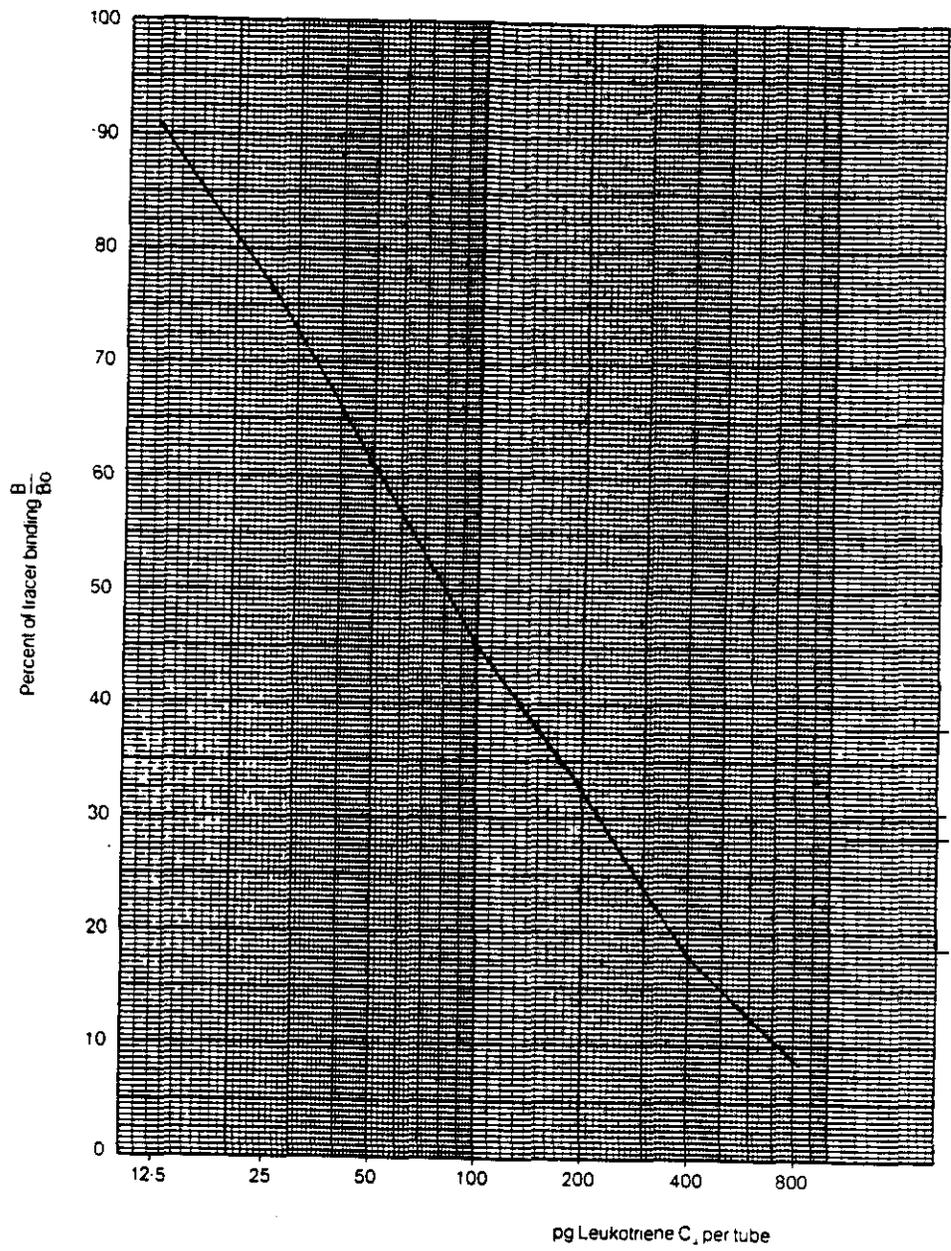


FIG 15

Leukotriene C<sub>4</sub> standard curve



Amersham International plc  
Amersham UK

FIG 16

Leukotriene C<sub>4</sub> standard curve

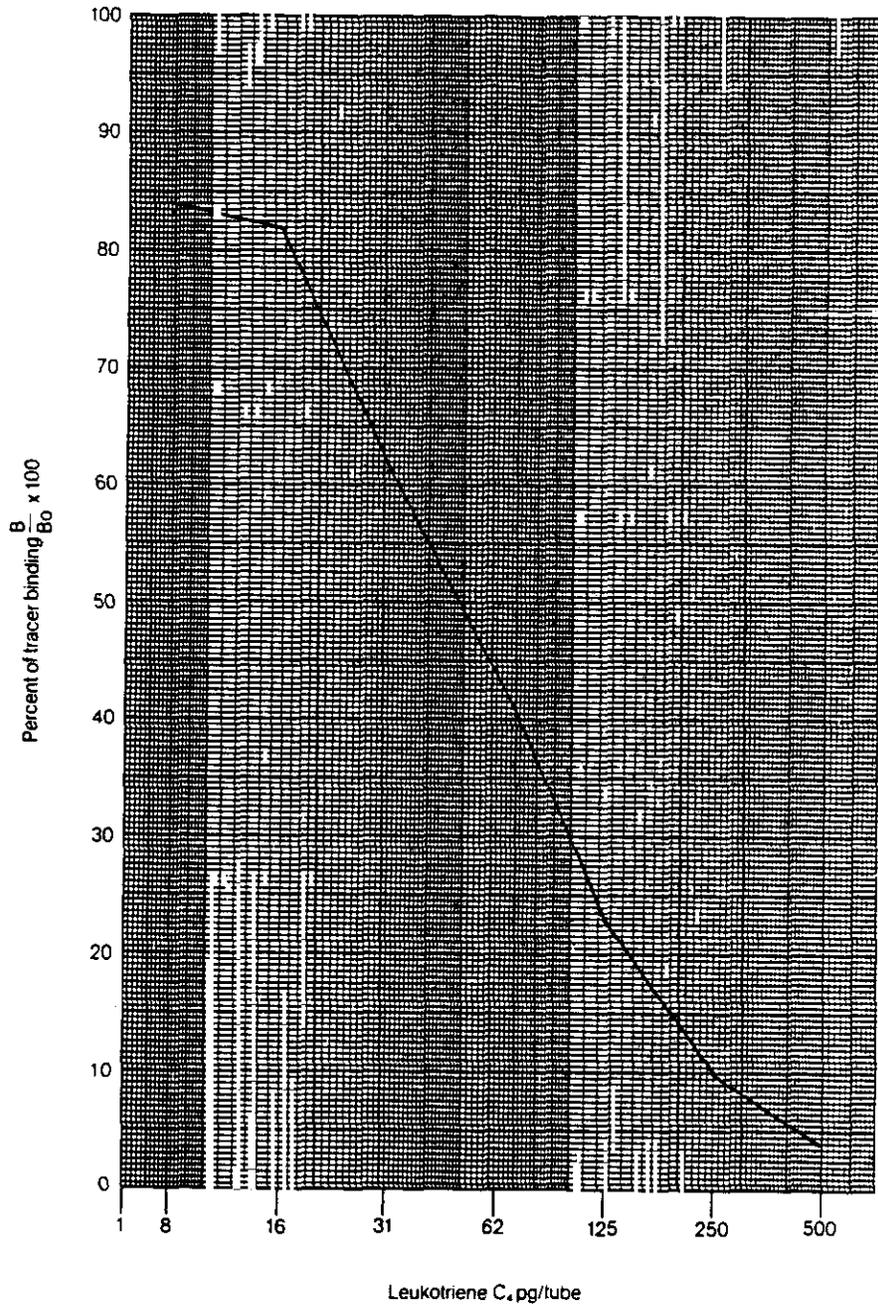
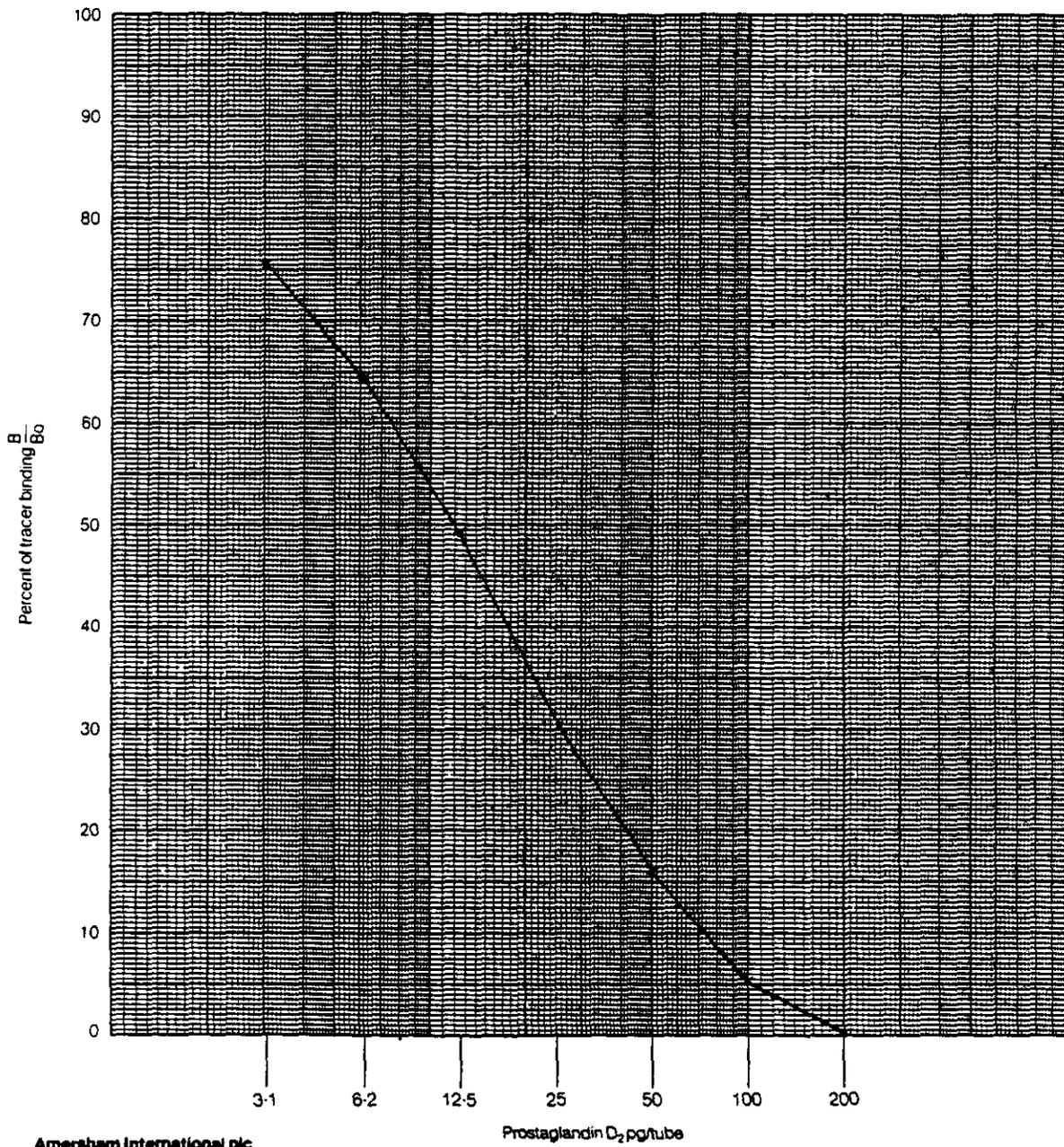


FIG. 17

Prostaglandin D<sub>2</sub> standard curve



Amersham International plc  
Amersham UK

FIG 18

**Thromboxane B<sub>2</sub> assay system**

code TRK. 780

Batch no. ....

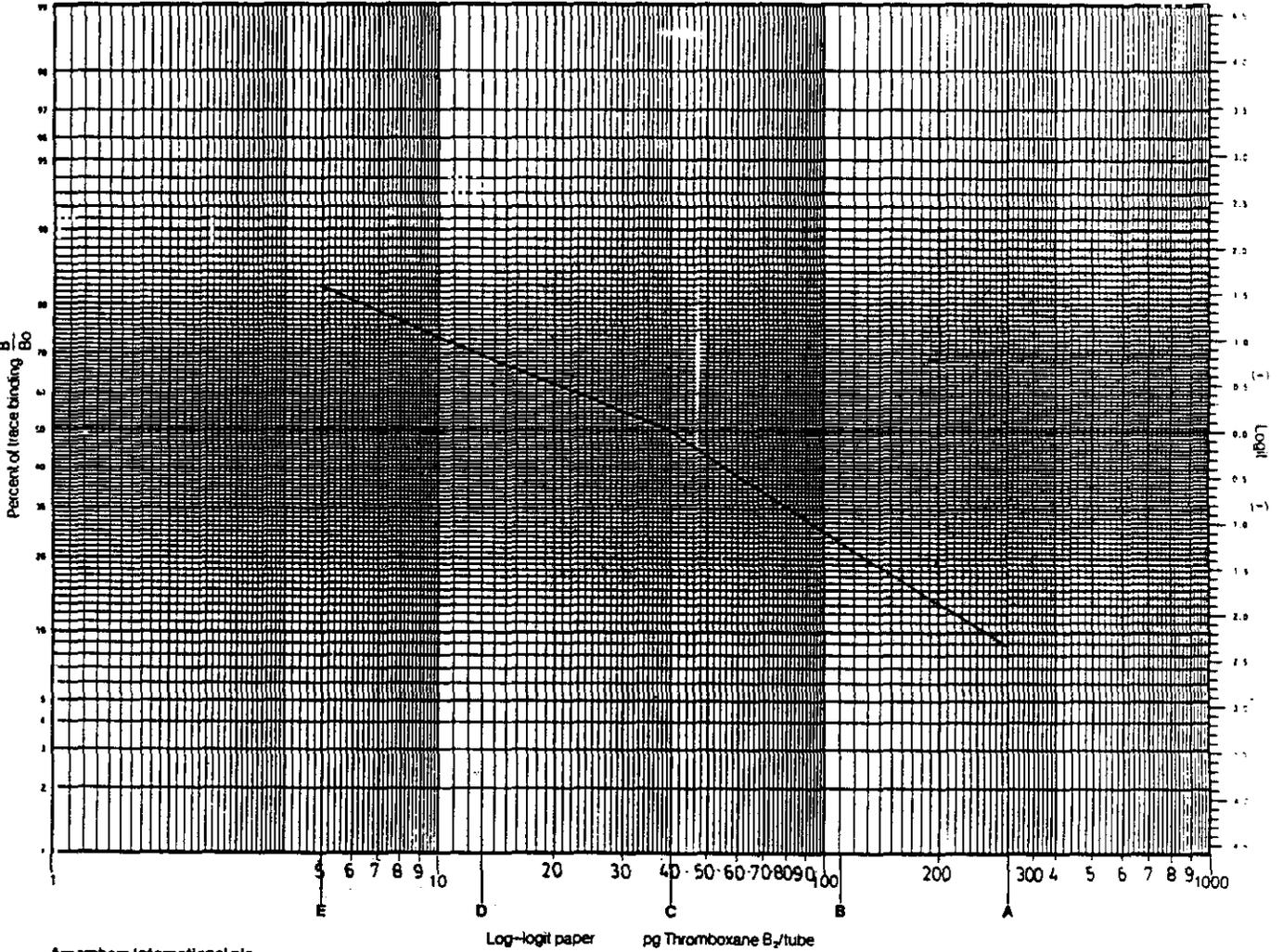
Date of assay .....

Operator .....

Counter background ..... cpm

Counting time ..... minutes

**Thromboxane B<sub>2</sub> standard curve**



Amersham International plc  
Amersham UK

FIG. 19

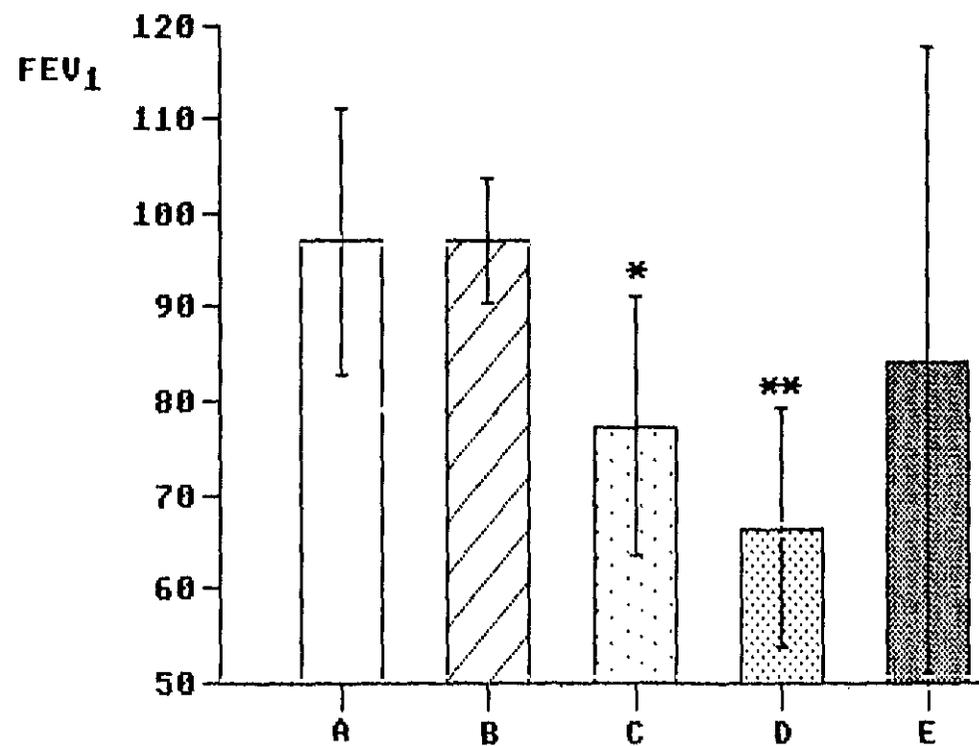


FIG.20.- REPRESENTACION DE LAS DIFERENCIAS ESTADISTICAS DEL FEV1 ENTRE EL GRUPO A Y LOS GRUPOS B,C,D Y E.

\* =  $p < 0.05$   
 \*\* =  $p < 0.005$

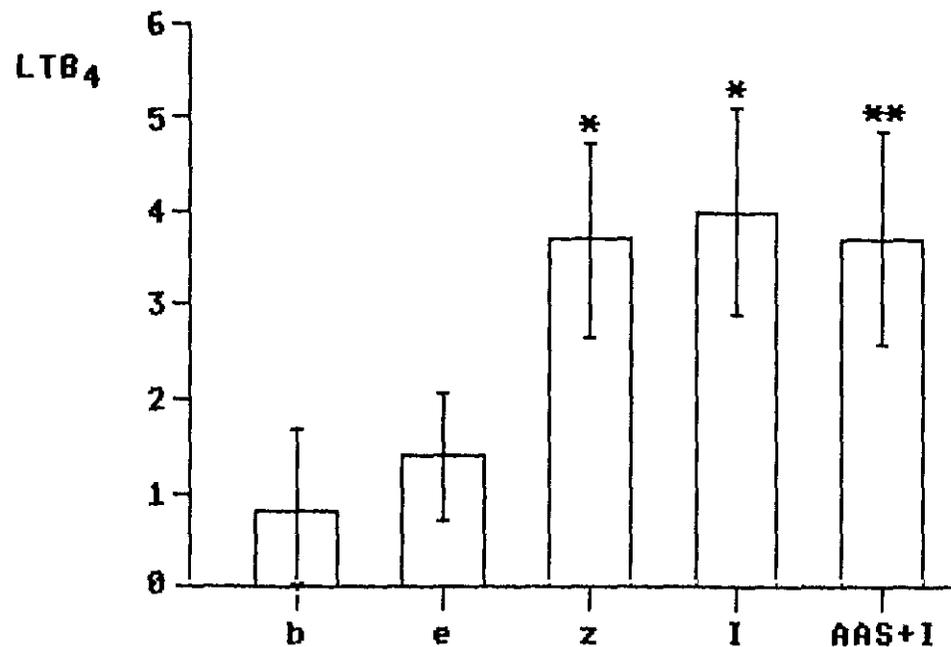


FIG.21.- GRUPO A: REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE LTB<sub>4</sub>, BASAL Y TRAS LOS DIFERENTES ESTIMULOS.

b=BASAL; e=ANTI IgE; z=ZIMOSAN-OP; I=IONOFORO DE CALCIO; AAS+I=AAS+IONOFORO DE CALCIO.

\* =  $p < 0.005$   
 \*\* =  $p < 0.0005$

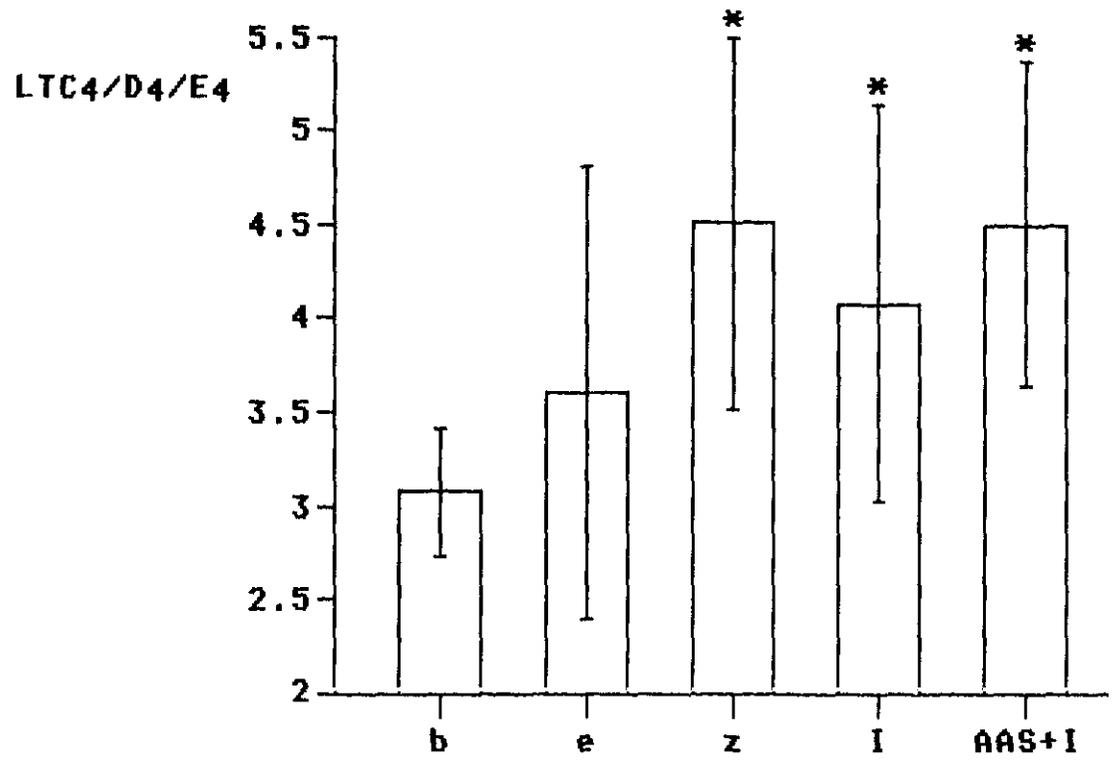


FIG.22.- GRUPO A: REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>, BASAL Y TRAS LOS DIFERENTES ESTIMULOS.  
 b=BASAL; e=ANTI IgE; z=ZIMOSAN-OP; I=IONOFORO DE CALCIO; AAS+I=AAS+IONOFORO DE CALCIO.  
 \* = p<0.05

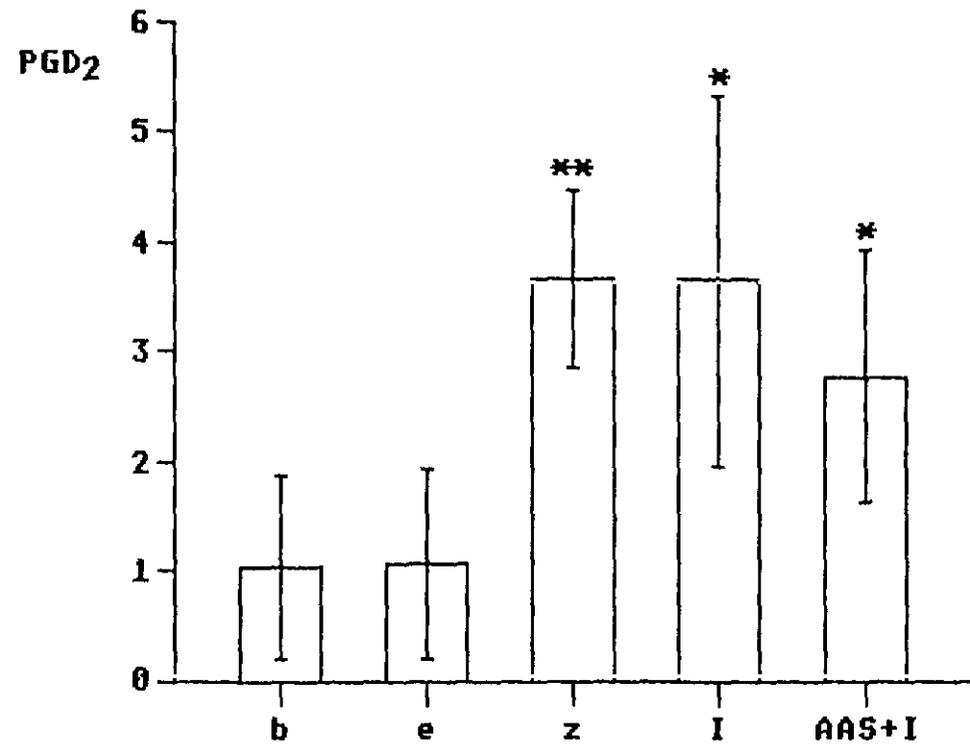


FIG. 23.- GRUPO A: REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE PGD<sub>2</sub>, BASAL Y TRAS LOS DIFERENTES ESTIMULOS.  
 b=BASAL; e=ANTI IgE; z=ZIMOSAN-OP; I=IONOFORO DE CALCIO; AAS+I=AAS+IONOFORO DE CALCIO.

\* =  $p < 0.05$   
 \*\* =  $p < 0.005$

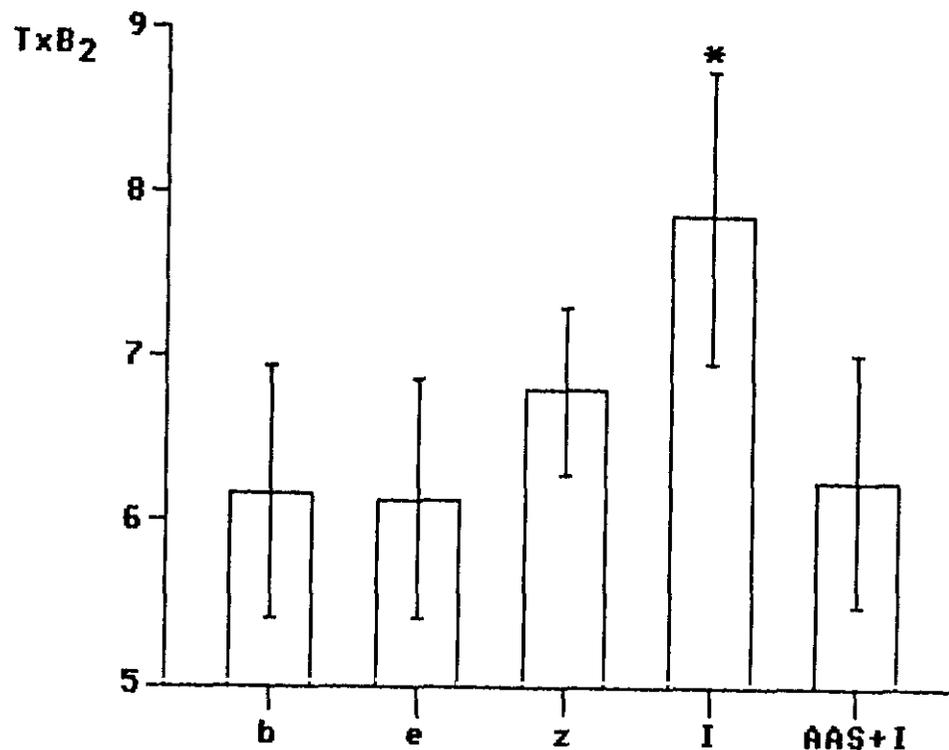


FIG.24.- GRUPO A: REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE TxB<sub>2</sub>, BASAL Y TRAS LOS DIFERENTES ESTIMULOS.  
 b=BASAL; e=ANTI IgE; z=ZIMOSAN-OP; I=IONOFORO DE CALCIO; AAS+I=AAS+IONOFORO DE CALCIO.

\* = p<0.005

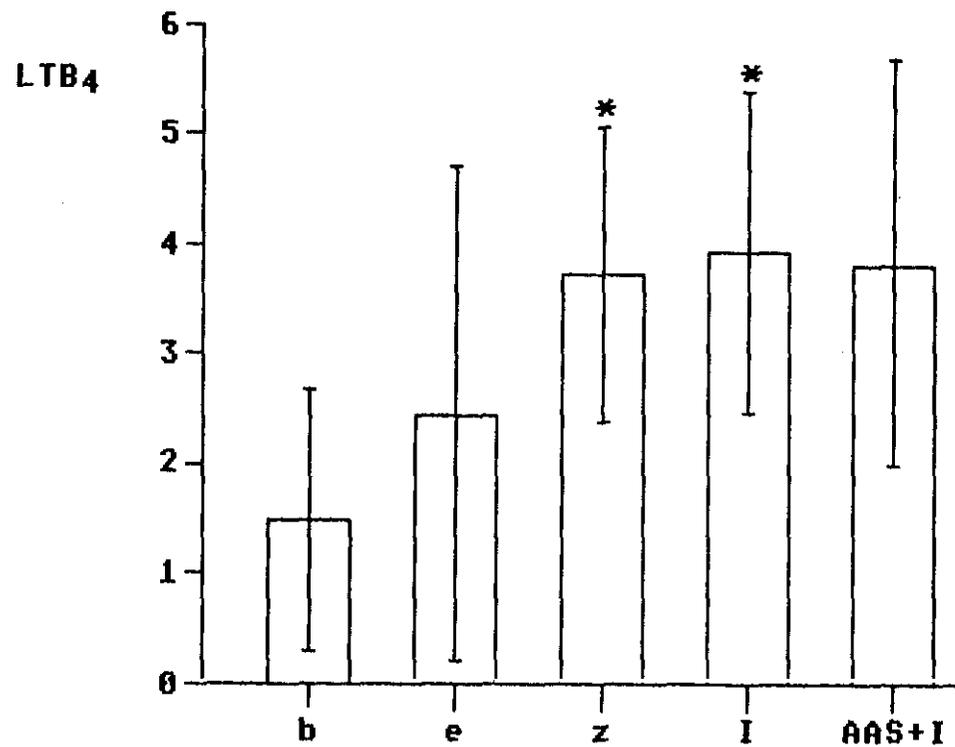


FIG.25.- GRUPO B: REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE LTB<sub>4</sub>, BASAL Y TRAS LOS DIFERENTES ESTIMULOS.

b=BASAL; e=ANTI IgE; z=ZIMOSAN-OP; I=IONOFORO DE CALCIO; AAS+I=AAS+IONOFORO DE CALCIO.

\* = p < 0.05

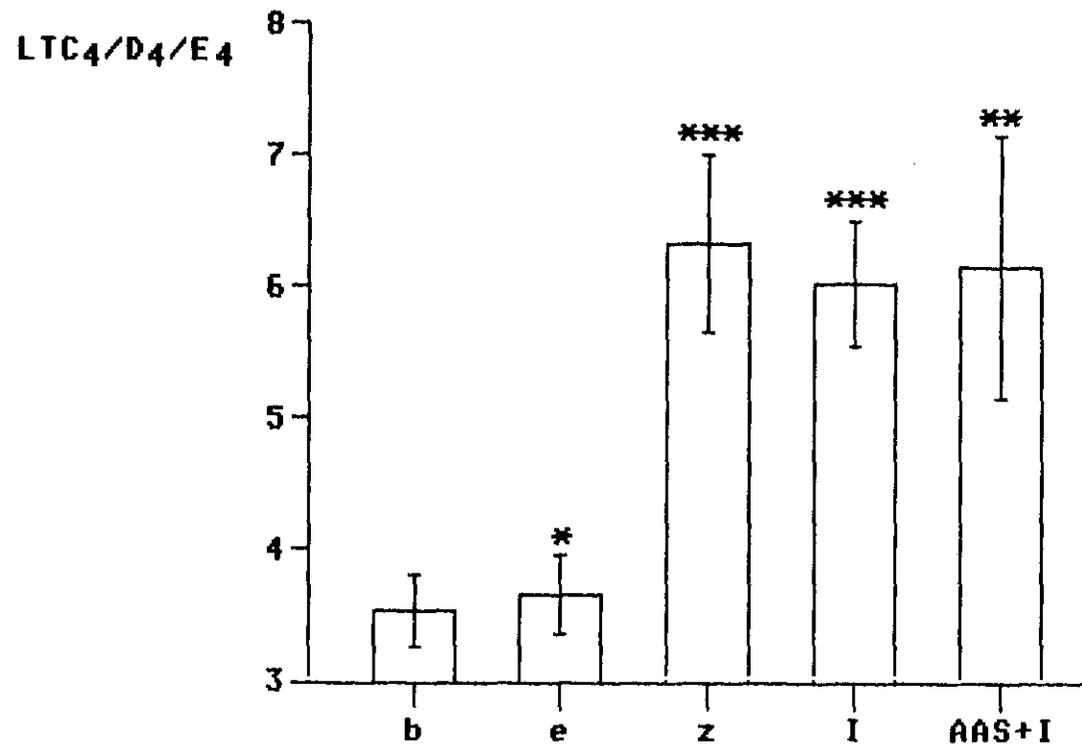


FIG.26.- GRUPO B: REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>, BASAL Y TRAS LOS DIFERENTES ESTIMULOS.

b=BASAL; e=ANTI IgE; z=ZIMOSAN-OP; I=IONOFORO DE CALCIO; AAS+I=AAS+IONOFORO DE CALCIO.

\* = P<0.05  
 \*\* = P<0.005  
 \*\*\*= P<0.0005

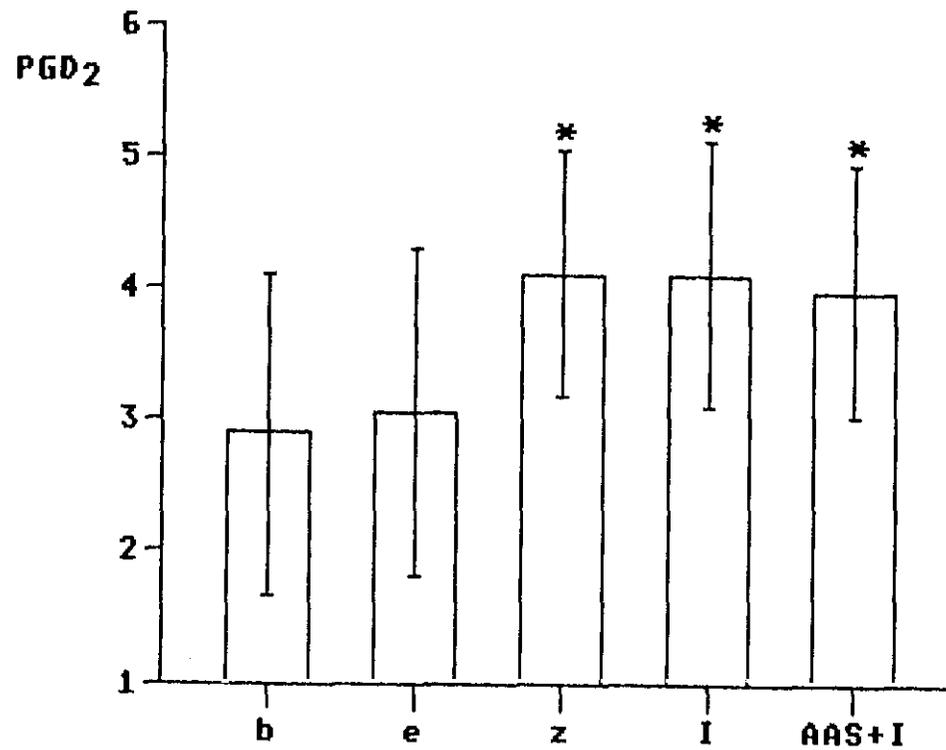


FIG.27.- GRUPO B: REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE PGD<sub>2</sub>, BASAL Y TRAS LOS DIFERENTES ESTIMULOS.

b=BASAL; e=ANTI IgE; z=ZIMOSAN-OP; I=IONOFORO DE CALCIO; AAS+I=AAS+IONOFORO DE CALCIO.

\* =  $p < 0.05$

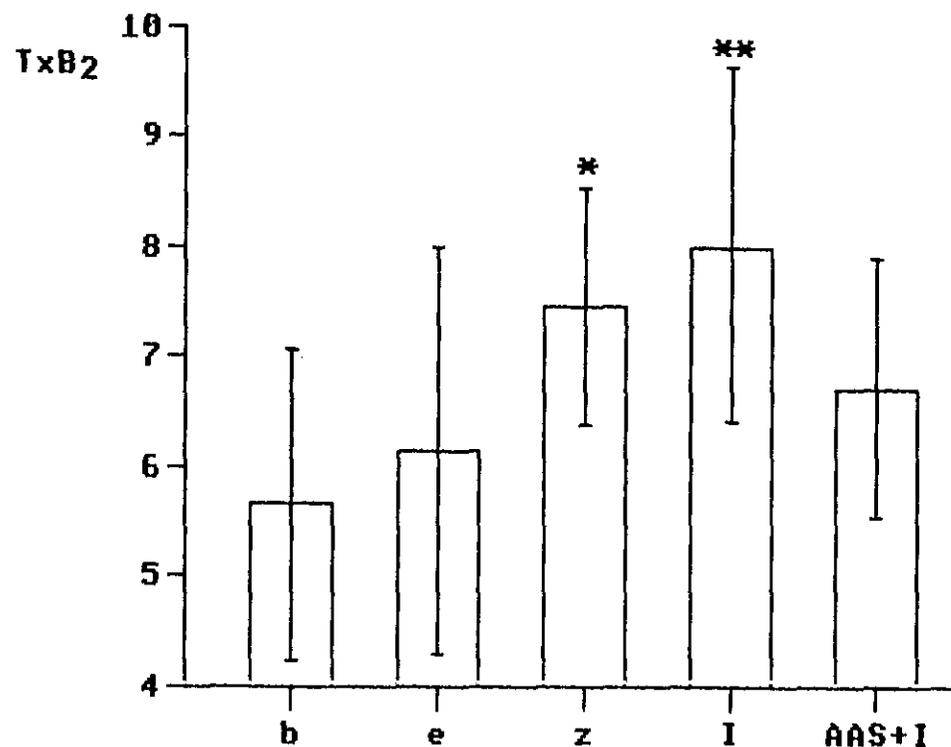


FIG.28.- GRUPO B: REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE TxB<sub>2</sub>, BASAL Y TRAS LOS DIFERENTES ESTIMULOS.

b=BASAL; e=ANTI IgE; z=ZIMOSAN-OP; I=IONOFORO DE CALCIO; AAS+I=AAS+IONOFORO DE CALCIO.

\* =  $p < 0.005$

\*\* =  $p < 0.00005$

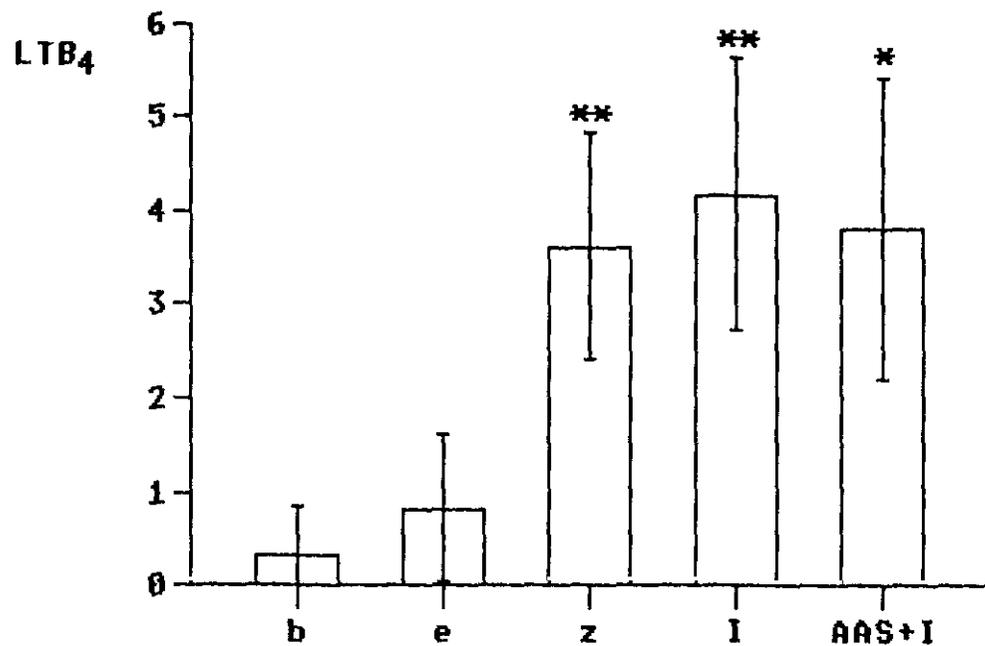


FIG.29.- GRUPO C: REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE LTB<sub>4</sub>, BASAL Y TRAS LOS DIFERENTES ESTIMULOS.  
 b=BASAL; e=ANTI IgE; z=ZIMOSAN-OP; I=IONOFORO DE CALCIO; AAS+I=AAS+IONOFORO DE CALCIO.

\* = p<0.05  
 \*\* = p<0.005

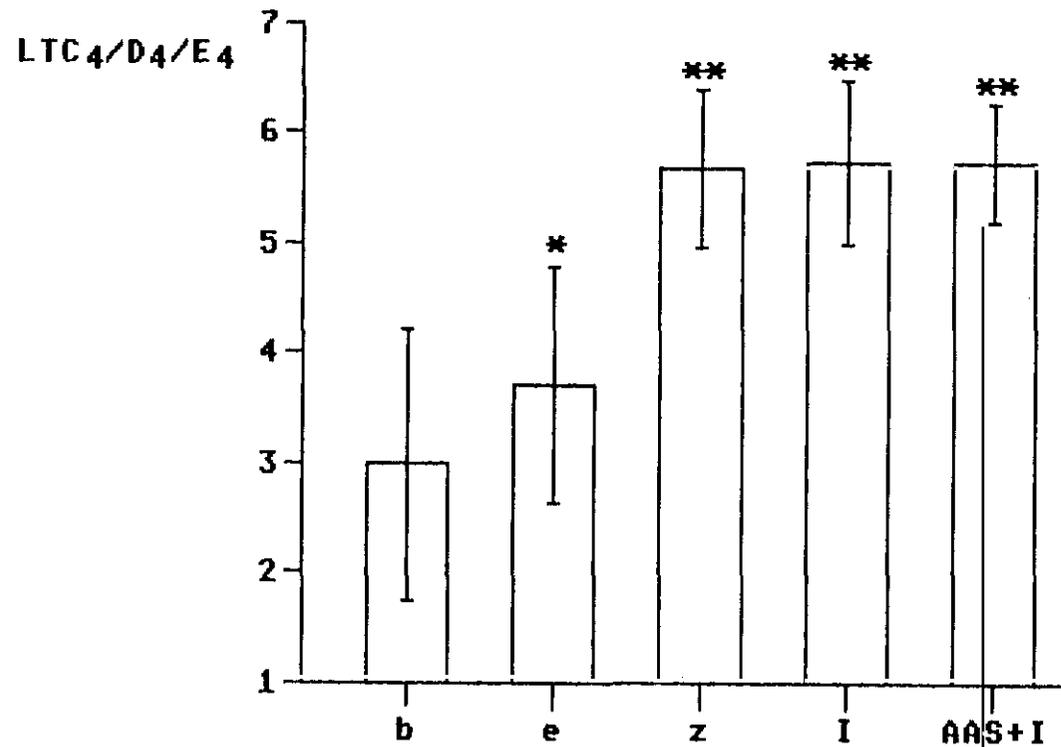


FIG.30.- GRUPO C: REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>, BASAL Y TRAS LOS DIFERENTES ESTIMULOS.

b=BASAL; e=ANTI IgE; z=ZIMOSAN-OP; I=IONOFORO DE CALCIO; AAS+I=AAS+IONOFORO DE CALCIO.

\* = p<0.05

\*\* = p<0.005

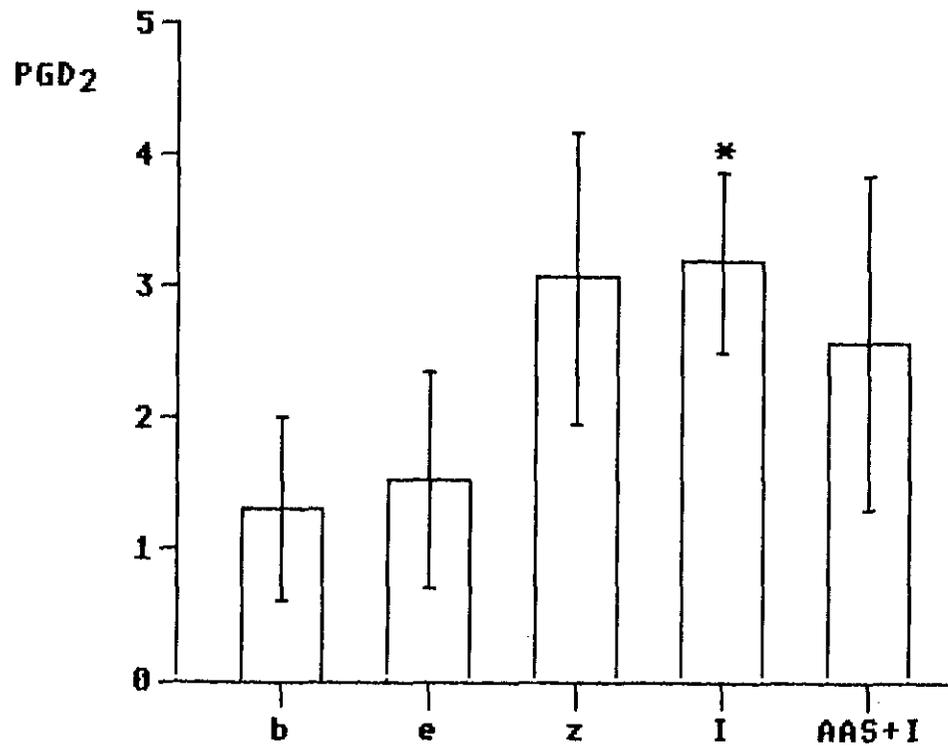


FIG.31.- GRUPO C: REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE PGD<sub>2</sub>, BASAL Y TRAS LOS DIFERENTES ESTIMULOS.  
 b=BASAL; e=ANTI IgE; z=ZIMOSAN-OP; I=IONOFORO DE CALCIO; AAS+I=AAS+IONOFORO DE CALCIO.  
 \* = p<0.05

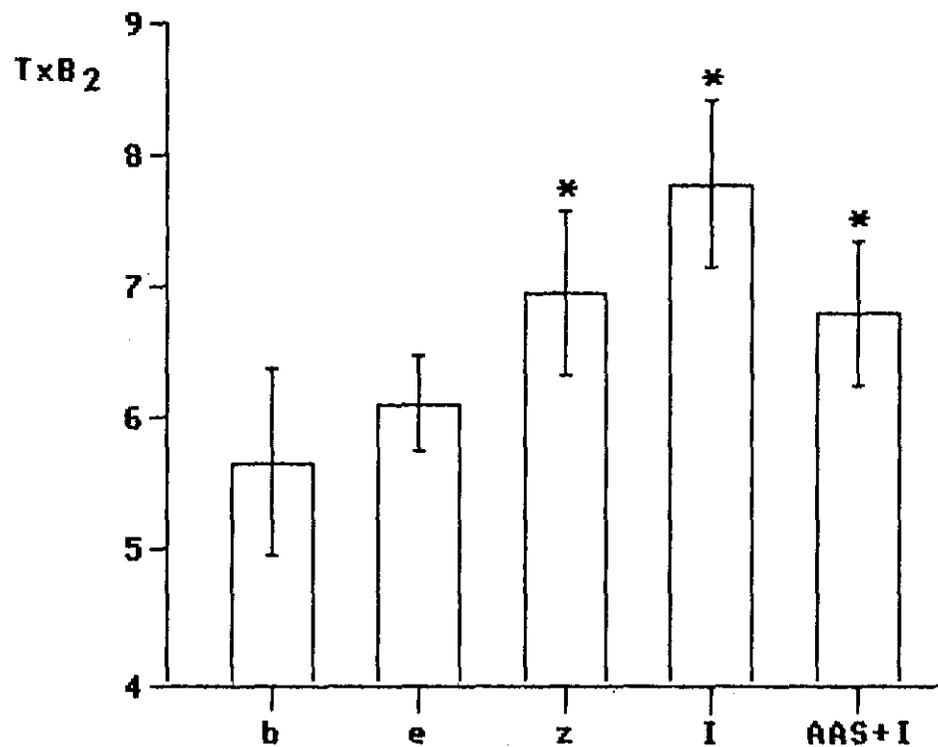


FIG.32.- GRUPO C: REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE TxB<sub>2</sub>, BASAL Y TRAS LOS DIFERENTES ESTIMULOS.

b=BASAL; e=ANTI IgE; z=ZIMOSAN-OP; I=IONOFORO DE CALCIO; AAS+I=AAS+IONOFORO DE CALCIO.

\* = p<0.05

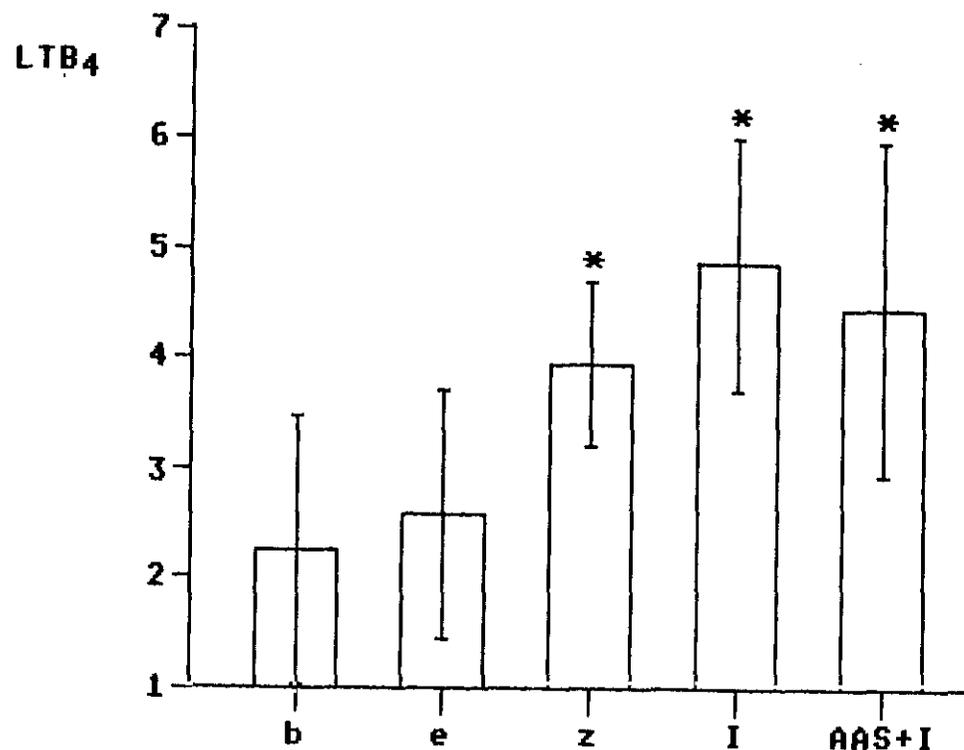


FIG.33.- GRUPO D: REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE LTB<sub>4</sub>, BASAL Y TRAS LOS DIFERENTES ESTIMULOS.  
 b=BASAL; e=ANTI IgE; z=ZIMOSAN-OP; I=IONOFORO DE CALCIO; AAS+I=AAS+IONOFORO DE CALCIO.  
 \* = p<0.05

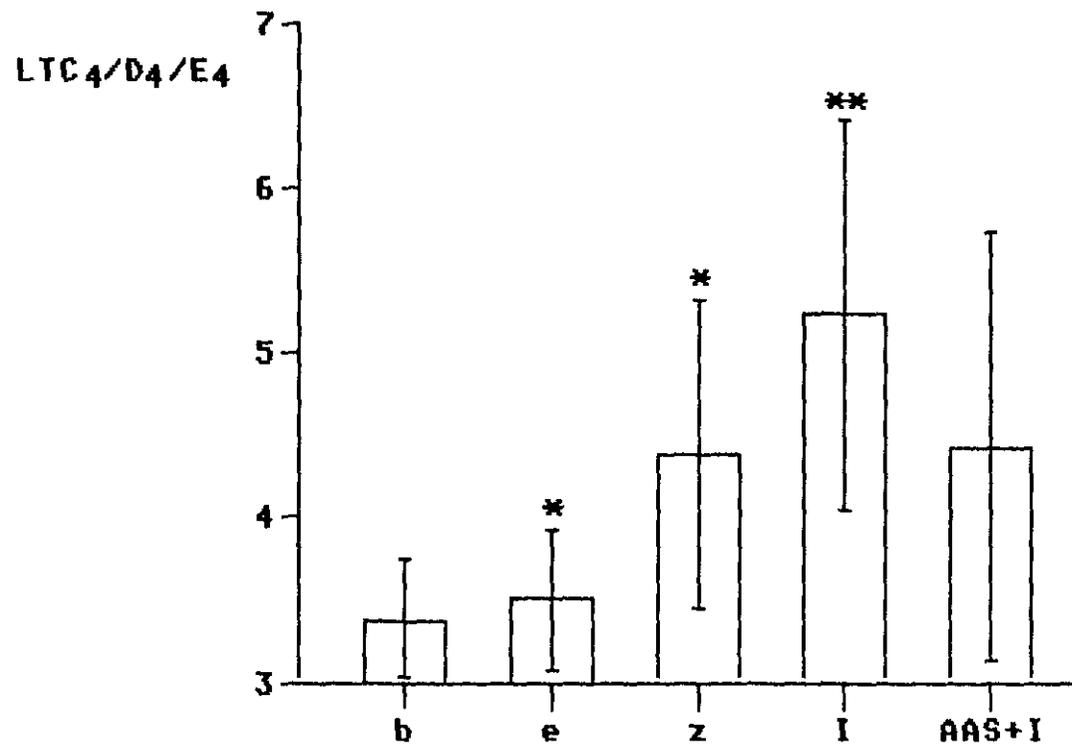


FIG.34.- GRUPO D: REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>, BASAL Y TRAS LOS DIFERENTES ESTIMULOS. b=Basal; e=ANTI IgE; z=ZIMOSAN-OP; I=IONOFORO DE CALCIO; AAS+I=AAS+IONOFORO DE CALCIO.

\* = p<0.05  
 \*\* = p<0.005

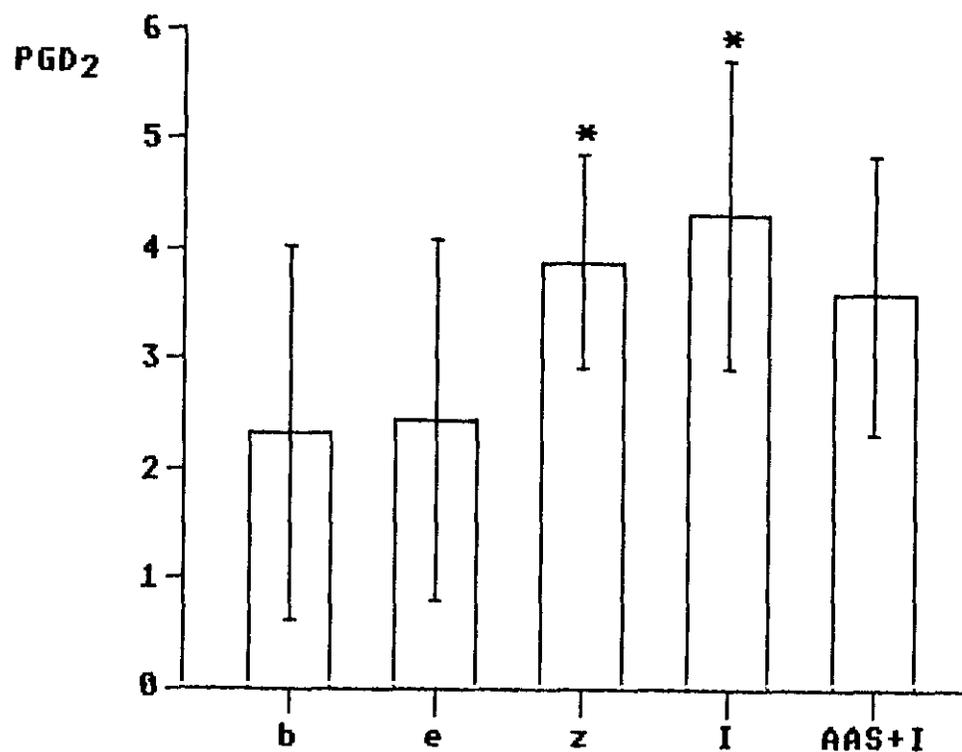


FIG.35.- GRUPO D: REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE PGD<sub>2</sub>, BASAL Y TRAS LOS DIFERENTES ESTIMULOS.  
 b=BASAL; e=ANTI IgE; z=ZIMOSAN-OP; I=IONOFORO DE CALCIO; AAS+I=AAS+IONOFORO DE CALCIO.  
 \* = p<0.05

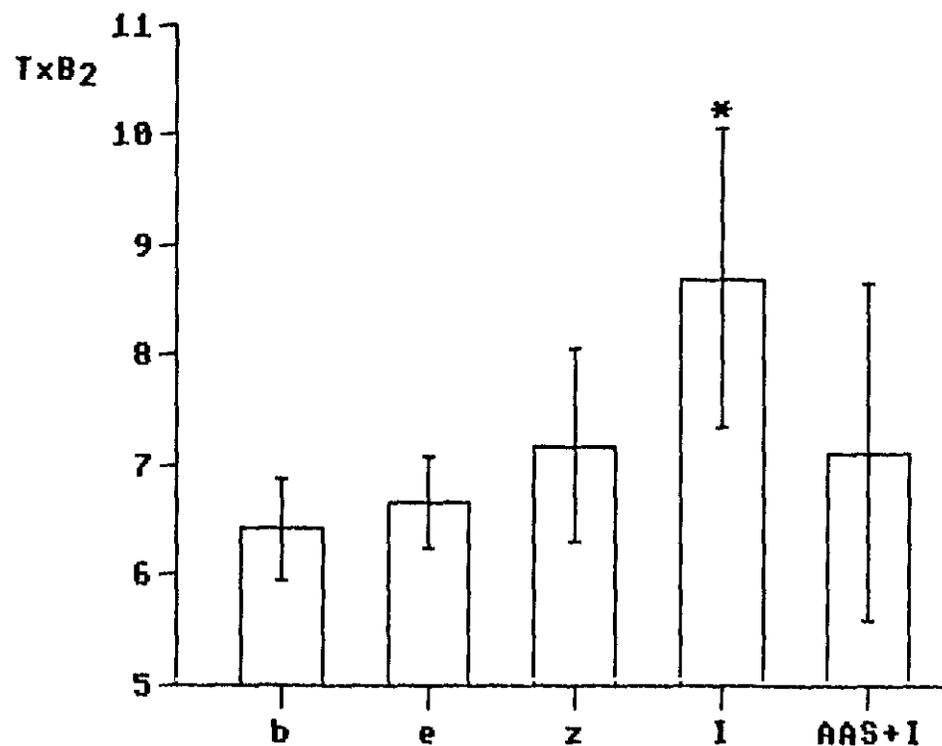


FIG.36.- GRUPO D: REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE TxB<sub>2</sub>, BASAL Y TRAS LOS DIFERENTES ESTIMULOS.

b=BASAL; e=ANTI IgE; z=ZIMOSAN-OP; I=IONOFORO DE CALCIO; AAS+I=AAS+IONOFORO DE CALCIO.

\* = p < 0.05

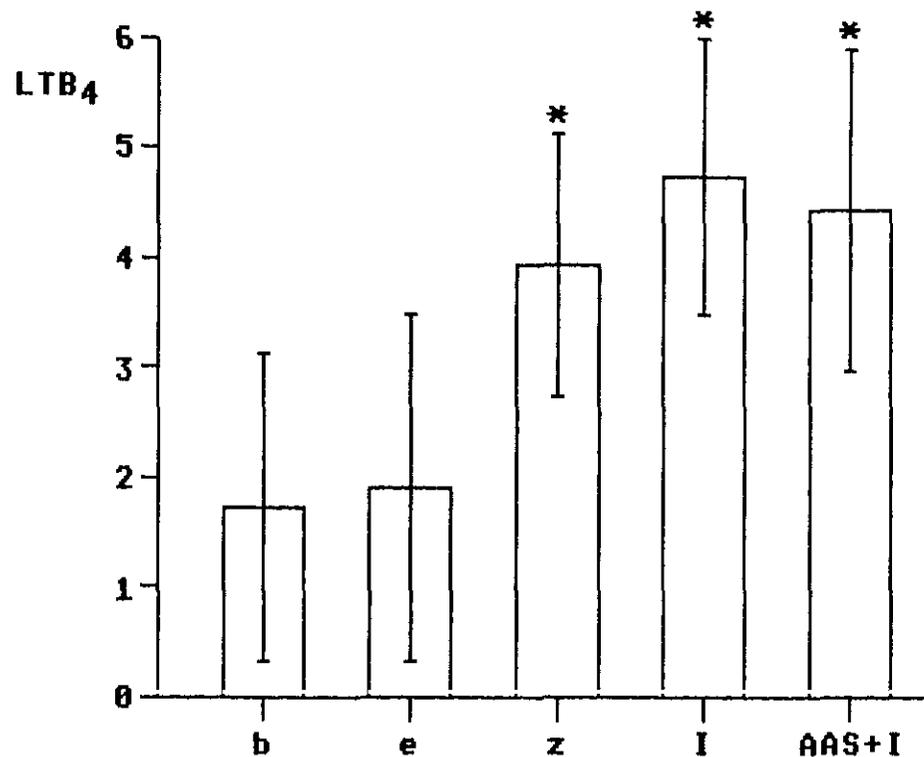


FIG.37.- GRUPO E: REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE LTB<sub>4</sub>, BASAL Y TRAS LOS DIFERENTES ESTIMULOS.  
 b=BASAL; e=ANTI IgE; z=ZIMOSAN-OP; I=IONOFORO DE CALCIO; AAS+I=AAS+IONOFORO DE CALCIO.  
 \* = p<0.05

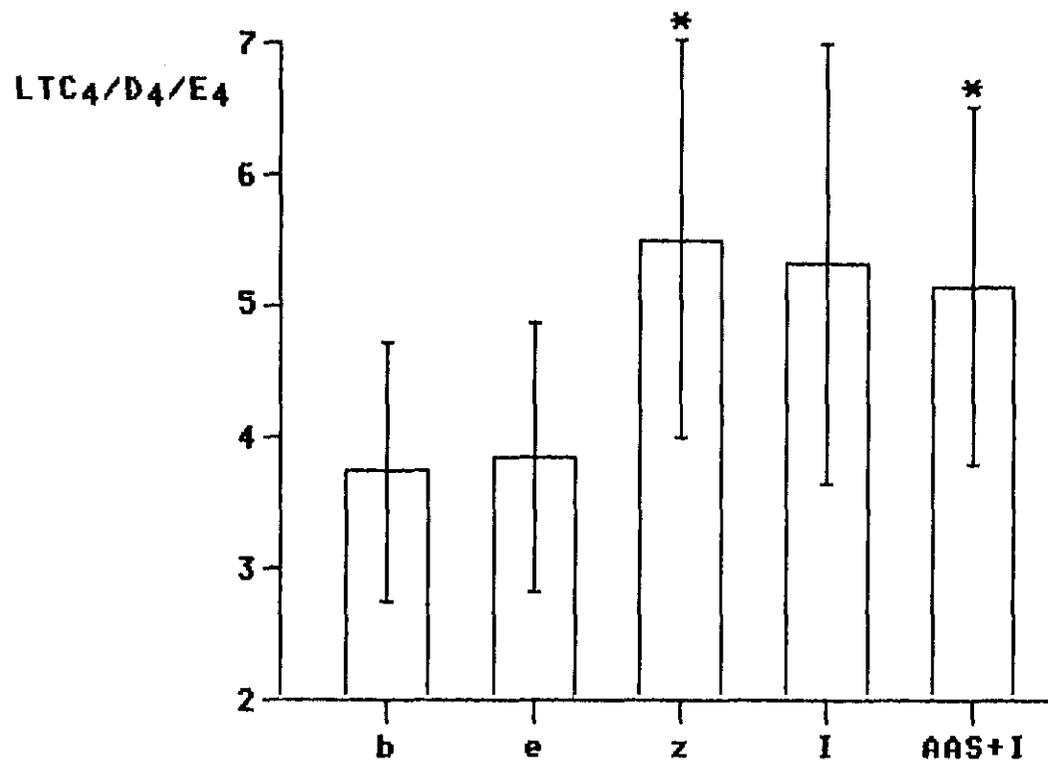


FIG.38.- GRUPO E: REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>, BASAL Y TRAS LOS DIFERENTES ESTIMULOS.  
 b=BASAL; e=ANTI IgE; z=ZIMOSAN-OP; I=IONOFORO DE CALCIO; AAS+I=AAS+IONOFORO DE CALCIO.  
 \* = p<0.05

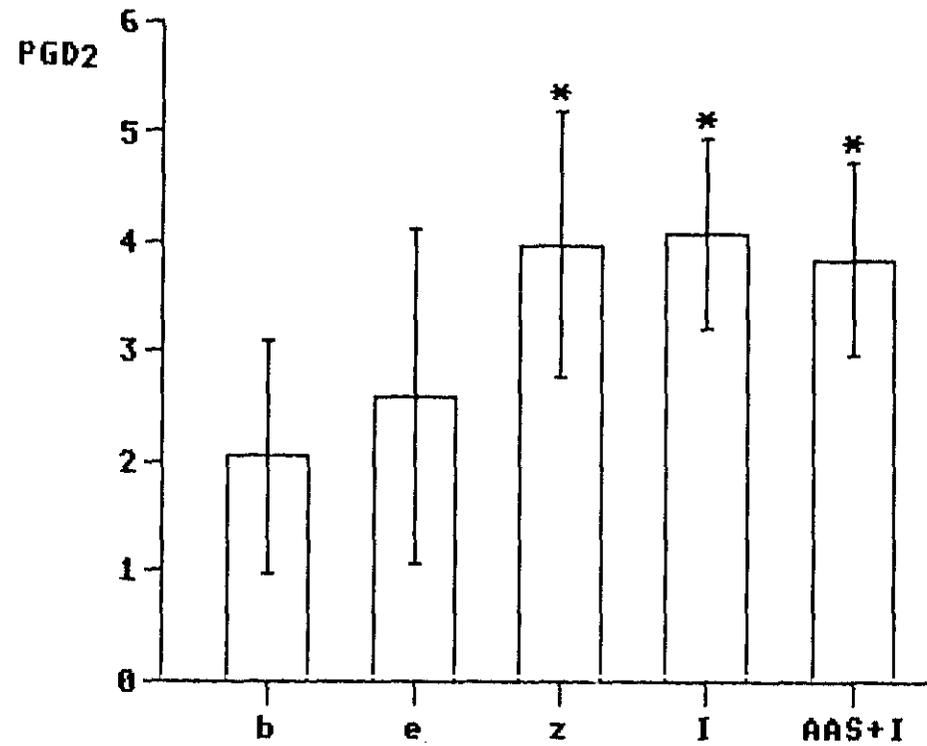


FIG.39.- GRUPO E; REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE PGD2, BASAL Y TRAS LOS DIFERENTES ESTIMULOS.

b=BASAL; e=ANTI IgE; z=ZIMOSAN-OP; I=IONOFORO DE CALCIO; AAS+I=AAS+IONOFORO DE CALCIO.

\* =  $p < 0.05$

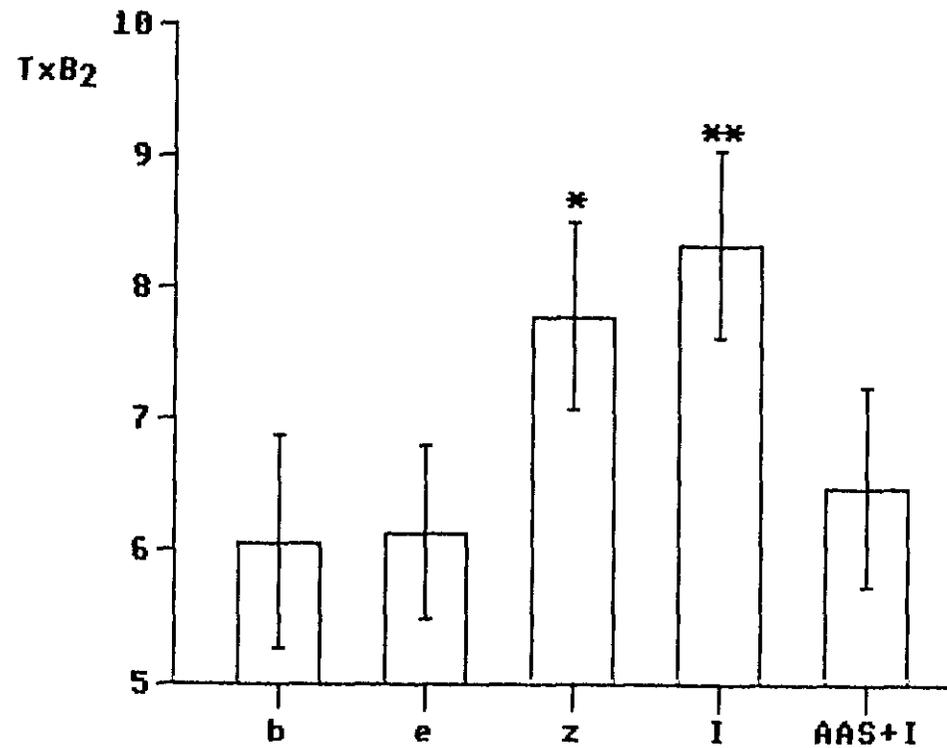


FIG.40.- GRUPO E; REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE TxB<sub>2</sub>, BASAL Y TRAS LOS DIFERENTES ESTIMULOS.  
 b=BASAL; e=ANTI IgE; z=ZIMOSAN-OP; I=IONOFORO DE CALCIO; AAS+I=AAS+IONOFORO DE CALCIO.

\* = p<0.05  
 \*\* = p<0.005

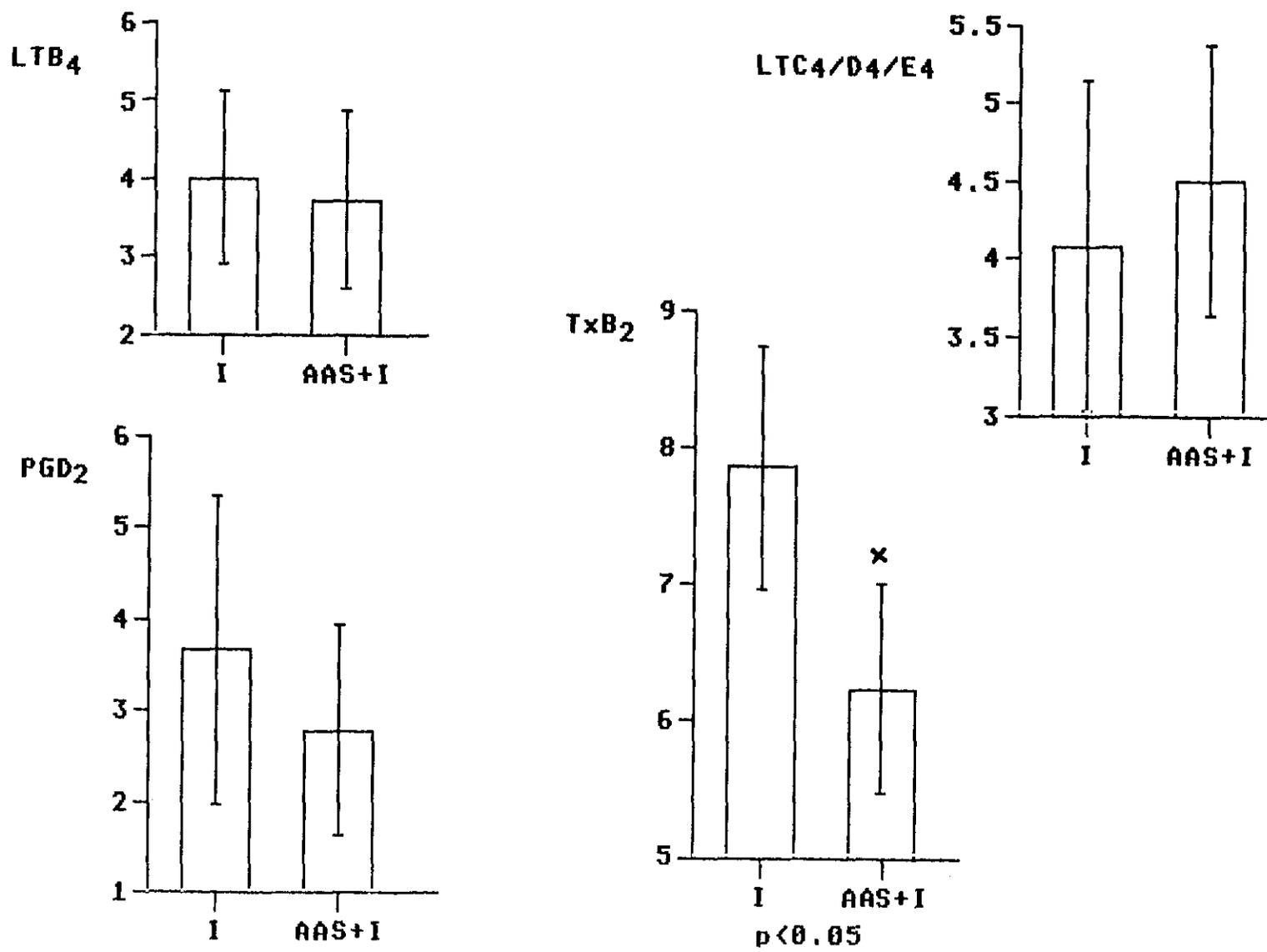


FIG.41.- GRUPO A: REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE LOS DISTINTOS EICOSANOIDES TRAS EL ESTIMULO CON IONOFORO DE CALCIO (I) Y AAS+IONOFORO DE CALCIO (AAS+I).

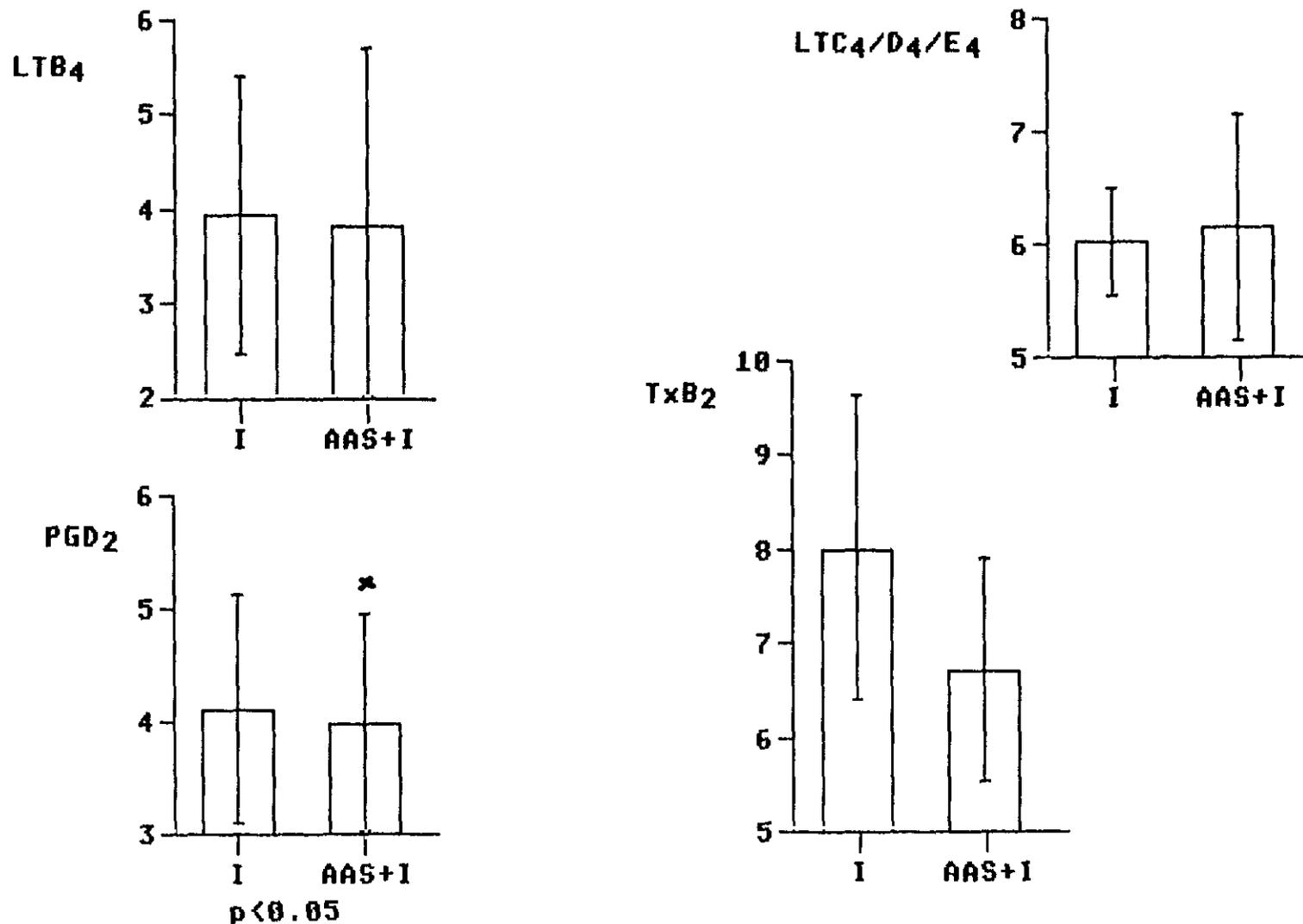
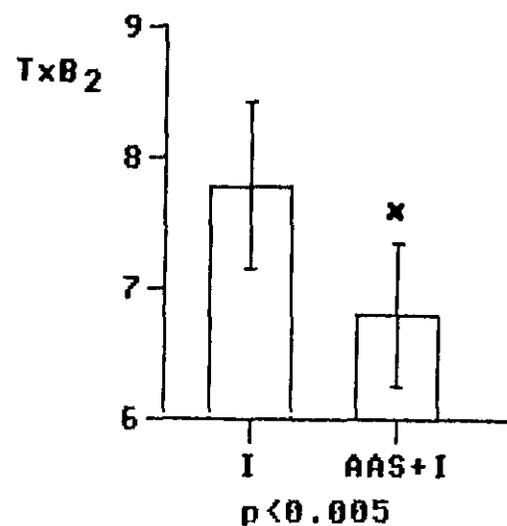
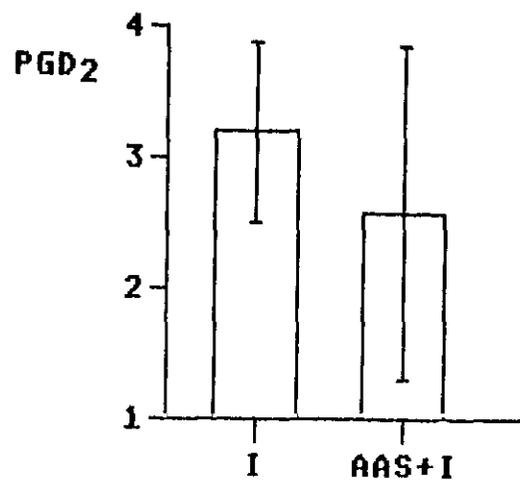
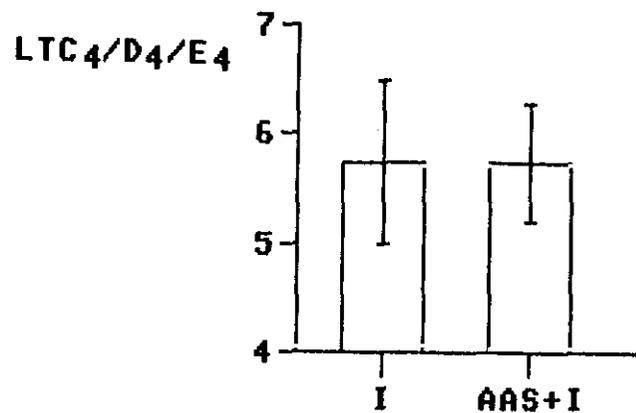
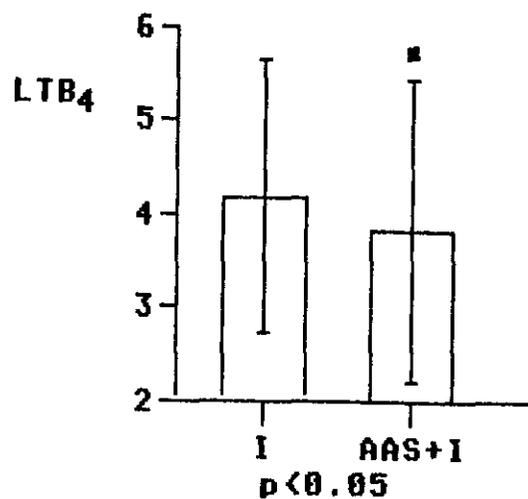


FIG.42.- GRUPO B: REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE LOS DISTINTOS EICOSANOIDES TRAS EL ESTIMULO CON IONOFORO DE CALCIO (I) Y AAS+IONOFORO DE CALCIO (AAS+I).



**FIG. 43.- GRUPO C: REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE LOS DISTINTOS EICOSANOIDES TRAS EL ESTIMULO CON IONOFORO DE CALCIO (I) Y AAS+IONOFORO DE CALCIO (AAS+I).**

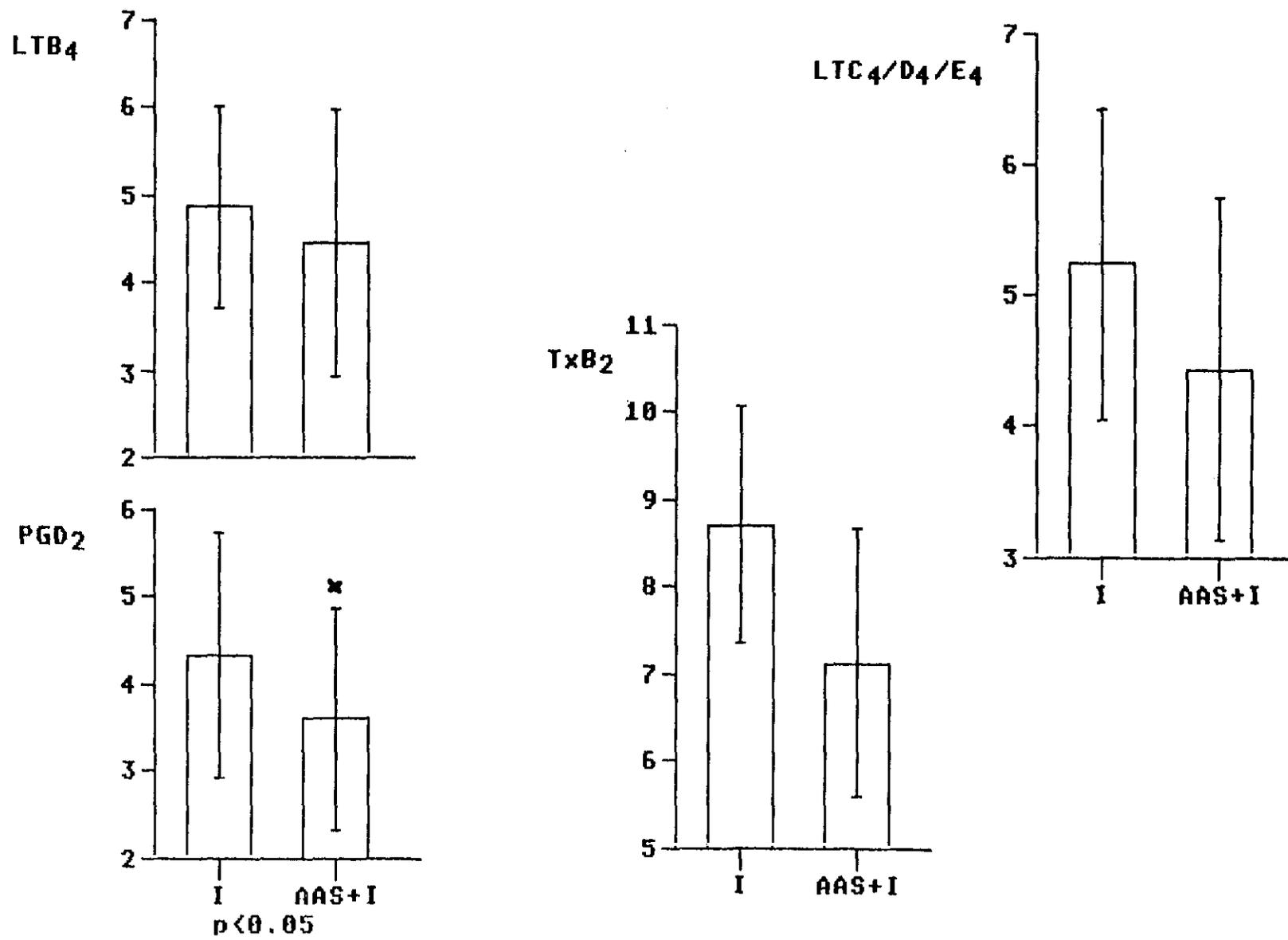


FIG.44.- GRUPO D: REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE LOS DISTINTOS EICOSANOIDES TRAS EL ESTIMULO CON IONOFORO DE CALCIO (I) Y AAS+IONOFORO DE CALCIO (AAS+I).

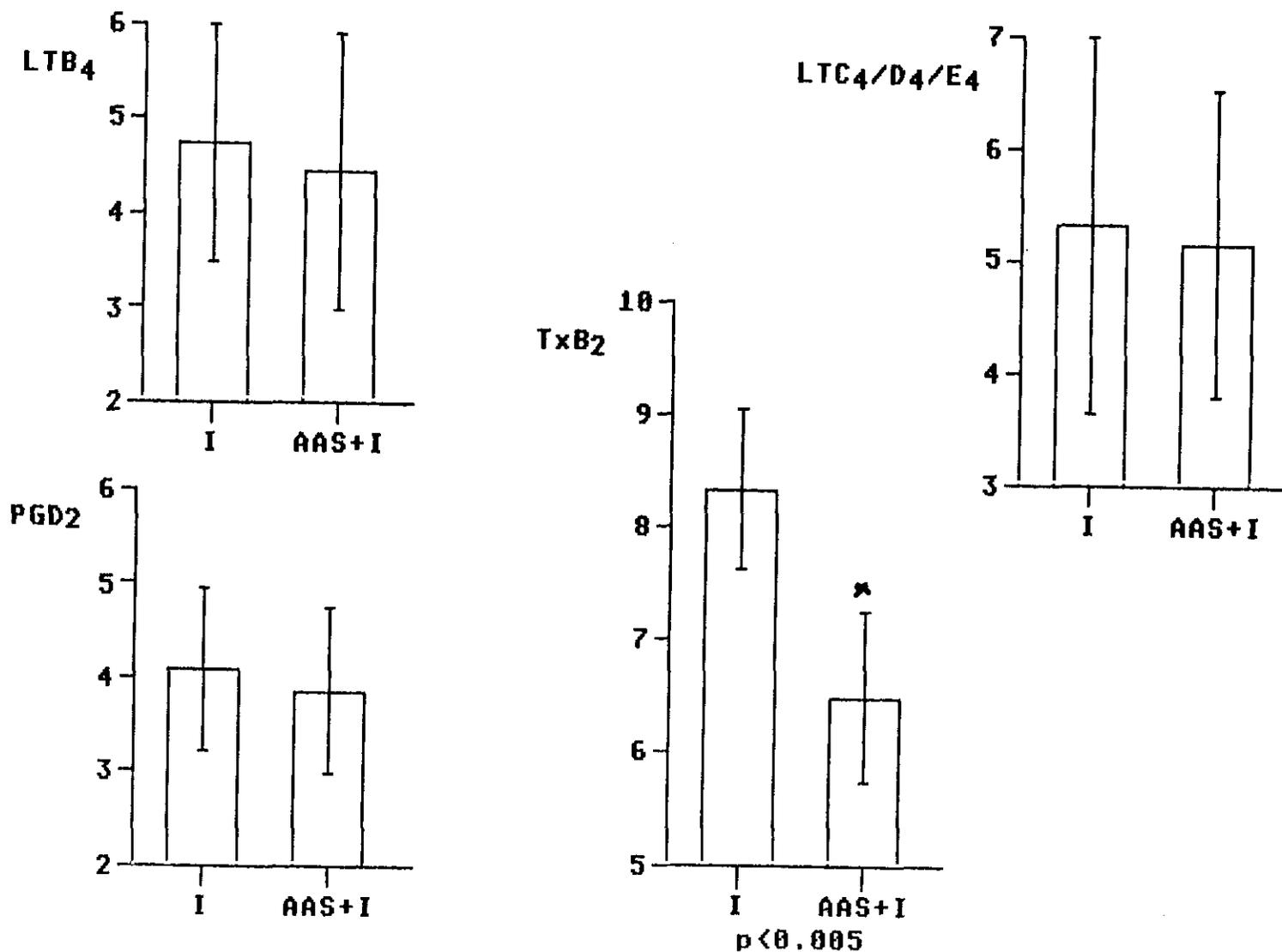


FIG.45.- GRUPO E: REPRESENTACION DE LAS MEDIAS Y D.S. DE LOS LOG DE LA PRODUCCION DE LOS DISTINTOS EICOSANOIDES TRAS EL ESTIMULO CON IONOFORO DE CALCIO (I) Y AAS+IONOFORO DE CALCIO (AAS+I).

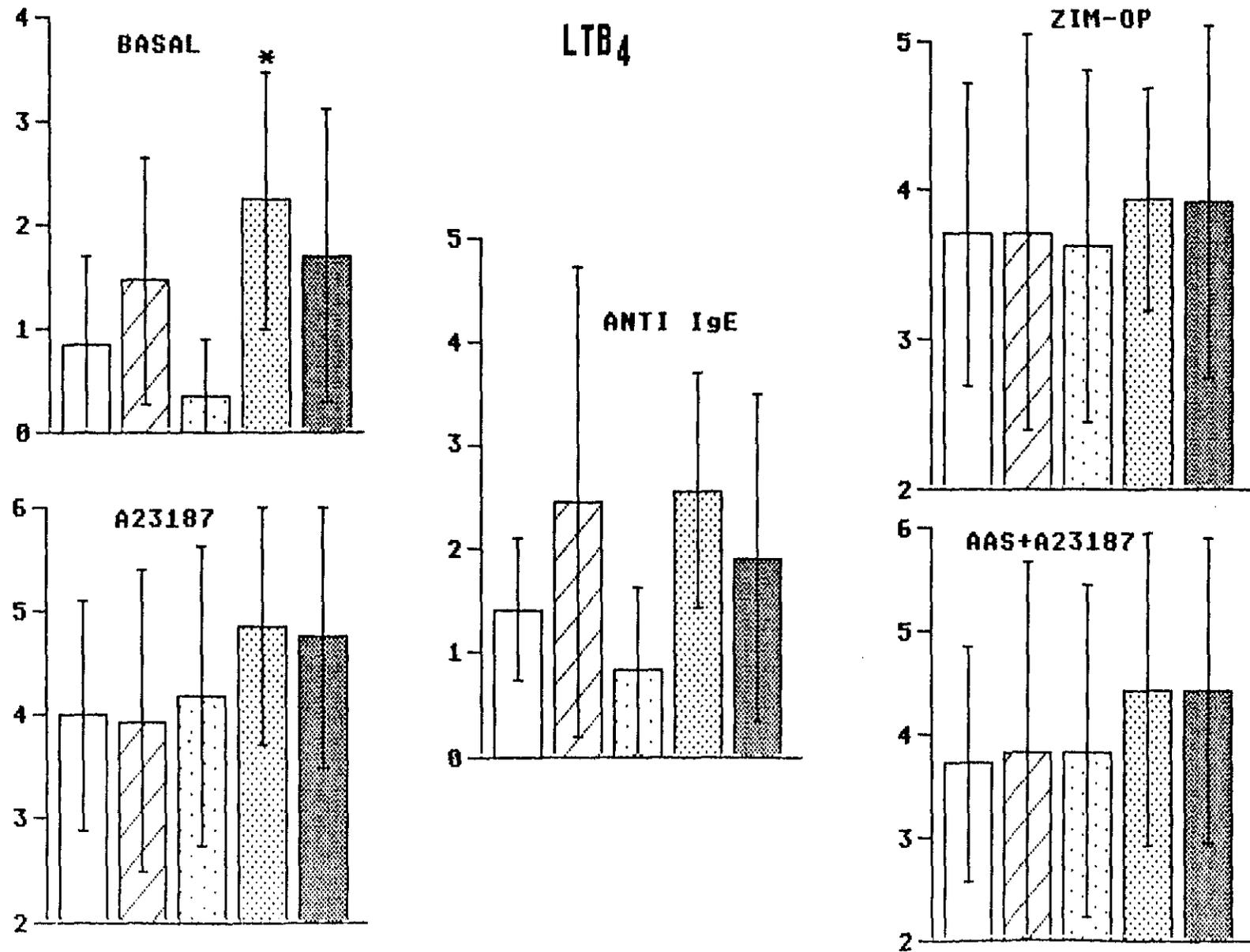


FIG. 46.- PRODUCCION DE LTB<sub>4</sub>. COMPARACION DEL GRUPO CONTROL A CON LOS GRUPOS B, C, D Y E TRAS LOS DISTINTOS ESTIMULOS.

□ A    ▨ B    ▩ C    ▤ D    ▦ E    \* = p < 0.05

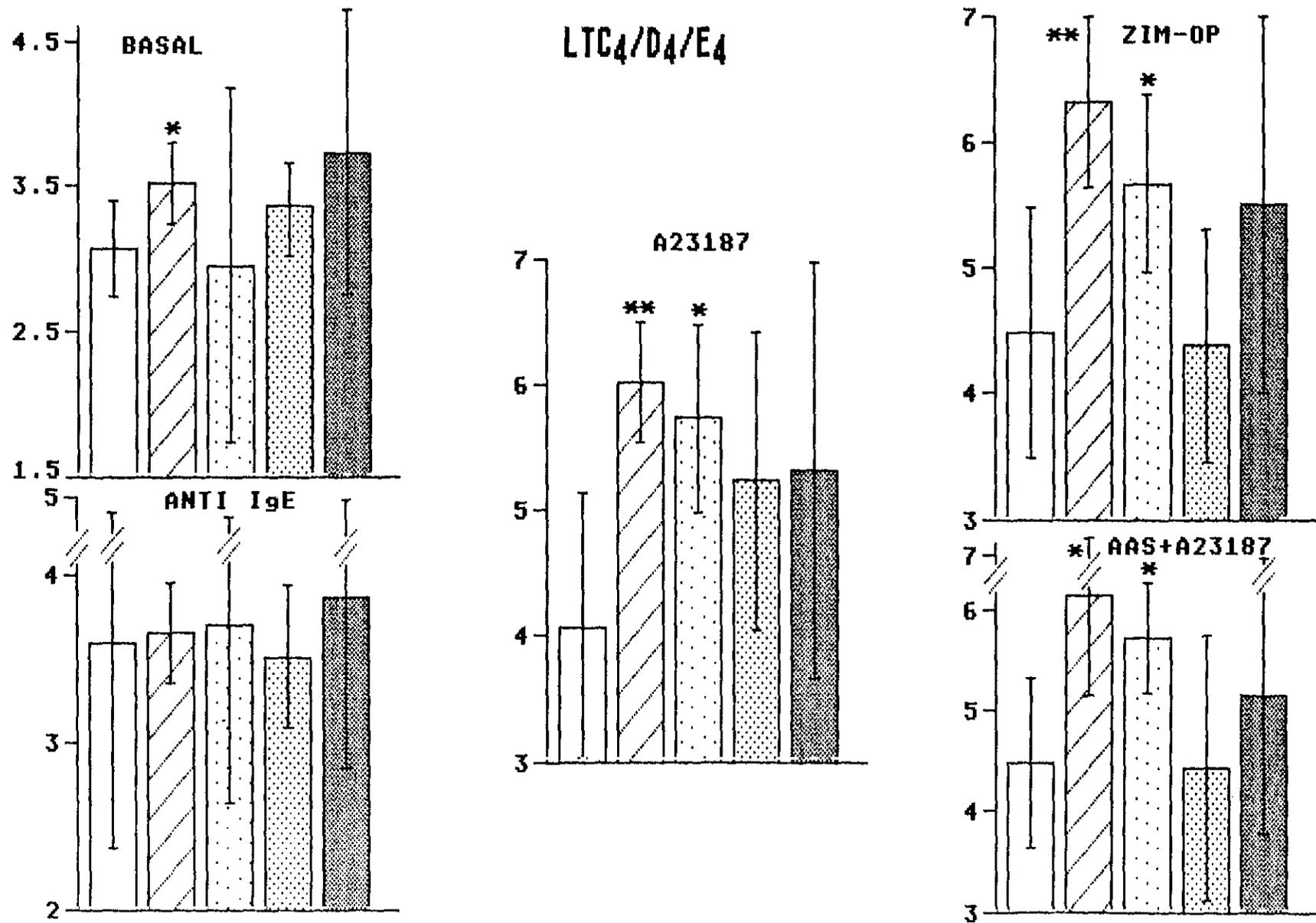


FIG. 47.- PRODUCCION DE LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>. COMPARACION DEL GRUPO CONTROL A CON LOS GRUPOS B, C, D Y E BASAL Y TRAS LOS DISTINTOS ESTIMULOS.

□ A    ▨ B    ▩ C    ▧ D    ▦ E    \* = p < 0.05    \*\* = p < 0.005

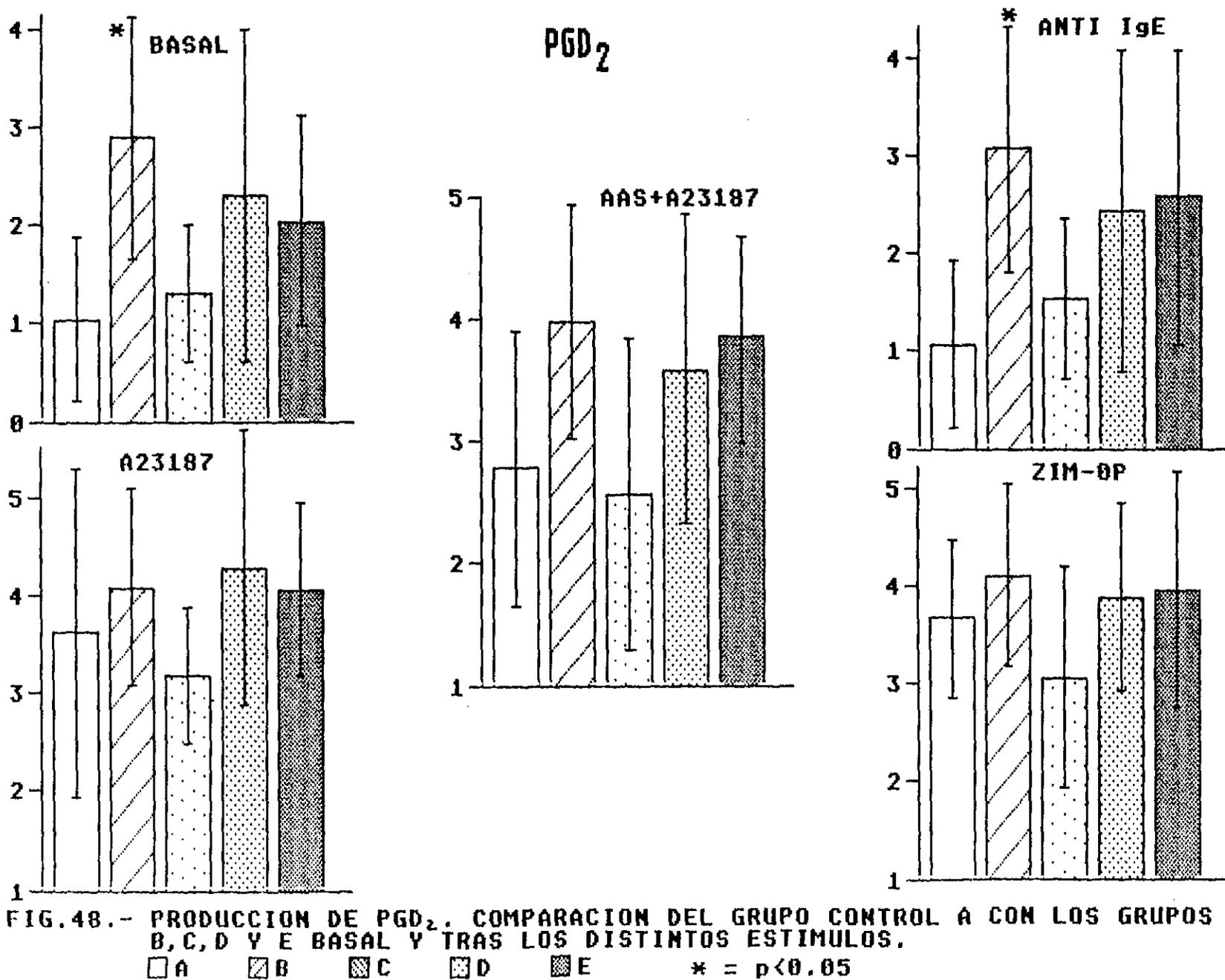


FIG.48.- PRODUCCION DE  $PGD_2$ . COMPARACION DEL GRUPO CONTROL A CON LOS GRUPOS B, C, D Y E BASAL Y TRAS LOS DISTINTOS ESTIMULOS.

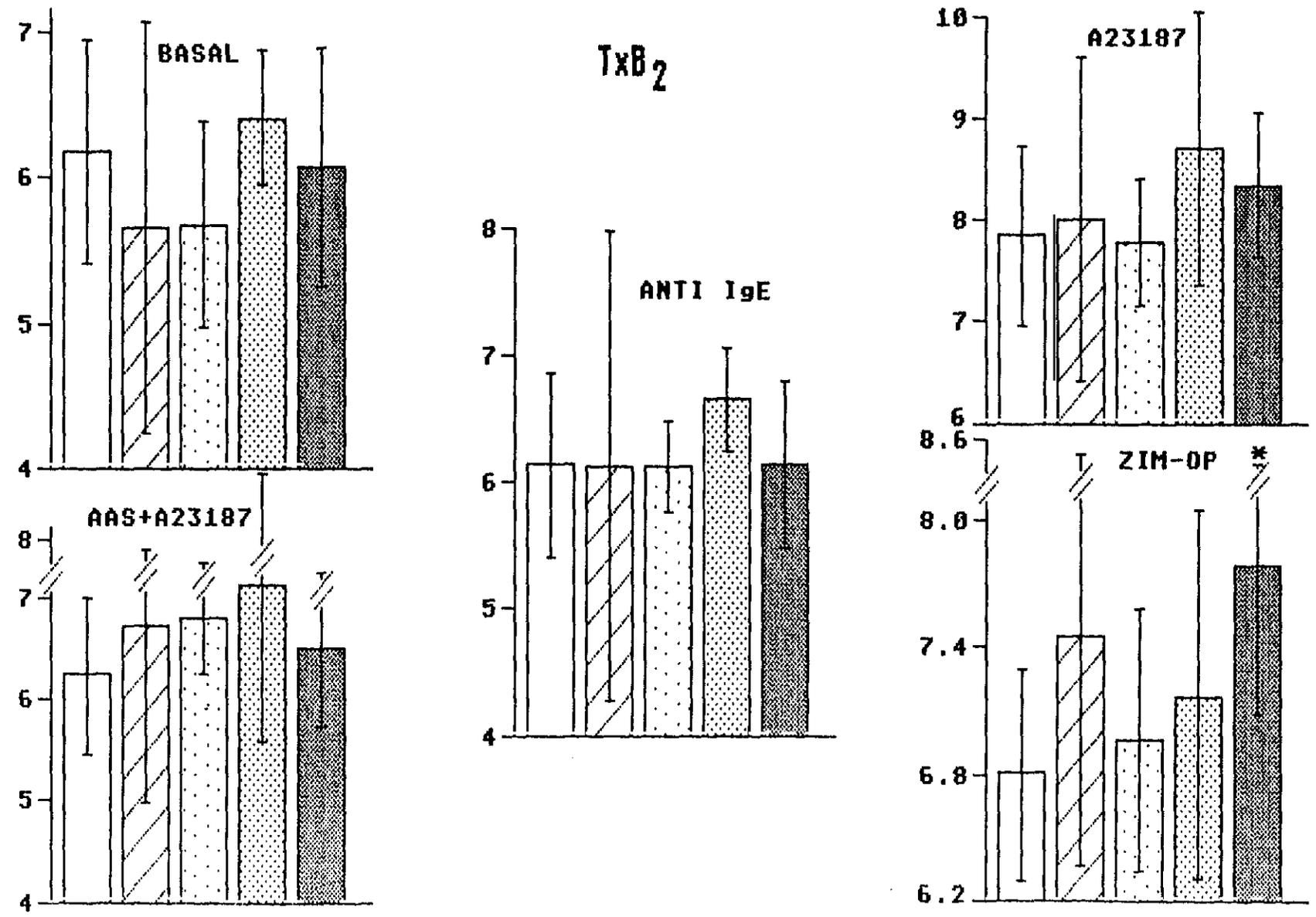


FIG.49.- PRODUCCION DE  $TxB_2$  COMPARACION DEL GRUPO CONTROL A CON LOS GRUPOS A, B, C, D Y E BASAL Y TRAS LOS DISTINTOS ESTIMULOS.  
 □ A   ▨ B   ▩ C   ▤ D   ▦ E   \* =  $p < 0.05$

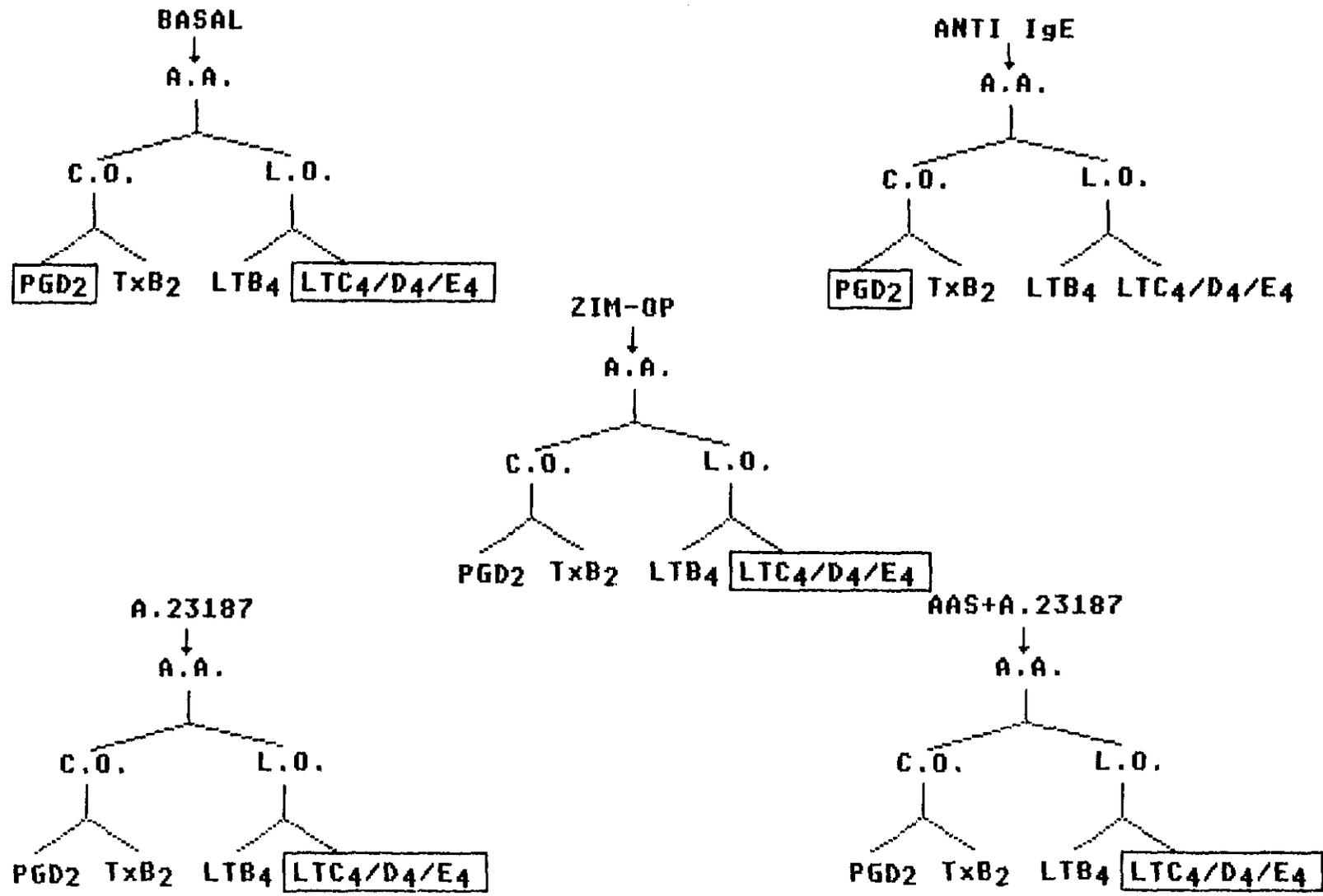


FIG.50.- COMPARACION DE LA PRODUCCION DE EICOSANOIDES ENTRE EL GRUPO A (CONTROLES SANOS) Y EL GRUPO B (ASMA POLINICO). EN RECUADRO, LOS QUE PRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.

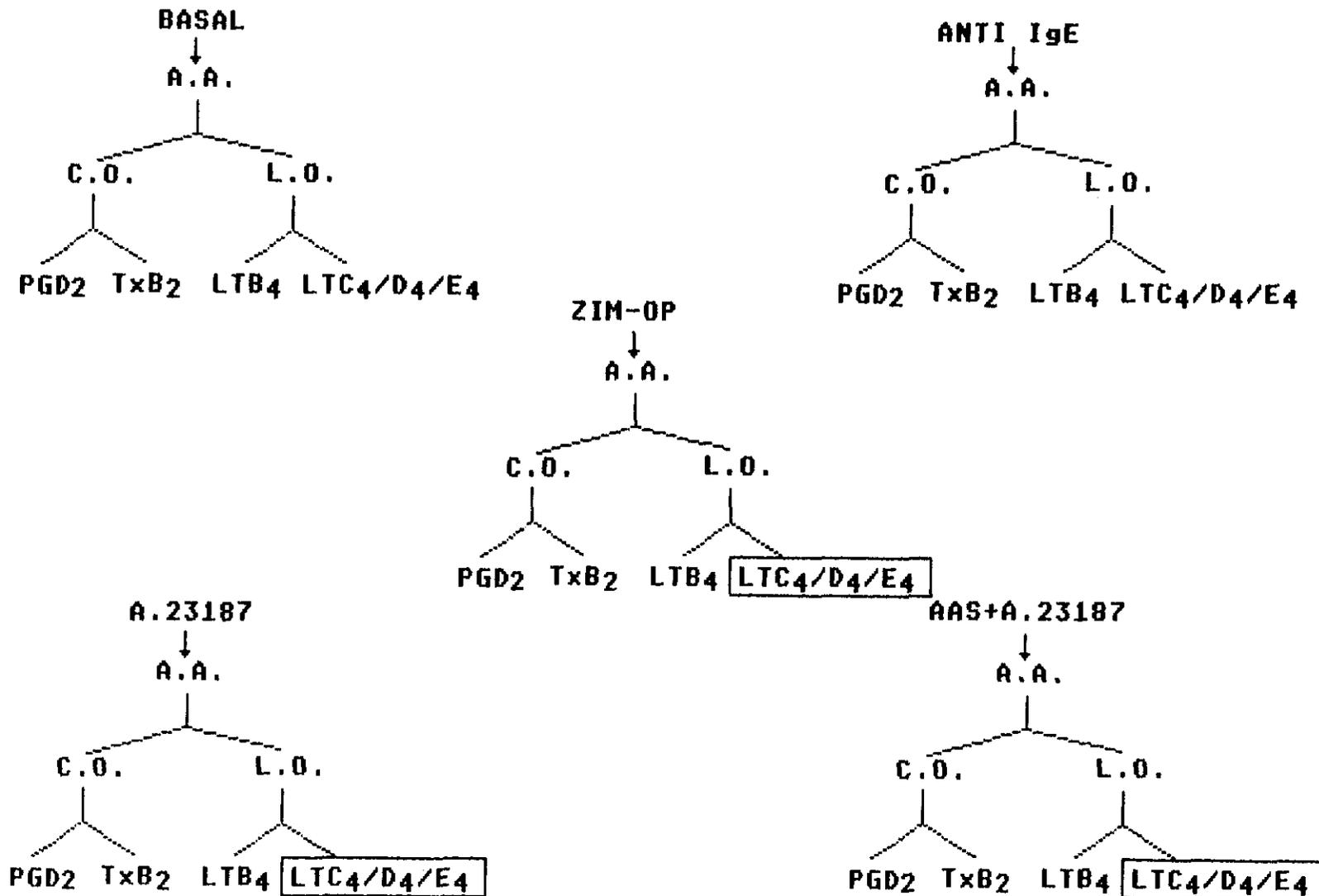


FIG.51.- COMPARACION DE LA PRODUCCION DE EICOSANOIDES ENTRE EL GRUPO A (CONTROLES SANOS) Y EL GRUPO C (ASMA INTRINSECO MODERADO). EN RECUADRO LOS QUE PRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.

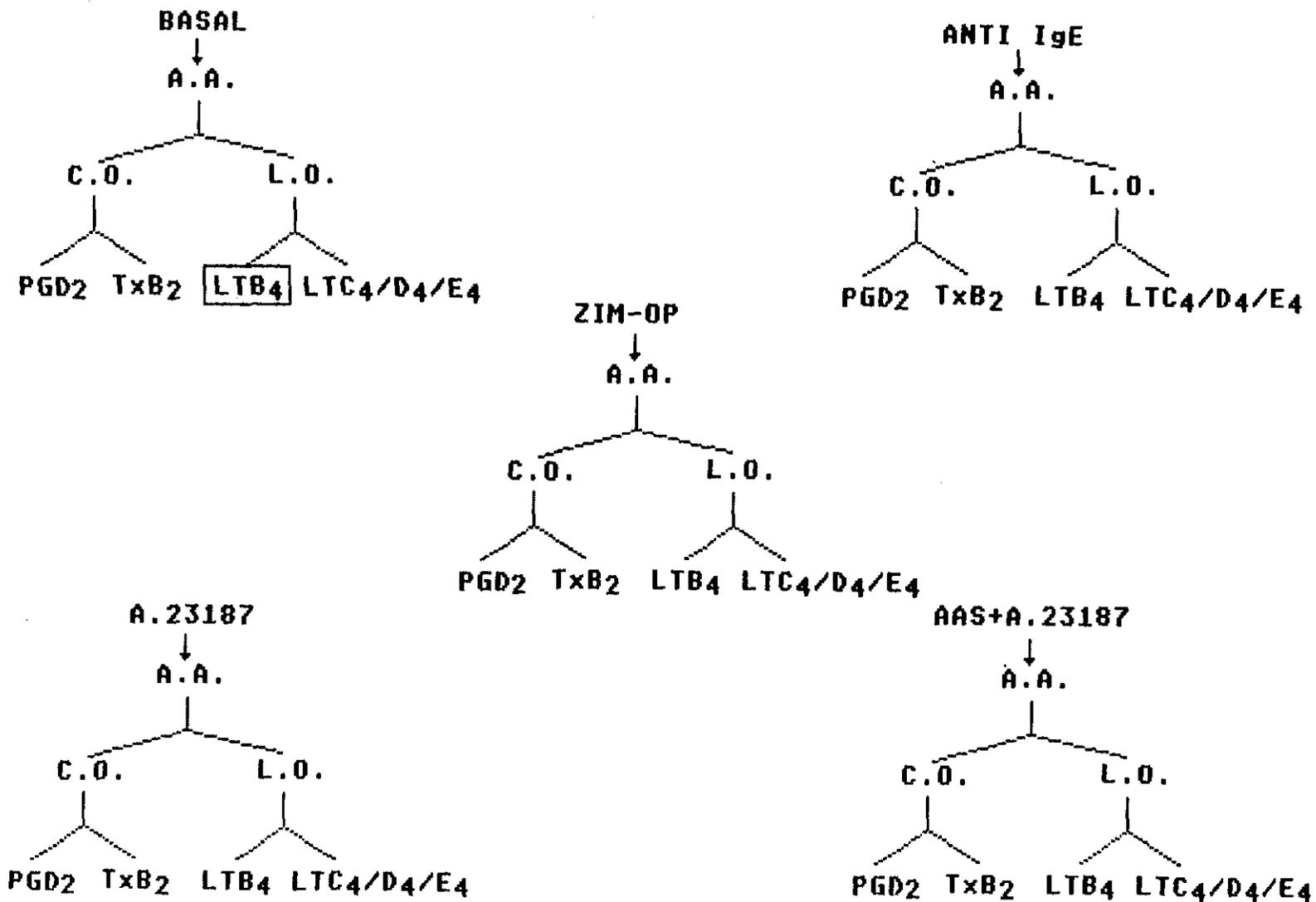


FIG. 52.- COMPARACION DE LA PRODUCCION DE EICOSANOIDES ENTRE EL GRUPO A (CONTROLES SANOS) Y EL GRUPO D (ASMA INTRINSECO SEVERO). EN RECUADRO LOS QUE PRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.

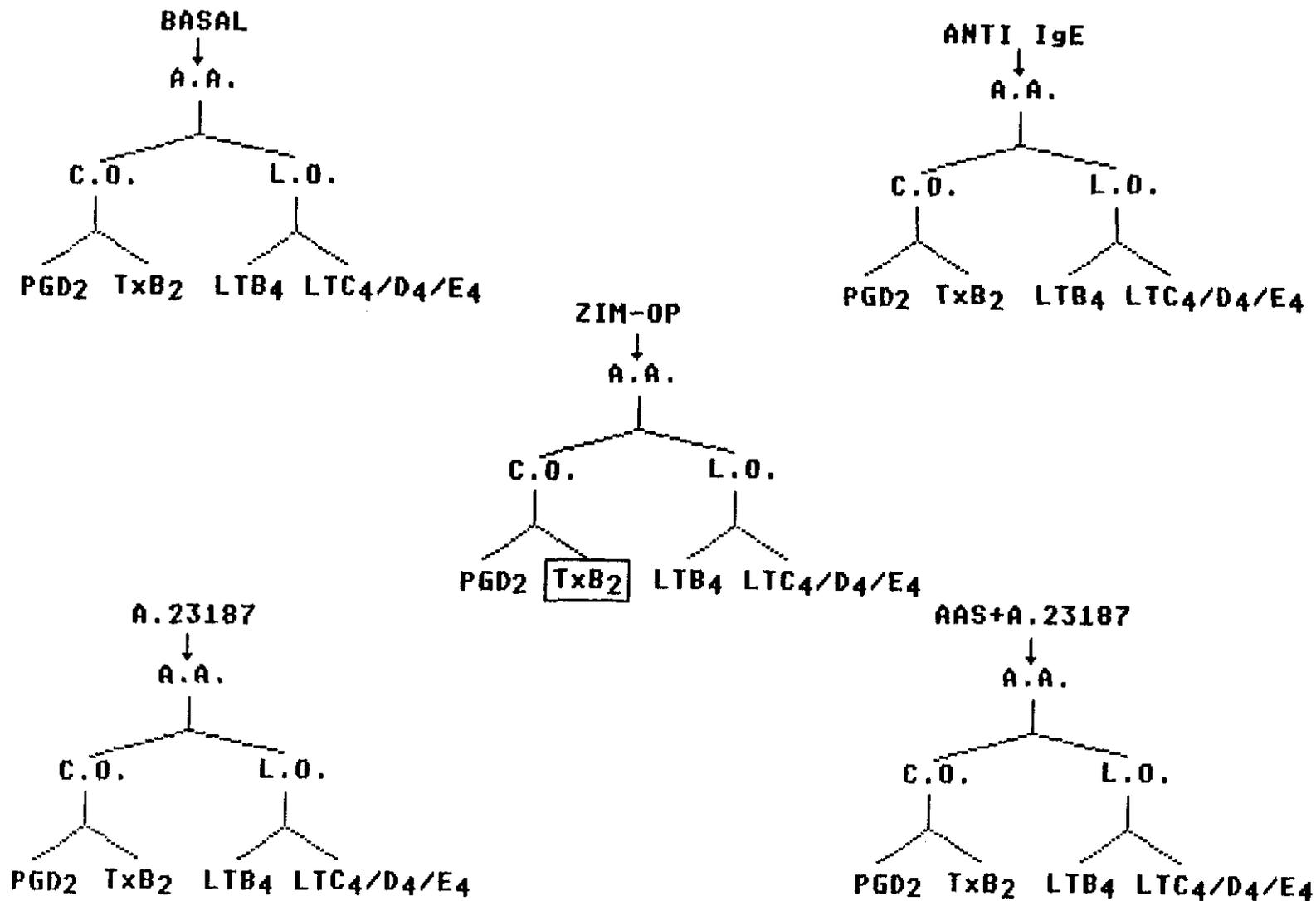


FIG.53.- COMPARACION DE LA PRODUCCION DE EICOSANOIDES ENTRE EL GRUPO A (CONTROLES SANOS) Y EL GRUPO E (ASMA INTRINSECO CON INTOLERANCIA A A.I.N.E.). EN RECUADRO LOS QUE PRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.

**XII.- TABLAS**

## HISTAMINA

1. PREFORMADO EN MASTOCITOS Y BASOFILOS

2. ANTAGONISTAS H<sub>1</sub>:

- DIFENHIDRAMINA
- CLORFENIRAMINA

3. ANTAGONISTAS H<sub>2</sub>:

- CIMETIDINA
- RANITIDINA

4. PARTICIPA EN:

- ANAFILAXIS
- ASMA
- URTICARIA
- RINITIS.

## EFECTOS POSIBLES

- CONTRAE MUSCULO LISO (H<sub>1</sub>), BRONCODILATADOR (H<sub>2</sub>)
- ↑ PERMEABILIDAD VASCULAR (H<sub>1</sub> Y H<sub>2</sub>)
- ↑ GMP (H<sub>1</sub>), ↑AMP (H<sub>2</sub>)
- GENERA PROSTAGLANDINAS (H<sub>1</sub>)
- VASOCONSTRICCIÓN PULMONAR (H<sub>1</sub>)
- ↑ PRODUCCIÓN DE MOCO NASAL (H<sub>1</sub>)
- DETERIORA LA FUNCIÓN DEL NODO A-V (H<sub>1</sub>), RITMOS IDIOVENTRICULARES (H<sub>2</sub>) ↓ UMBRAL PARA FIBRILACIÓN VENTRICULAR (H<sub>1</sub> Y H<sub>2</sub>)
- ↑ SECRECIÓN GÁSTRICA DE CLORHÍDRICO (H<sub>2</sub>)
- ↑ PRODUCCIÓN DE MOCO BRONQUIAL (H<sub>2</sub>)
- ESTIMULA LINFOCITOS SUPRESORES (H<sub>2</sub>)
- AUTOINHIBE SU LIBERACIÓN (H<sub>2</sub>)
- PRURITO (H<sub>1</sub> Y H<sub>2</sub>)
- VASODILATACIÓN (H<sub>1</sub> Y H<sub>2</sub>)

---

## (PAF) AGEPC

ACETIL-GLICERIL-FOSFORIL-COLINA  
FACTOR ACTIVADOR DE LAS PLAQUETAS  
1. GENERADO EN MACROFAGOS, NEUTROFILOS, EOSINOFILOS Y MASTOCITOS

- AGREGANTE PLAQUETARIO Y SECUESTrador DE PLAQUETAS EN TEJIDOS
- GENERADOR DE TxA<sub>2</sub> Y LIBERADOR DE AMINAS PLAQUETARIAS
- ↑ PERMEABILIDAD VASCULAR
- VASOCONSTRICCIÓN Y VASODEPRESOR
- BRONCOCONSTRICCIÓN
- PRODUCE NEUTROPENIA, BASOPENIA Y TROMBOPENIA

## LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>

METABOLITOS DEL ACIDO ARAQUIDONICO  
VIA LIPOOXIGENASA, SUSTANCIA DE RE-  
ACCION LENTA DE LA ANAFILAXIA (SRS-A)

1. GENERADOS EN MASTOCITOS, NEUTRO-  
FILOS, EOSINOFILOS Y MACROFAGOS
2. LOS CORTICOSTEROIDES FRENAN SU  
PRODUCCION
3. PARTICIPAN EN:
  - ANAFILAXIS
  - ¿ASMA?

- CONTRAEN MUSCULO LISO
- ↑ PERMEABILIDAD VASCULAR,  
↓ FLUJO SANGUINEO PERIFERICO
- GENERAN PROSTAGLANDINAS
- DEPRESION CARDIOVASCULAR
- VASOCONSTRICION CORONARIA
- ↑ PRODUCCION BRONQUIAL DE MOCO
- INHIBEN "IN VITRO" LA RESPUESTA  
DE LINFOCITOS A MITOGENOS

---

## PGD<sub>2</sub>

PROSTAGLANDINA D<sub>2</sub>

1. GENERADA EN MASTOCITOS
2. INHIBEN SU FORMACION EL AAS  
Y LOS ANTIINFLAMATORIOS NO  
ESTEROIDEOS
3. PARTICIPA EN:
  - MASTOCITOS
  - RINITIS

- ↑ AMP<sub>c</sub>
- CONTRAE EL MUSCULO LISO
- ↑ PERMEABILIDAD VASCULAR

---

FACTOR GENERADOR DE PROSTAGLANDINAS  
PEPTIDO DE BAJO P<sub>m</sub> (1.450 )

1. ¿GENERADO EN MASTOCITOS?

INDUCE LA PRODUCCION DE  
PGF<sub>2α</sub> Y TXB<sub>2</sub>

## TRIPTASA

1. PREFORMADA EN MASTOCITOS
2. PARTICIPA EN MASTOCITOSIS

- GENERA  $C3\alpha$
  - PROTEOLISIS
  - DEGRADA EL QUININOGENO
- 

## KALICREINA Y ACTIVADOR DE PRECALICREINA

1. ORIGINADOS EN BASOFILOS
2. ¿PARTICIPAN EN ANAFILAXIS?

- GENERA QUININAS
  - ACTIVAN PRECALICREINA
- 

## ACTIVADOR FACTOR HAGEMAN

1. ORIGINADO EN BASOFILOS

- ACTIVA EL FACTOR XII DE LA COAGULACION
- 

## CICLOPEROXIDASA Y SUPEROXIDO DISMUTASA

1. PREFORMADAS EN MASTOCITOS

- DEGRADAN LOS ANIONES PEROXIDO Y SUPEROXIDO, RESPECTIVAMENTE
- 

## HIDROLASAS LISOSOMICAS

1. PREFORMADAS EN MASTOCITOS

- $\beta$ -GLUCURONIDASA  $\rightarrow$  FRAGMENTA GLUCURONIDO
  - $\beta$ -HEXOSAMINIDASA  $\rightarrow$  FRAGMENTA HEXOSAMINASA
  - ARYLSULFATASA  $\rightarrow$  FRAGMENTA ESTERES SULFATO
- 

## MISCELANEA

- TOSIL-ARGININA-METILESTER-ESTERASA (TAME)
-

## ECF

FACTOR QUIMIOTACTICO DE EOSINO-  
FILOS (OLIGOPEPTIDOS)

1. DOS PRODUCTOS PREFORMADOS  
AMBOS POR MASTOCITOS:
  - ALTO P<sub>m</sub> (2.000)
  - BAJO P<sub>m</sub> (500)
2. LOS CORTICOSTEROIDES BLOQUEAN  
SU EFECTO
3. PARTICIPAN EN:
  - URTICARIA FISICA
  - ASMA

## EFFECTOS POSIBLES

- ATRACCION E INACTIVACION DE  
EOSINOFILOS
- ↑ RECEPTORES DEL EOSINOFILO  
PARA EL COMPLEMENTO
- ALTERACION DE LEUCOCITOS MO-  
NONUCLEARES

---

## NCF-HMW

FACTOR QUIMIOTACTICO DE NEUTROFILOS  
PROTEINA P<sub>m</sub> = 600.000

1. PREFORMADO EN MASTOCITOS
2. LOS CORTICOSTEROIDES BLOQUEAN  
SU EFECTO: LAS TEOFILINAS, β-  
ADRENERGICOS Y CROMOGLICATO IN-  
HIBEN SU LIBERACION
3. PARTICIPA EN:
  - URTICARIA
  - ASMA

- ATRAE E INACTIVA NEUTROFI-  
LOS

---

TABLA III.- MEDIADORES QUIMIOTACTICOS

## HISTAMINA

1. PREFORMADA EN MASTOCITOS

2. PARTICIPA EN:

- ANAFILAXIS
- ASMA
- URTICARIA
- RINITIS

- ATRACCION DE EOSINOFILOS Y NEUTROFILOS (H<sub>1</sub>)

- INHIBICION DE LA QUIMIOTAXIS Y LA MIGRACION DE EOSINOFILOS Y NEUTROFILOS (H<sub>2</sub>)

---

## PAF-AGEPC

ACETIL-GLICERIL-FOSFORIL-COLINA

FACTOR ACTIVADOR PLAQUETARIO

1. GENERADO POR DIVERSAS CELULAS

- POTENTE QUIMIOTACTICO PARA EOSINOFILOS INDUCIENDO LIBERACION DE PBM

- FAVORECE LA QUIMIOTAXIS DEL NEUTROFILO, SU LIBERACION ENZIMATICA Y METABOLISMO OXIDATIVO

---

## HHT

ACIDO HIDROXI-HEPTADECA-TRIENOICO (METABOLITO DEL ACIDO ARAQUIDONICO VIA CICLOOXIGENASA)

1. GENERADO POR DIVERSAS CELULAS

2. EL AAS Y LOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS FRENAN SU PRODUCCION

- FAVORECE LA QUIMIOTAXIS DE NEUTROFILOS Y EOSINOFILOS

---

## HETE

ACIDO HIDROXI-EICOSA-TETRA-ENOICO  
(METABOLITO DEL ACIDO ARAQUIDONICO  
VIA LIPOOXIGENASA)

- FAVORECE LA QUIMIOTAXIS DE  
NEUTROFILOS Y EOSINOFILOS

1. GENERADO EN DIVERSAS CELULAS
  2. ¿LOS CORTICOIDES FRENAN SU  
PRODUCCION?
- 

## LTB<sub>4</sub>

LEUCOTRIENO B<sub>4</sub>  
(METABOLITO DEL ACIDO ARAQUIDONICO  
VIA LIPOOXIGENASA)

- FAVORECE LA QUIMIOTAXIS DE  
NEUTROFILOS Y EOSINOFILOS  
  
- ↑ LA LIBERACION DE GRANULOS  
DEL NEUTROFILO Y SU METABO-  
LISMO OXIDATIVO

1. GENERADO POR UNA SUBCLASE DE MAS-  
TOCITOS
  2. ¿LOS CORTICOIDES FRENAN SU PRO-  
DUCCION?
-

BRONCOESPASMO	HISTAMINA H <sub>1</sub> LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub> PGD <sub>2</sub> TxA <sub>2</sub> AGEPC BRADIKININA
EDEMA DE MUCOSA	HISTAMINA H <sub>1</sub> LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub> PGE AGEPC (PAF) BRADIKININA
INFILTRACION CELULAR	ECF-A MCF IF-A HETE LTB <sub>4</sub> AGEPC (PAF)
SECRECION MUCOSA	HISTAMINA (H <sub>2</sub> ) PG HETE LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub> MMS PGF <sub>2</sub> α LTB <sub>4</sub>
DESCAMACION	O <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , OH ENZIMAS PROTEOLITICAS
ENGROSAMIENTO MEMBRANA BASAL	O <sub>2</sub> ENZIMAS PROTEOLITICAS

TABLA IV.- MEDIADORES IMPLICADOS EN LA PATOGENESIS DEL ASMA HUMANA



AINES (INTOLERANCIA)

FEM/FEV1 basal:

		FEM/FEV1
- <u>PARACETAMOL</u>	125 mgrs (1/4)	
(Termalgin)	250 mgrs (1/2)	
	500 mgrs (1)	
	1000 mgrs (2)	
- <u>ISONIXINA</u>	50 mgrs (1/4)	
(NIXYM)	100 mgrs (1/2)	
	200 mgrs (1)	
- <u>GLAFENINA</u>	50 mgrs (1/4)	
(Glifanan)	100 mgrs (1/2)	
	200 mgrs (1)	
- <u>AC. MEFENAMICO</u>	62 mgrs (1/4)	
(Coslán)	125 mgrs (1/2)	
	250 mgrs (1)	
- <u>TOLMETIN</u>	50 mgrs (1/4)	
(Minocil)	100 mgrs (1/2)	
	200 mgrs (1)	

**TABLA V.- PROTOCOLO DIAGNOSTICO DE INTOLERANCIA A A.I.N.E.**



TEJIDO O CELS.HUMANAS	CICLOOXIGENASA	LIPDOOXIGENASA
POLIPOS NASALES	PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2</sub>	LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub> , 15-HETE
PARENQUIMA PULMONAR	6-CETO-PGF <sub>1</sub> , PGD <sub>2</sub> , PGF <sub>2</sub> TxB <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub>	LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub> , 15, 12, 11, 5-HETE LTB <sub>4</sub>
VIAS AEREAS	6-CETO-PGF <sub>1</sub> , PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2</sub> PGD <sub>2</sub> , TxB <sub>2</sub>	5, 11, 15, 12-HETE
MASTOCITOS	PGD <sub>2</sub> , TxB <sub>2</sub> , 6-CETO-PGF <sub>1</sub>	LTC <sub>4</sub> , 5-HETE
MACROFAGOS ALVEOLARES	TxB <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> 6-CETO-PGF <sub>1</sub>	LTD <sub>4</sub> , LTB <sub>4</sub>
MONOCITOS	TxB <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2</sub> 6-CETO-PGF <sub>1</sub>	LTB <sub>4</sub> , LTC <sub>4</sub> , 5-HETE
PLAQUETAS	TxB <sub>2</sub> , PGD <sub>2</sub>	12-HETE
BASOFILOS	—	LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub> , 5-HETE
EOSINOFILOS	—	LTC <sub>4</sub> , LTB <sub>4</sub> , 15-HETE
NEUTROFILOS	TxB <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2</sub>	LTB <sub>4</sub> , 11, 5, 12-HETE
T LINFOCITOS	TxB <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub>	LTB <sub>4</sub> , 11, 15, 5-HETE

TABLA VI.- EICOSANOIDES ENCONTRADOS EN TEJIDOS Y CELULAS HUMANAS

PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, Tx, PGD<sub>2</sub>?

LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>, AC.5-HIDROXIEICOSATETRAENOICO

PAF

FACTOR/ES ACTIVADOR DE EOSINOFILOS

SECRETAGOGO DE MOCO DERIVADO DE MACROFAGOS

FACTOR/ES LIBERADOR DE HISTAMINA

ANION SUPEROXIDO

β-GLUCURONIDASA

PROTEASAS NEUTRAS

TABLA VII.- FACTORES LIBERADOS POR MACROFAGOS Y MONOCITOS QUE  
PUEDEN INFLUIR EN EL ASMA

PGE<sub>2</sub>

DILATACION E INCREMENTO DE LA PERMEABILIDAD DE LOS MICROVASOS; BRONCO-DILATACION; SUPRESION DE LA FUNCION DE LINFOCITOS Y PMN; INICIACION DE LIBERACION DE LH; CONDICIONA LAS NEURONAS AFERENTES.

PGD<sub>2</sub>

BRONCOCONSTRICCIÓN

PGD<sub>2</sub>/I<sub>2</sub>

DILATACION E INCREMENTO DE LA PERMEABILIDAD DE LOS MICROVASOS; SUPRESION DE LA FUNCION DE LOS LEUCOCITOS.

PGI<sub>2</sub>

SUPRESION DE ADHERENCIA Y AGREGACION DE PLAQUETAS; VASODILATACION PULMONAR.

PGF<sub>2α</sub>

BRONCOCONSTRICCIÓN; CONTRACCION DE LOS MICROVASOS Y DE LOS VASOS PULMONARES.

TxA<sub>2</sub>

BRONCOCONSTRICCIÓN; CONTRACCION DE LOS MICROVASOS; ESTIMULACION DE LA ADHERENCIA Y AGREGACION DE PLAQUETAS; INCREMENTO DE LA ADHERENCIA DE LOS PMN.

### LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>

CONTRACCION DE MUSCULO LISO; BRONCOCONSTRICCIÓN; ESTIMULACION DE LA SE-  
CRECION DE MOCO EN LAS VIAS AEREAS; ESTIMULACION DE LA SECRECION DE ELEC-  
TROLITOS EN LAS VIAS AEREAS; DILATACION DE LOS MICROVASOS E INCREMENTO DE  
SU PERMEABILIDAD; CONTRACCION DE LAS ARTERIAS CORONARIAS Y CEREBRALES; DE-  
PRESION DE LA CONTRACTIBILIDAD DEL MIOCARDIO; ESTIMULACION DE LA SECRECION  
ACIDA Y GASTRICA.

### LTE<sub>4</sub>

INDUCCION DE HIPERRREACTIVIDAD BRONQUIAL.

### LTC<sub>4</sub>

INICIACION DE LIBERACION DE LH.

### LTB<sub>4</sub>

PRODUCCION DE QUIMIOTAXIS Y ACTIVACION DE LEUCOCITOS; ESTIMULACION DE LA  
SECRECION DE MOCO EN LAS VIAS AEREAS; AUMENTO DE ADHERENCIA DE LEUCOCITOS  
AL ENDOTELIO; SUPRESION DE LA FUNCION DE LINFOCITOS T; INCREMENTO DE LA AC-  
TIVIDAD DE LAS CELULAS N.K.; ESTIMULACION EN LA PROLIFERACION DE QUERATOCI-  
TOS.

8-15-diHETE

CONDICIONA LAS NEURONAS AFERENTES.

14,15-diHETE

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE LAS CELULAS NK.

5,14,15-triHETE

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE LAS CELULAS NK.

15-HPETE

SUPRESION DE LA FUNCION DE LOS LINFOCITOS Y DE RECEPTORES Fc.

ENFERMEDAD NATURAL O MODELO	FLUIDO BIOLÓGICO	EICOSANOIDES
RINITIS: PROVOCACIÓN CON ANTIGENO	SECRECIÓN NASAL	PGD <sub>2</sub> , LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub>
RINITIS: PROVOCACIÓN CON AIRE SECO	SECRECIÓN NASAL	PGD <sub>2</sub> , LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub>
CONJUNTIVITIS: PROVO- CACION CON ANTIGENO	LAGRIMAS	LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub>
PROVOCACIÓN CUTÁNEA CON ANTIGENO	EXUDADO	LTC <sub>4</sub> , LTB <sub>4</sub> , 15-HETE
ASMA	ESPUTO	LTC <sub>4</sub> , LTB <sub>4</sub>
ASMA	SANGRE	LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> ?

TABLA X.- EICOSANODES ENCONTRADOS EN ENFERMEDADES ALÉRGICAS HUMANAS

**GRUPO A: SANOS**

<b>PACIENTE</b>	<b>EDAD</b>	<b>SEXO</b>	<b>TRATAMIENTO</b>	<b>FEVI</b>
<b>1</b>	<b>45</b>	<b>M</b>	<b>—</b>	<b>90%</b>
<b>2</b>	<b>30</b>	<b>V</b>	<b>—</b>	<b>118%</b>
<b>3</b>	<b>27</b>	<b>V</b>	<b>—</b>	<b>86%</b>
<b>4</b>	<b>27</b>	<b>V</b>	<b>—</b>	<b>80%</b>
<b>5</b>	<b>28</b>	<b>M</b>	<b>—</b>	<b>106%</b>
<b>6</b>	<b>44</b>	<b>M</b>	<b>—</b>	<b>101%</b>

**TABLA XI.- CARACTERISTICAS CLINICAS**

GRUPO B: POLINICOS

Nº	EDAD	SEXO	AÑOS EVOL.	TRATAMIENTO				IgE	EOSINOFILOS		FEU <sub>1</sub>
				TEOF.	β2	C.I.	C.S.		EXUD	SANGRE	
1	22	M	4	—	—	—	—	230	<10%	3%	98%
2	23	M	7	—	—	—	—	302	<10%	7%	101%
3	25	U	3	—	—	—	—	223	<10%	2%	85%
4	18	U	4	—	—	—	—	325	<10%	4%	102%
5	23	M	3	—	—	—	—	435	<10%	6%	94%
6	23	M	8	—	—	—	—	143	<10%	2%	101%

TABLA XII.- CARACTERISTICAS CLINICAS

GRUPO C : ASMA MODERADO

Nº	EDAD	SEXO	AÑOS EVOL.	TRATAMIENTO				IgE	EOSINOFILOS		FEU <sub>1</sub>
				TEOF.	β2	C.I.	C.S.		EXUD	SANGRE	
1	46	M	23	+	+	+	-	160	<10%	4%	74%
2	41	M	11	+	+	+	-	27	<10%	3%	94%
3	40	M	9	+	+	+	-	302	10%	9%	85%
4	45	V	5	+	+	-	-	178	<10%	5%	87%
5	45	M	10	+	+	+	-	150	<10%	6%	60%
6	41	M	2	+	+	+	-	53.7	<10%	5%	63%

TABLA XIII.- CARACTERISTICAS CLINICAS

GRUPO D: ASMA SEVERO

Nº	EDAD	SEXO	AÑOS EVOL.	TRATAMIENTO				IgE	EOSINOFILOS		FEV <sub>1</sub>
				TEOF.	β2	C.I.	C.S.		EXUD	SANGRE	
1	59	M	18	+	+	+	+	1	<10%	<4%	56%
2	60	V	13	+	+	+	+	151	10%	10%	78%
3	38	V	5	+	+	+	+	193	30%	5%	86%
4	43	M	25	+	+	+	+	26	20%	5%	56%
5	42	M	8	+	+	+	+	67	20%	8%	63%
6	56	M	15	+	+	+	+	14	<10%	13%	59%

TABLA XIV.- CARACTERISTICAS CLINICAS

GRUPO E: INTOLERANTES AAS

Nº	EDAD	SEXO	AÑOS EVOL.	TRATAMIENTO				IgE	EOSINOFILOS		FEV <sub>1</sub>
				TEOF.	β2	C.I.	C.S.		EXUD	SANGRE	
1	59	M	27	+	+	+	-	65	<10%	12%	64%
2	41	M	6	-	-	+	-	74	30%	7%	92%
3	48	M	17	+	+	+	+	93	60%	17%	31%
4	62	M	3	+	+	+	+	53	30%	13%	103%
5	51	M	17	+	+	+	-	25	<10%	8%	127%
6	53	M	8	-	-	+	-	115	<10%	10%	88%

NASALES

TABLA XV.- CARACTERISTICAS CLINICAS

GRUPO E

<u>Nº</u>	<u>POSITIVOS</u>	<u>NEGATIVOS</u>
1	AAS, PIRAZOLONAS, GLAFENINA	DEXTROPOXIFENO, PARACETAMOL
2	AAS, INDOMETACINA	DEXTROPOXIFENO, PARACETAMOL, GLAFENINA
3	AAS, INDOMETACINA	PARACETAMOL
4	AAS, GLAFENINA, AC.MEFENAMICO	PARACETAMOL, DEXTROPOXIFENO
5	AAS, IBUPROFEN	PARACETAMOL, DEXTROP., GLAFE., AC.MEF.
6	AAS, PIRAZOLONAS, INDOMETACINA	PARACETAMOL, DEXTROPOXIFENO

TABLA XVI.- PROVOCACIONES CON A.I.N.E. EN PACIENTES DEL GRUPO E

ESTIMULO	dpm		% LIBERADO
	CELS. 50 $\mu$ l	SOB. 50 $\mu$ l	
BLANCO	100.555	6.367	6.3
IONOF.-Ca	89.380	25.329	28.3
ZIM-OP.	59.245	14.077	23.7

TABLA XVII.- COMPROBACION DE LA CAPACIDAD DE LOS MONOCITOS PARA LIBERAR EICOSANOIDES

PACIENTE	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO D	GRUPO E
1	7.2	3.0	12.0	7.7	4.3
2	4.2	4.2	7.0	4.6	3.4
3	6.0	3.8	3.9	4.8	6.3
4	4.4	4.4	6.2	4.2	5.5
5	4.5	3.6	5.6	4.2	5.5
6	10.0	5.7	12.8	3.8	6.5

TABLA XVIII.- N<sup>o</sup> DE CELULAS SEMBRADAS POR POCILLO X 10<sup>6</sup>

EICOSANOIDE	PACIENTE N°	BASAL	ANTI-IgE	ZIM-OP	IONOF	AAS+IONOF	FEV1
LTB <sub>4</sub>	1	2.5	2.2	34.6	18.0	17.3	90%
	2	8.0	7.0	30.0	18.0	61.0	118%
	3	IND	1.6	10.0	80.0	13.0	86%
	4	IND	3.6	140.0	181.8	30.0	80%
	5	5.0	8.0	129.0	200.0	311.0	106%
	6	1.6	7.0	25.0	30.0	40.0	101%
LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub>	1	18.0	16.6	83.0	29.0	55.0	90%
	2	28.0	49.0	61.0	35.0	89.0	118%
	3	21.0	18.0	23.0	36.0	63.0	86%
	4	29.0	32.0	181.0	127.0	68.0	80%
	5	27.0	350.0	400.0	350.0	488.0	106%
	6	12.0	14.0	60.0	25.0	48.0	101%
PGD <sub>2</sub>	1	4.5	4.5	41.6	12.4	34.8	90%
	2	6.3	7.4	164.0	9.7	91.0	118%
	3	3.0	3.0	26.0	11.0	7.0	86%
	4	IND	IND	18.0	52.0	6.0	80%
	5	IND	IND	55.0	60.0	22.0	106%
	6	6.0	5.6	21.0	780.0	5.8	101%
TxB <sub>2</sub>	1	105.0	111.0	900.0	644.0	144.0	90%
	2	793.0	758.0	1103.0	5122.0	310.0	118%
	3	793.0	413.0	1206.0	1310.0	931.0	86%
	4	638.0	574.0	340.0	6380.0	570.0	80%
	5	577.0	688.0	888.0	2444.0	800.0	106%
	6	500.0	700.0	1400.0	4200.0	1000.0	101%

TABLA XIX.- NIVELES DE EICOSANOIDES OBTENIDOS EN EL GRUPO A (pg/10<sup>6</sup>cels/ml)  
IND= INDETERMINADO

EICOSANOIDE	PACIENTE N°	BASAL	ANTI-IgE	ZIM-OP	IONOF	AAS+IONOF	FEU1
LTB <sub>4</sub>	1	IND	IND	273.0	160.0	466.0	98%
	2	3.8	3.8	5.7	5.9	4.0	101%
	3	36.8	36.8	55.2	71.0	39.4	85%
	4	4.0	4.5	19.3	34.0	20.4	102%
	5	4.4	6.9	31.9	22.2	17.2	94%
	6	2.8	6.1	94.7	350.0	350.0	101%
LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub>	1	41.6	41.6	1566.0	900.0	2166.0	98%
	2	26.6	30.0	207.0	221.0	128.0	101%
	3	52.6	65.7	789.0	328.0	421.0	85%
	4	31.8	34.0	454.0	340.0	777.0	102%
	5	33.3	38.8	444.0	416.0	222.0	94%
	6	26.3	29.8	543.3	526.3	526.3	101%
PGD <sub>2</sub>	1	13.0	10.6	50.0	53.3	41.6	98%
	2	7.8	11.1	11.6	11.6	11.6	101%
	3	210.0	194.0	147.0	236.0	215.0	85%
	4	10.9	10.6	52.2	43.1	43.1	102%
	5	15.0	47.2	138.8	105.5	83.3	94%
	6	9.8	8.4	80.7	75.0	63.1	101%
TxB <sub>2</sub>	1	366.0	1000.0	3466.0	5600.0	2533.0	98%
	2	20.0	11.9	380.0	119.0	309.0	101%
	3	789.0	2105.0	4736.0	6710.0	921.0	85%
	4	270.0	636.0	1045.0	3636.0	818.0	102%
	5	1111.0	1055.0	5000.0	8333.0	3333.0	94%
	6	298.0	526.0	771.0	5263.0	157.0	101%

TABLA XX.- NIVELES DE EICOSANOIDES OBTENIDOS EN EL GRUPO B (pg/10<sup>6</sup>cels/ml)  
IND= INDETERMINADO

EICOSANOIDE	PACIENTE N°	BASAL	ANTI-IgE	ZIM-OP	IONOF	AAS+IONOF	FEU1
LTB <sub>4</sub>	1	IND	IND	35.8	166.0	83.3	74%
	2	IND	IND	285.0	285.0	257.0	94%
	3	IND	8.7	71.7	84.6	64.1	85%
	4	2.9	2.9	11.2	7.2	4.0	87%
	5	2.8	2.8	15.3	17.8	11.0	60%
	6	IND	2.0	22.9	156.2	156.2	63%
LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub>	1	116.6	108.3	250.0	666.6	350.0	74%
	2	37.4	171.4	857.0	757.0	571.0	94%
	3	3.1	8.9	307.0	358.0	435.0	85%
	4	17.7	35.4	290.0	201.6	193.5	87%
	5	23.2	26.7	321.4	223.2	375.0	60%
	6	9.7	27.3	93.7	109.3	132.8	63%
PGD <sub>2</sub>	1	4.1	5.1	15.0	22.5	14.1	74%
	2	7.1	7.0	30.0	57.0	30.7	94%
	3	IND	IND	158.0	41.0	66.0	85%
	4	4.8	5.0	5.6	10.6	7.7	87%
	5	5.5	11.6	14.2	11.6	1.6	60%
	6	3.3	4.8	17.1	33.5	14.0	63%
TxB <sub>2</sub>	1	166.6	316.6	666.6	3666.6	833.0	74%
	2	174.0	319.0	2571.0	5719.0	1771.0	94%
	3	307.0	589.0	512.0	1230.0	420.0	85%
	4	225.0	354.0	709.0	2064.0	612.0	87%
	5	1125.0	732.0	1535.0	1178.0	920.0	60%
	6	257.0	546.0	1406.0	2969.0	1562.0	63%

TABLA XXI.- NIVELES DE EICOSANOIDES OBTENIDOS EN EL GRUPO C (pg/10<sup>6</sup>cells/ml)  
IND= INDETERMINADO

EICOSANOIDE	PACIENTE N°	BASAL	ANTI-IgE	ZIM-OP	IONOF	AAS+IONOF	FEV1
LTB <sub>4</sub>	1	15.5	16.8	59.1	25.9	15.5	56%
	2	6.5	7.6	14.3	86.0	39.1	78%
	3	5.2	4.1	37.0	54.0	17.7	86%
	4	3.8	7.3	66.6	357.0	357.0	56%
	5	3.8	11.9	69.0	476.0	404.0	63%
	6	92.1	105.2	131.5	226.3	231.5	59%
LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub>	1	19.4	20.7	20.7	22.0	22.0	56%
	2	28.0	28.0	76.0	239.0	27.0	78%
	3	37.5	41.6	114.0	625.0	729.0	86%
	4	23.0	26.0	107.0	119.0	71.4	56%
	5	26.0	30.9	42.0	297.6	59.5	63%
	6	52.6	68.4	315.0	368.0	184.0	59%
PGD <sub>2</sub>	1	IND	IND	22.7	11.6	12.3	56%
	2	6.7	6.5	10.8	17.3	6.7	78%
	3	6.4	7.0	104.0	62.5	45.8	86%
	4	7.3	11.9	66.6	261.9	107.1	56%
	5	18.5	29.7	54.7	176.1	29.7	63%
	6	178.0	136.0	136.0	289.0	184.0	59%
TxB <sub>2</sub>	1	453.0	386.0	1813.0	6000.0	133.0	56%
	2	347.0	560.0	782.0	1869.0	521.0	78%
	3	541.0	937.0	312.0	916.0	2666.0	86%
	4	592.0	952.0	1285.0	28571.0	12380.0	56%
	5	714.0	952.0	3571.0	21428.0	1619.0	63%
	6	1368.0	1157.0	2336.0	7849.0	947.0	59%

TABLA XXII.- NIVELES DE EICOSANOIDES OBTENIDOS EN EL GRUPO D (pg/10<sup>6</sup> cels/ml)  
IND= INDETERMINADO

EICOSANOIDE	PACIENTE N°	BASAL	ANTI-IgE	ZIM-OP	IONOF	AAS+IONOF	FEV1
LTB <sub>4</sub>	1	IND	IND	44.1	97.6	79.0	64%
	2	4.7	4.7	441.0	588.0	264.0	92%
	3	12.6	11.1	22.2	33.3	15.8	31%
	4	2.9	2.9	15.4	23.6	12.7	103%
	5	2.9	5.6	38.0	167.0	272.0	127%
	6	56.9	109.0	64.6	307.0	307.0	88%
LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub>	1	302.0	372.0	465.0	697.0	488.0	64%
	2	36.7	36.7	2352.0	1911.0	970.0	92%
	3	26.9	28.5	79.3	31.7	25.3	31%
	4	30.0	29.0	89.0	34.0	90.0	103%
	5	21.8	29.0	581.0	363.6	327.2	127%
	6	30.0	35.0	49.0	138.0	76.0	88%
PGD <sub>2</sub>	1	IND	IND	139.0	100.0	65.0	64%
	2	11.7	94.1	323.0	235.0	226.0	92%
	3	7.6	7.4	19.8	25.3	34.9	31%
	4	9.4	17.2	12.7	41.8	45.4	103%
	5	22.7	27.2	40.0	67.2	23.6	127%
	6	10.7	15.3	46.1	24.6	20.0	88%
TxB <sub>2</sub>	1	111.0	232.0	1627.0	3023.0	348.0	64%
	2	264.0	705.0	6470.0	8823.0	2647.0	92%
	3	428.0	269.0	1904.0	1174.0	539.0	31%
	4	581.0	363.0	1454.0	5454.0	436.0	103%
	5	872.0	1381.0	5090.0	5454.0	909.0	127%
	6	984.0	461.0	1230.0	5538.0	430.0	88%

TABLA XXIII.- NIVELES DE EICOSANOIDES OBTENIDOS EN EL GRUPO E (pg/10<sup>6</sup>cels/ml)  
IND= INDETERMINADO

GRUPO	ANTI IgE	ZIM-OP	IONOFORO
A	—	LTB <sub>4</sub> -LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub> PGD <sub>2</sub>	TODOS
B	LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub>	TODOS	TODOS
C	LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub>	LTB <sub>4</sub> -LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub> TxB <sub>2</sub>	TODOS
D	LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub>	LTB <sub>4</sub> -LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub> PGD <sub>2</sub>	TODOS
E	—	TODOS	LTB <sub>4</sub> -PGD <sub>2</sub> -TxB <sub>2</sub>

TABLA XXIV.- INCREMENTO EN LA PRODUCCION DE EICOSANOIDES RESPECTO A LA BASAL EN LOS DIFERENTES GRUPOS, TRAS LOS ESTIMULOS EMPLEADOS. SOLAMENTE SE SEÑALAN AQUELLOS EN LOS SE HAN ENCONTRADO DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.

GRUPO	LTB <sub>4</sub>	LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub>	PGD <sub>2</sub>	TxB <sub>2</sub>
A	NS	NS	NS	p < 0.05
B	NS	NS	p < 0.05	NS
C	p < 0.05	NS	NS	p < 0.05
D	NS	NS	p < 0.05	NS
E	NS	NS	NS	p < 0.05

TABLA XXV.- RESUMEN DE LA SIGNIFICACION ESTADISTICA DE LA PRODUCCION DE EICOSANOIDES TRAS EL ESTIMULO CON IONOFORO DE CALCIO Y AAS+IONOFORO DE CALCIO EN LOS DISTINTOS GRUPOS.

**XIII.- BIBLIOGRAFIA**

1.- American Thoracic Society Comitee on Diagnostic Standard for Nontuberculous Diseases: "Definitions and classification of chronic bronchitis, asthma and pulmonary enphysema".Am. Rev. Respir. Dis., 1962, 85: 762.

2.- Normam P.S.:Informe no publicado de la Allergy Foundation of America. Citado en Reed C. E., y Townley R.G.:"Asthma: classification and pathogenesis". En: Allergy, principles and practice, cap. 38, 2º vol..Edit. por Middleton E., Reed C.E., Ellis E.. Mosby Co. 1983

3.- Reed C.E., Townley R.G.:Asthma: classification and pathogenesis. En: Allergy, principles and practice, cap. 38, 2º vol..Edit. por Middleton E., Reed C.E., Ellis E.. Mosby Co. 1983.

4.- Kaliner M.A.: Mast cell derivated mediators and bronchial asthma. En Hargreave F.E. ed.: Airway reactivity. Mississange, Ontario, Canada. Astra Pharmaceuticals Canada Ltd. 1985.

5.- Cooke R.A.: Studies in specific hypersensitiveness.IX. On the phenomenon of hyposensitization (the clinical lessened sensitiveness of Allergy. J. Immunol. 1922, 7: 219.

6.- Atkins P., Green R.G., Zweiman B.: Histologic studies of human skin test responses to ragweed, compound 48/80, and histamine. J. Allergy Clin. Immunol. 1973, 51: 263.

7.- Ishizaka T., White J.R., Saito H.: Activation of basophils

and mast cells for mediator release. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1987, 82; 327.

8.- Levine B.B., Redmon A.P.: The nature of the antigen-antibody complexes initiating the specific wheal and flare reaction in sensitized man. *J. Clin. Invest.* 1968, 47: 556.

9.- Ishizaka T.,: Mechanisms of IgE-mediated hypersensitivity. Cap. 5 en: *Allergy, principles and practice*. Edit. por Middleton E., Reed C.E., Ellis E., Adkinson N.F., Yunginger J.W.. Ed. C.V. Mosby Company. St Louis. 1988.

10.-Ishizaka T., Conrad D.H., Schulman E.S., et all.: Biochemical analysis of initial triggering events of IgE-mediated histamine release from human lung mast cells. *J.Immunol.* 1983, 130: 2357.

11.-Ishizaka T., Conrad D.H., Huff T.F., et al: Unique features of human basophilic granulocytes developed in in vitro culture. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1985, 77: 137.

12.-Ishizaka T., Hirata F., Sterk A.R., et al.: Bridging of IgE receptors activates phospholipid methylation and adenylate cyclase in mast cell plasma membrane. *Proc. Natl, Acad. Sci. USA.* 1981, 78: 612.

13.-Lichtenstein L.M., Margolis S.: Histamine release in vitro: inhibition by catecholamines and methylxantines. *Science* 1968, 161; 902.

14.-Johnson A.R., Moran N.C.: Inhibition of the release of histamine from rat mast cells: the effect of cold and adrenergic drugs on release of histamine by compound 48/80 and antigen. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1970, 174: 632.

15.- Gozalo Reques F.: Hipersensibilidad inmediata. Bases celulares y mediadores químicos. Cap. V en Pregrado en Alergología. Ed. Senent Sanchez C.J., Gozalo Reques F.. Edit. Luzán 5 Madrid 1985.

16.-Bhat N.K., Arroyave C., Matney R.S., et al.: Plasma histamine changes during provoked bronchoesasm in asthmatic patients. J. Allergy Clin. Immunol. 1976, 58: 647.

17.-Atkins P.C., Bedard P.M., Zweiman B., et al.: Increased antigen induced local and systemic mediator release in rhinitic subjects whit pulmonary symptoms in the pollen season. J. Allergy Clin. Immunol. 1984, 73: 341.

18.-Atkins P.C., Norman M., Weiner H., Zweiman B.: Release of neutrophil chemotactic activity during immediate hypersensitivity reactions in humans. Ann. Int. Med. 1977, 86: 415.

19.-Shaw R.J., Anderson S.D., Durham R.S., et al.: Mediators of hypersensitivity and fog-induced asthma. Allergy 1985, 40: 48.

20.-Papageorgiri N., Carroll M., Durham S.R., Lee T.H., Walsh

G.M., Kay A.B.: Complement receptor enhancement as evidence of neutrophil activation after exercise-induced asthma. *Lancet* 1983, 2: 1220.

21.-Hollingsworth H.M., Dowing E.T., Bramas S.S., et al.: Identification and characterization of neutrophil chemotactic activity in aspirin induced asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1984, 130: 373.

22.-Atkins P.C., Norman M., Zweiman B., et al.: Further characterization and biologic activity of ragweed antigen-induced neutrophil chemotactic activity in man. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1979, 64: 251.

23.-Carroll M.P., Durham R.S., Walsh G., Kay A.B.: Activation of neutrophils and monocytes after allergen and histamine-induced bronchoconstriction. *J. Allergy Clin Immunol.* 1985, 75: 290.

24.-Nakamura I., Morita Y., Kuriyana M., et al.: Platelet-activating factor in late asthma response. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1987, 82: 57.

25.-Morley J., Page C., Sanjar S.: Pharmacology of the late response to allergen and its relevance to asthma prophylaxis. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1985, 77: 73.

26.-Atkins P.C., Norman M., Zweiman B.: Antigen-induced neutrophil chemotactic activity in man. *J. Allergy Clin. Immunol.*

1978, 62: 149.

27.-Nagy L., Lee T.H., Kay A.B.: Neutrophil chemotactic activity in antigen-induced late asthmatic reactions. N. Engl. J. Med. 1982, 306: 497.

28.-Gleich G.J.: The late phase of the immunoglobulin E-mediated reaction: a link between anaphylaxis and common allergic disease ?. J. Allergy Clin. Immunol. 1982, 70:160.

29.-Solley G.D., Gleich G.J., Jordon R.E., et al,: The late phase of the immediate wheal and flare skin reaction: its dependence on IgE antibodies. J. Clin. Invest. 1976, 58: 408.

30.-Kay A.B., Stechschulte D.J., Austen K.F.:An eosinophil leukocyte chemotactic factor of anaphilaxis. J. Exp. Med. 1971, 133: 602.

31.-Goetzl E.J., Austen K.F.: Purification and syntesis of eosinphilotactic tetrapeptides of human lung tissue: identification as eosinophil chemotactic factor of anaphilaxix. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1975, 72: 4123.

32.-Oertel H.L., Kaliner M.: The biological activity of mast cell granules. III. Purification of inflammatory factors of anaphilaxis (IF-A), responsable for causing late phase reactions. J. Immunol. 1981, 1127: 1398.

33.-Goetzl E.J.: Mediators of immediate hypersensitivity derived from arachidonic acid. *N. Engl. J. Med.* 1980, 303: 822.

34.-Booy-Noord H., Orie N.G.N., De Vries K.: Immediate and late bronchial obstructive reactions to inhalation of house dust and protective effects of disodium cromoglycate and prednisone. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1971, 48: 344.

35.-Flavahan N.A., Slifman N.R., Gleich G.J., Vanhoutte P.M.: Human eosinophil major basic protein causes hyperreactivity of respiratory smooth muscle: role of the epithelium. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988, 138: 685.

36.-Capron A., Dessaint J.P., Capron M., Basin H.: Specific IgE antibodies in immunoadherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature (London)* 1975, 253: 474.

37.-Malewicz F.M., Plummer J.M., Spiegelberg H.L.: Comparison of the Fc receptors for IgE on human lymphocytes and monocytes. *J. Immunol.* 1982, 129: 563.

38.-Spiegelberg H.L., Malewicz F.M.: Fc receptors specific for IgE on subpopulation of human lymphocytes and monocytes. *Clin. Immunol. Immunopath.* 1980, 15: 424.

39.-Capron M., Capron A., Desaint J.P., et al.: Fc receptors for IgE on human and rat eosinophils. *J. Immunol.* 1981, 126: 2087.

40.-Knauer K.A.: Platelet activation during antigen-induced airway reactions in asthmatic subjects. *N. Engl. J. Med.* 1979, 300: 213.

41.-Coleman J.W., Godfrey R.C.: The number and affinity of IgE receptors on dispersed human lung mast cells. *Immunology* 1981, 44: 859.

42.-Malveaux F.J., Conroy M.C., Adkinson N.F., Lichtenstein L.M.: IgE receptors on human basophil: relationship to serum IgE concentration. *J.Clin. Invest.* 1978, 62: 176.

43.-Enerbäck L.: Mast cell in rat gastrointestinal mucosa. I. Effects of fixation. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1966, 66: 289.

44.-Pearce F.L.: Functional heterogeneity of mast cell from different species and tissues. *Klin. Wschr.* 1982, 60: 954.

45,-Katz H.R., Stevens R.L., Austen K.F.: Heterogeneity of mammalian mast cells differentiated en vivo and in vitro. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1985, 76: 250.

46.-Fox C.C., Kagey-Sobotka A., Scheimer R.P., et al.: Mediator release from human basophils and mast cells from lung and intestinal mucosa. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1985, 77: 130.

47.-Bienenstock J., Befus D., Demburg J., et al.: Comparative aspects of mast cell heterogeneity in different species and sites. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1985,77:126.

48.-Leonard E.J., Skeel A.: Separation of human basophils into two fractions with different density and histamine content. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1985, 76; 556.

49.-Rouzer C.A., Scott W.A., Hamill A.L., Cohn Z.A.: Dynamics of leukotriene C production by macrophages. *J. Exp. Med.* 1980, 152: 1236.

50.-Weller P.F., Goetzl E.J., Austen K.F.: Identification of human eosinophil by lysophospholipase as the constituent of Charcot-Leyden crystals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980, 77: 440.

51.-Weller P.F., Wasserman S.I., Austen K.F.: Selected enzymes preferentially present in the eosinophil. *En: The eosinophil in health and disease.* Ed. por Mahmoud A.A.F., y Austen K.F.. Grutne and Stratton. New York 115, 1981.

52.-Gleich G.J., Frigas E., Loegering D.A., et al.: Cytotoxic properties of eosinophil major basic protein. *J. Immunol.* 1979, 123: 2925.

53.-Filley W.V., Holley K.E., Kephart G.M., Gleich G.J.: Identification by immunofluorescence of eosinophil granule major

basic protein in lung tissues of patients with bronchial asthma. Lancet 1982, 2:11.

54.-Dahl R., Venge P., Olsson I.: Variations of blood eosinophils and eosinophil cationic protein in serum in patients with bronchial asthma: studies inhalation challenge test. Allergy 1978, 33: 211.

55.-Weller P.F., Lee C.W., Foster D.W., et al.: Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotrienes by human eosinophil: predominant production of leukotriene C<sub>4</sub>. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1983, 80: 7626.

56.-Perelmutter L.: IgG<sub>4</sub> and the immune system. Clin. Rev. Allerg. 1983, 1: 269.

57.-Richerson H.B., Metzger W.J., Hunninghate G.W.: Experimental models of bronchial asthma in man and the rabbit. Cap. 3 en Asthma, clinical pharmacology and therapeutic progress. Ed. por Kay A.B.. Blackwell Scientific Publications 1986.

58.-Flint C.K., Hudspith B.N., Leung K.B.P., et al.: Bronchoalveolar mast cells in extrinsic asthma. Clin. Sci. 1985, 68: 33.

59.-Fowler A.A.III, Schwartz L.B.: Macrophage-derived chemotactic factors and allergic asthma. J. Allergy Clin. Immunol. 1984, 74: 777.

60.-Patterson R., Tomita Y., Oh S.H., et al.: Respiratory mast cells and basophiloid cells.I. Evidence that they are secreted into bronchial lumen: morphology, degranulation, and histamine release. Clin. Exp. Immunol. 1974, 16: 223.

61.-Vanhoutte P.M.: Epithelium-derived relaxing factor(s) and bronchial reactivity. Am. Rev. Respir. Dis. 1988, 138: S 24.

62.-McIntosh K., Ellis E.F., Hoffman L.S., et al.: The association of viral and bacterial respiratory infections with exacerbations of wheezing in young asthmatic children. J. Pediatr. 1973, 82: 578.

63.-Minor T.E., Dick E.C., De Meo A.N., et al.: Viruses as precipitants of asthmatic attacks in children. JAMA 1974, 227: 8.

64.-Minor T.E., Dick E.C., Baker J.W., et al.: Rhinoviruses and influenza A infections as precipitants of asthma. Am. Rev. Respir. Dis. 1976, 113: 149.

65.-Hudgel D.W., Angston E.Jr., Selner J.C., McIntosh K.: Viral and bacterial infections in adults with chronic asthma. Am. Rev. Respir. Dis. 1979, 120: 393.

66.-Rubio Sotés M<sup>a</sup>., Gozalo Reques F., Colás Sanz C,: Asma bronquial. fisiopatología. Cap. 4 en Tratado de alergología e

inmunologia clinica; tomo III .Ed. po la S.E.A e I.C..Ed. Luzán  
5. Madrid 1986.

67.-Pickens J.J., Niewoehner D.E., Chester E.H.: Prolonged effect  
of viral infections of the respiratory tract upon small airway.  
Am. J. Med. 1972, 52: 738.

68.-Hall W.J., Douglas R.G.Jr., Hyde R.W., Roth K.F. et al.:  
Pulmonary mechanics after uncomplicated influenza A infections.  
Am. Rev. Respir. Dis. 1976, 113: 141.

69.-Empey D.W., Laitinen L.A., Jacobs L., et al.: Mechanisms of  
bronchial hyperreactivity in normal subjects after upper  
respiratory tract infection. Am. Rev. Respir. Dis. 1976, 113:  
131.

70.-Hall W.J., Hail C.B., Speers D.M.: Respiratory syncytial  
virus infection in adults: clinical, virologic, and serial  
pulmonary function studies. Ann. Intern. Med. 1978, 88: 203.

71.-Weliver R.C., Wong D.T., Sun M. et al.: The development of  
respiratory syncytial virus specific IgE and release of histamine  
in nasopharyngeal secretions after infection. N. Engl. J. Med.  
1981, 305: 841.

72.-Busse W.W., Anderson C.L., Dick E.C., Warshauer D.: Reduced  
granulocyte response to isoproterenol, histamine and  
prostaglandin E after in vitro incubation with rhinovirus 1G. Am.

Rev. Respir. Dis. 1980, 122: 641.

73.-Ida S., Hooks J.J., Siranganian R., Nothing A.L.: Enhancement of IgE-mediated histamin release from human basophil viruses: the role of interferon. J. Exp. Med. 1977, 145: 892.

74.-Let-Brow M.A., Aelvoer M., Hoohs J.J., et al.: Enhancement of basophil chemotaxis invitro by virud-induced interferon. J. Clin. Invest. 1891, 67:547.

75.-Szentivanyi A.:The beta-adrenergic theory of the atopic abnormality in bronchial asthma. J. Allergy 1968, 42: 203.

76.-Snapper J.R., Drazen J.M., Loting S.H., et al.: Analysis of beta-blokcade and morphometry in dogs wih varing responsiveness to aerosol histamine. Am. Rev. Respir. Dis. 1978, 117: 399.

77.-Mue S., Shibahara S., Suzuki S., et al.: Bronchial response to methacholine and histamine in monkeys with beta-adrenergig blockade. J. Allerfy Clin. Immunol. 1980, 65:338.

78.-Drazen J.M.: Pulmonary physiologic abnormalities in animal models of acute asthma. En Asthma: physiology, immunopharmacology, and treatment. Ed. po Lichtenstein L.M., Austen K.F.. Ed. Second International Symposium p. 249. Academic Press. New York. 1982.

79.-Parker C.W., Smith J.W.: Alterations in cyclic adenosine

monophosphate metabolism in human bronchial asthma. I. Leukocyte responsiveness to beta-adrenergic agents. *J. Clin. Invest.* 1973, 52: 48.

80.-Conolly M.E., Greenacre J.K.: The beta-adrenoceptor of human lymphocyte and human lung parenchima. *Br. J. Pharmacol.* 1977, 59:17.

81.-Morris H.G.: Drug-induced desensitization of beta adrenergic receptors. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1980, 65: 83.

82.-Kariman K., Lefkowitz R.J.: Decreased beta adrenergic receptor binding in lymphocytes from patients with bronchial asthma. *Clin. Research.* 1977, 25: 503.

83.-Brooks S.M., Mc Gowan K., Bernstein L., et al.: Relationship between numbers of beta adrenergic receptors in lymphocytes and disease severity in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1979, 63: 401.

84.-Galant S.P., Duriseti L., Underwood S., Insel P.A.: Beta-adrenergic receptors of polymorphonuclear particulates in bronchial asthma. *J. Clin. Invest.* 1980, 65: 577.

85.-Galant S.P., Duriseti L., Underwood S., Insel P.A.: Decreased beta-adrenergic receptors on polymorphonuclear leukocytes after adrenergic therapy. *New Engl. J. Med.* 1978, 299: 933.

86.-Harvey J.E., Tattersfield A.E.: Airway response to salbutamol: effect of regular salbutamol inhalations in normal, atopic and asthmatic subjects. Thorax 1982, 37: 280.

87.-Patterson J.W., Lulich K.M., Goldie R.G.: The role of adrenoceptors in bronchial hyperreactivity. En Perspective in asthma: bronchial hyperreactivity. Ed. por Morley, p.19. Academic Press. London 1982.

89.-Orehek J., Gayrard P., Grimaud C., Charpin J.: Effect of beta-adrenergic blockade on bronchial sensitivity to inhaled acetylcholine in normal subjects. J. Allergy Clin. Immunol. 1975, 55: 164.

90.- Frase C.M., Veuter J.C.: Autoantibodies to beta-adrenergic receptors and asthma. J. Allergy Clin. Immunol. 1975, 55: 164.

91.- Barnes P.J.: The third nervous system in the lung: physiology and clinical perspectives. Thorax 1984, 39: 561.

92.- Barnes P.J.: Neuropeptides in the airways: functional significance. Cap. 4 en: Asthma, clinical pharmacology and therapeutic progress. Ed. por Kay A.B. Edit. Blackwell Scientific Publications. Londres 1986.

93.- Polak J.M., Bloom S.R.: Regulatory peptides in the respiratory tract of man and others animals. Exp. Lung Res. 1982,3: 313.

- 94.- Umdem B.J., Dick E.C., Buckner C.K.: Inhibition by vasoactive intestinal peptide of antigen-induced histamin release from guinea pig minced lung. Eur. J. Pharmacol. 1983, 88: 247.
- 95.- Dey R.D., Shannon W.A., Said S.L.: Localization of VIP-immunoreactive nerves in airways and pulmonary vessels of dog, cats, and human subjects. Cell Tissue Res. 1981, 220: 231.
- 96.- Frandsen E.K., Krishna G.A., Said S.I.: Vasoactive intestinal polipeptide promotes cyclic adenosine 3',5' monophosphate accumulation in guinea pig trachea. Br. J. Pharmacol. 1978, 62:367.
- 97.- Cox C.P., Lerner M.R., Wells J.H., Said S.I.: Inhaled vasoactive intestinal peptide (VIP) prevents bronchoconstriction induced by inhaled histamine. Am. Rev. Respir. Dis. 1983, 127: 249.
- 98.- Diamond L., Szarek J.L., Gillespie M.N., Altieri R.J.: In vivo bronchodilator activity of vasoactive intestinal peptide in the cat. Am. Rev. Respir. Dis. 1983, 128: 829.
- 99.- Barnes P.J., Dixon C.M.S.: The effect of inhaled vasoactive intestinal peptide on bronchial reactivity to histamine in man. Am. Rev. Respir. Dis. 1984, 130: 162.
- 100.-Morice A., Unwen R.J., Sever P.S.: Vasoactive inestinal

peptide causes bronchodilatation and protects against histamine-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects. *Lancet* 1983, 2: 1225.

101.-Morice A.H.: The role of vasoactive intestinal peptide (VIP) in asthma. Cap. 8 en: *Asthma, clinical pharmacology and therapeutic progress*. Ed. por Kay A.B.. Edit. Blackwell Scientific Publications. Londres 1986.

102.-Lundberg J.M., Saria A., Brodin E., et al.: A substance P antagonist inhibits vagally induced increase in vascular permeability and bronchial smooth muscle contraction in the guinea-pig. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983, 80: 1120.

103.-Weiss E.B., Viswanath S.G.: Calcium hypersensitivity in airway smooth muscle: isometric tension responses following anaphylaxis. *Respiration* 1979, 38: 266.

104.-Middleton E.Jr.: Calcium antagonist and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1985, 76: 341.

105.-Creese B.R., Bach M.K.: Hyperreactivity of airway smooth muscle produced in vitro by leukotrienes. *Prostaglandin, Leukotrienes and Med.* 1983, 11: 160.

106.-Brugman T.M., Darnell M.C., Hirshman C.A.: Nifedipine aerosol attenuates airway constriction in dogs with hyperreactive airways. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1983, 127: 14.

107.-Carrina J., Denjeau A., Alexander G., et al.: Inhibition of exercise-induced asthma by a calcium antagonist, nifedipine. Am. Rev. Respir. Dis. 1980, 123: 156.

108.-Henderson A.F., Heaton R.W., Costello J.F.: Effect of nifedipine on bronchoconstriction induced by inhalation of cold air. Thorax 1983, 38: 512.

109.-Corris P.A., Natiman S., Gilson G.J.: Nifedipine in the prevention of asthma induced by exercise and histamine. Am. Rev. Respir. Dis. 1983, 128: 991.

110.-Malik S., O'Reilly J., Sudlow M.F.: Effects of sublingual nifedipine on inhaled histamine and methacoline induced bronchoconstriction in atopic subjects. Thorax 1982, 32: 230.

111.-Popa V.T., Somani P., Simon V.: The effects of inhaled Verapamil on resting tone and reactivity to histamine and acetylcholine in normal or asthmatic subjects. Am. Rev. Respir. Dis. 1983, 127: 675.

112.-Patakas D., Vlachoianni E., Tsara V. et al.: Nifedipine in bronchial asthma. J. Allergy Clin. Immunol. 1983, 77: 269.

113.-Miadonna A., Tedeschi A., Leggieri E., et al.: Effect of Verapamil on allergen induced asthma in patients with respiratory allergy. Ann. Allergy 1983, 51: 201.

114.-Patel K.R., Kerr J.V.: Calcium antagonist in experimental asthma. Clin. Allergy 1982, 12: 15.

115.-Coffin D.L., Gardner D.E., Holzman R.S., Woolcock F.J.: Influence of ozone on pulmonary cells. Arch. Environ. Health 1968, 16: 633.

116.-Holzman M.J., Fabri L.M., O'Byrn P.M., et al.: Importance of airway inflammation for hyperresponsiveness induced by ozone. Am. Rev. Respir. Dis. 1983, 16: 633.

117.-Fabri L.M., Aizawa H., Alpert S.E.: Airway hyperresponsiveness and changes in cell count in bronchoalveolar lavage after ozone exposure in dogs. Am. Rev. Respir. Dis. 1984, 129: 288.

118.-Holzman M.J., Aizawa H., Nadel J.A., Goetzl E.J.: Selective generation of leukotriene B<sub>4</sub> by tracheal epithelial cells from dogs. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1983, 114: 1071.

119.-O'Byrn P., Walters E., Gold B., et al.: Neutrophil depletion inhibits airway responsiveness induced by ozone. Physiologist 1983, 26: 135.

120.-Nadel J.A., Holzman M.J.: Regulation of airway responsiveness and secretion: role of inflammation. In: Asthma: physiology, immunopharmacology, and treatment. Third

International Symposium. p. 19. Academic Press Inc. Londres 1984.

121.-Boushey H.A., Holtzman M.J.: Experimental airway inflammation and hyperreactivity. Searching for cells and mediators. Am. Rev. Respir. Dis. 1985, 121: 312.

122.-Gordo T., Spheppar D., Mc Donald M.D., et al.: Airway hiperresponsiveness and inflammation induced by toluene diisocyanate in guinea pigs. Am. Rev. Respir. Dis. 1985, 132: 1106.

123.-Golden J.A., Nadel J.A., Boushey H.A.: Bronchial hyperirritability in healthy subjects after exposure to ozone. Am. Rev. Respir. Dis. 1978, 118: 287.

124.-Seltzer J., Geffroy B., Stybarg M., et al.: Association between airway inflammation and changes in bronchial reactivity induced by ozone exposure in healthy subjects. Am. rev. Respir. Dis 1984, 129: A 262.

125.-Murlas C.G., Roun J.M.: Sequence of pathologic changes in the airway of guinea pigs during ozone-induced bronchial hyperreactivity. Am. Rev. Respir. Dis. 1985, 131: 314.

126.-Kaliner M.: Hypothesis on the contribution of late-phase allergic responses to the understanding and treatment of allergic diseases. J. Allergy Clin. Immunol. 1984, 73: 311.

127.-Ryo U.Y., Kang B., Townley R.G.: Cromolyn therapy in patients with bronchial asthma. JAMA 1976, 236: 927.

128.-Fairfax A.J.: Inhibition of the late response to house dust mite by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Prostaglandins, Leukotrienes Med. 1982, 8: 239.

129.-Fuller R.W., Dixon C.M.S., Dollerg C.T., Barnes P.J.: Inhaled prostaglandin D<sub>2</sub> potentiates histamine induced bronchoconstriction. Thorax 1984, 39: 699.

130.-Hogg J.C.: Is asthma an epithelial disease?. Am. rev. respir. Dis. 1984, 129: 207.

131.-Eggleston P.A., Kagey-Sobotka A., Schleimer P., Lichtenstein L.M.: Interaction between hyperosmolar and IgE-mediated histamin release from basophils and mast cells. Am. Rev. Respir. Dis. 1984, 130:86.

132.-Delehunt J.C., Perruchoud A.P., Yerger L., et al.: The role of slow reacting substance of anaphylaxis in the late bronchial response after antigen challenge in allergic sheep. Am. rev. Respir. Dis. 1984, 130: 748.

133.-Löwhage O., Rak S.: Modification of bronchial hyperreactivity after treatment with sodium cromoglycate during pollen season. J. Allergy Clin. Immunol. 1985, 75: 460.

134.-Hernandez Garcia J., Rubio Sotés M<sup>a</sup>., Carnés Isidro J., Ortega Nuñez A.: Reacciones de intolerancia al ácido acetilsalicílico (Aspirina). Rev. Clin. Esp. 1972, 124: 115.

135.-Basomba Riba A., Prieto Andrés L.: Asma asociado a antiinflamatorios no esteroideos. En: Tratado de Alergología e Inmunología Clínica. Tomo III. Alergología Clínica (I). Cap. 15. Ed. por la S.E.A. e I.C. Edit. Luzán 5. Madrid 1986.

136.-Stevenson D.D.: Oral challenge, aspirin, NSAIDS, tartrazine and sulfites. New Engl. Reg. Allergy Proc. 1984, 5: 111.

137.-Stevenson D.D., Mathison D.A.; Aspirin sensitivity asthmatics: when may this drug be safe. Postgrad. Med. 1985, 78: 111.

138.-Stevenson D.D., Pleskow W.W., Curd J.G., et al.: Desensitization to acetyl salicylic acid (ASA) in ASA-sensitive patients with rhinosininitis/asthma. En: Dukor P., Kallos P., Schlumberger H.D., West G.B.Ed.: PAR. Pseudo-allergic reactions, involvement of drugs and chemicals. Vol. 3 p. 138. Edit. S. Karger A.G.. Basel 1982.

139.-Mc Donald J.R., Mathison D.A., Stevenson D.D.: Aspirin intolerance in asthma, detection by oral challenge. J. Allergy Clin. Immunol. 1972, 50: 198.

140.-Spector S.L., Wangaard C.H., Far R.S.: Aspirin and

concomitand idiosyncrasies in adult asthmatic patients. J. Allergy Clin. Immunol. 1979, 64: 500.

141.-Szczeklik A., Gryglewski R.J., Czerningwska-Mysik G.: Clinical paterns of hypersensitivity to nonsteroidal antiinflammatory drugs and their pathogenesis. J. Allergy Clin. Immunol. 1977, 60: 276.

142.-Pleskow W.W., Stevenson D:D., Mathison D.A., et al.: Aspirin desensitization in aspirin-sensitive asthmatic patients: clinical manifestation and characterization of the refractory period. J. Allergy Clin. Immunol. 1982, 69: 11.

143.-Hirschberg J.: Mittheilung über einen Fall von Nebenwirkung des Aspirin. Dt. Med. Wschr. 1902, 1: 416.

144.-Storn van Leeuwen W.: Pathognomische Bedeutung der Überempfindlichkeit gegen Aspirin bei Asthmatischen. Münch. Med. Wschr. 1928, 75:1588.

145.-Vanselow N.A., Smith J.R.: Bronchial asthma induced by indometahacin. Ann. Intrn. Med. 1967, 66: 568.

146.-Giraldo B., Blumenthal M,N,, Spinck W.W.: Aspirin intolerance and asthma. A clinical and experimental study. Ann. Intern. Med. 1969, 7: 479.

147.-Samter M., Beers R.F.: Concerning the nature of intolerance

to aspirin. J. Allergy 1967, 40: 281.

148.-De Swrte R.D.: Drug Allergy. En: Allergic diseases. Diagnosis and management. Ed. por Patterson R.. Pág. 452. Edit. J.B. Lippincott Co. Philadelphia 1980.

149.-Spector S.L., Farr R.S.: Aspirin idiosyncrasy: Asthma and urticaria. En: Allergy. Principles and practice. Ed. por Middleton E., Reed Ch.E., Ellis E.F..Pág 1249. Edit. The C.V. Mosby Co. St. Louis. 1983.

150.-Von Maur K., Adkinson N.F., Van Metre T.E. et al.: Aspirin intolerance in a family. J. Allergy Clin. Immunol. 1974, 54: 380.

151.-Phillis J.A., Perelmutterm L.: IgE mediated and non-IgE mediated allergotype reactions to aspirin. Acta Allergol. 1974, 29:474.

152.-Mathews K.P., Lowell R.G., Sheldon J.M.: The problem of aspirin allergy with a report on skin testing with salicylate containing human sera. J. Lab. Clin. Med. 1950, 36: 416.

153.-Salvaggio J.W., Keitt A., Lowell F., Franklin W.: Aspirin induced asthma, a diagnostic problem. JAMA 1964, 288: 323.

154.-Feinberg A.R., Malkiel S.: Aspirin sensitivity, experimental studies. J. Allergy 1951, 22: 74.

155.-Yurchak A.M., Wicher H., Arbersman C.E.: Immunological studies on aspirin. Clinical studies with aspiryl-protein conjugates. J. Allergy 1970, 46: 245.

156.-Schumberger H.D., Lobbecke E.A., Kallos P.: Acetylsalicylic acid intolerance. Lack of N-acetylsalicylic acid specific skin-sensitizing antibodies in the serum of intolerant individuals. Acta Med. Scand. 1974, 196: 451.

157.-García R., Aparicio P., Gurbindo C., Tricas L., Lauzurica P., Lahoz C.: Aspectos inmunológicos de la idiosincradia a la aspirina. Inmunología 1983, 2: 24.

158.-Cochran C.G., Müller-Eberhard H.J.: The derivation of two distinct anaphylotoxin activities from the third and fifth component of human complement. J. Exp. Med. 1968, 127: 371.

159.-Van Oss C.J., Fredman J.C., Fontaine M.: Anticomplementary action of aspirin. Nature 1961, 189: 147.

160.-Arroyave C.M., Stevenson D.D., Tan E.M.: Plasma complement changes during bronchospasm provoked in asthmatic patients. Clin. Allergy 1977, 7. 173.

161.-Voigtlander V., Hansch G.M., Rother U.: Effect of aspirin on complement in vitro. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 1980, 61: 145.

162.-Peskow W.W., Chenoweth D.e., Smith R.S., et al.: The absence of detectable complement activation in aspirin-sensitive asthmatic patients during aspirin challenge. J. Allergy Clin. Immunol. 1983, 72: 462.

163.-Stevenson D.D.: Diagnosis, prevention and treatment of adverse reactions to aspirin and nosteroidal antiinflammatory drugs. J. Allergy Clin. Immunol. 1984, 74: 617.

164.-Mullarkey M.F., Thomas P.S., Hansen J.A.: Association of aspirin-sensitive asthma with HLA-DQW2. Am. Rev. Respir. Dis. 1986, 133: 261.

165.-Stevenson D.D., Arroyave C.M., Bhat K.N., Tan E.M.: Oral aspirin challenges in asthmatic patients: a study of plasma histamine. Clin. Allergy 1976, 6: 493.

166.-Wasserman S.I., Sheffer A.L., Soter N.A., et al.: Assessment of mast cell mediators and pulmonary function in aspirin (ASA) induced bronchospasm. (abstract). J. Allergy Clin. Immunol. 1978, 61: 139.

167.-Simon R.A., Pleskow W., Kaliner M., et al.: Plasma mediators studies in aspirin sensitive asthma: lack of role for the mast cell. J. Allergy Clin. Immunol. 1983, 71: 146.

168.-Ortolani C., Capson F., Restuccia M., et al.: Neutrophil chemotactic factor of anaphylaxis (NCF-A) release in aspirin

induced asthma. Clin. Allergy 1984, 14: 443.

169.-Hollingsworth H.M., Dowing E.T., Braman S.S., et al.: Identification and characterization of neutrophil chemotactic activity in aspirin-induced asthma. Am. Rev. Respir. Dis. 1984, 130: 373.

170.-Basomba A., Romar A., Peláez A., et al.: The effect of sodium cromoglycate in preventing aspirin-induced bronchospasm. Clin. Allergy 1976, 7: 269.

171.-Dahl R.: Oral and inhaled sodium cromoglycate in challenge test with food allergens or acetylsalicylic acid. Allergy 1981, 36: 161.

172.-Samter M., Beers R.F.Jr.: Intolerance to aspirin. Ann. Intern. Med. 1968, 68: 975.

173.-Lumry W.R., Curd J.G., Stevenson D.D.: Aspirin-sensitive asthma and rhinosinusitis: current concepts and recent advances. Ear, Nose, Throat J. 1984, 63: 66.

174.-Vargaftig B.B., Lefort J., Chignard M., Benveniste J.: Platelet-activating factor induces a platelet-dependent bronchoconstriction unrelated to the formation of prostaglandin derivatives. Eur. J. Pharmacol. 1980, 65: 185.

175.-Morley J., Sanjar S., Page C.P.: The platelet in asthma.

Lancet 1984, 2: 1142.

176.-Vane J.R.: Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nature 1971, 231: 232.

177.-Vane J.R.: Prostaglandins and the aspirin-like drugs. Hosp. Pract. 1972, 7: 61.

178.-Vane J.R.: The mode of action of aspirin and similar compounds. J. Allergy Clin. Immunol. 1976, 58: 691.

179.-Szczelkik A., Grygleswki R.J., Czerniawska-Mysik G.: Relationship of inhibition of prostaglandin biosynthesis by analgesics to asthma attacks in aspirin sensitive asthma patients. Br. Med. J. 1975, 1:67.

180.-Lewis G.P., Piper P.J.: Inhibition of the release of prostaglandins as an explanation of some of the actions of antiinflammatory corticosteroid. Nature 1975, 254: 308.

181.-Pleskow W.W., Stevenson D.D., Mathison D.A., et al.: Aspirin desensitization in aspirin-sensitive asthmatics patients: clinical manifestations and characterization of the refractory period. J. Allergy Clinical Immunol. 1982, 69: 11.

182.-Basomba A., Morales M.C., Prieto L., Campos A., Peláez A.G., Villalmanzo I.: Tolerancia cruzada a otras drogas anti-

inflamatorias no esteroideas en pacientes ASA-triada desensibilizados a la aspirina. XII Congr. Nac. de la SEA e IC. Sevilla. Ed. Abelló S.A. Pág. 348. Madrid 1983.

183.-Morales M.C., Basomba A., Villalmanzo I., et al.: Crossed tolerance to pyrazolines, mephenamic acid and glafenine in ASA-triad patients desensitized to aspirin. J. Allergy Clin. Immunol. 1985, 75: 4.

184.-Olley P.M., Coceani F.: The prostaglandins. Am. J. Dis. Child. 1980, 134: 688.

185.-Rasmussen H.: The calcium messenger system. N. Engl. J. Med. 1986, 314: 1094.

186.-Bell R.L., Majerus P.W.: Thrombin-induced hydrolysis of phosphatidylinositol in human platelets. J. Biol. Chem. 1980, 255: 1970.

187.-Samuelsson B., Goldyne M., Grandström E., et al.: Prostaglandins and thromboxanes. Am. Rev. Biochem. 1978, 47: 997.

188.-Burrall B.A., Payan D.G., Goetzl E.J.: Arachidonic acid-derived mediators of hypersensitivity and inflammation. Cap. 9 en Allergy: principles and practice. Ed. por Middleton E., Reed C.E., Ellis E.F., Adkinson N.F., Yunginger J.W. Edit. Mosby. St Louis. 1988.

189.-Samuelsson B.: Leukotrienes: mediators of hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 1983, 220: 568.

190.-Sun F.F., Mc Guire J.C., Wallach D.P., Brown V.R.: Study of the property and inhibition of human platelet arachidonic acid 12-lipoxygenase. En *Advances in prostaglandins and thromboxane research*. Vol. 6. Ed. por Ramwell P.W., Paoletti R.. Edit. Raven Press. New York 1980.

191.-Maas R.L., Turk J., Oates J.A., Brash A.R.: Formation of a novel dihydroxy acid from arachidonic acid by lipoxygenase-catalyzed double oxygenation in rat mononuclear cells and human leukocytes. *J. Bio. Chem.* 1982, 257: 7056.

192.-Burrall B.A., Wintroub B.U., Goetzl E.J.: Selective expresion of 15-lyoxigenase activity by cultured human keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985, 133: 208.

193.-Goetzl E.J., Scott W.A.: III editors: Proceeding of a conference on regulation of cellular activities by leukotrienes and other lipoxygenase products of arachidonic acid. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1984, 74: 309.

194.-Serhan N.C., Hamberg M., Samuelsson B.: Lipoxins: a novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81: 5335.

195.-Peters S.P.: The cyclooxygenase and lipoxygenase pathways and inflammatory mediators. Cap. 6 en Allergy. Edit. por Kaplan A.P.. Edit. Churchill Livingston. New York 1985.

196.-Sirois P., Brousseau Y., Salari H., Bogeat P.: Correlation between the myotropic activity of Leukotriene A<sub>4</sub> on guinea pig lung, trachea and ileum and its biotransformation in situ. Prostaglandins 1985, 30: 21.

197.-Snyder D.W., Aharony D., Dobson P., Tsai B.S., Krell R.D.: Pharmacological and biochemical evidence for metabolism of peptide leukotrienes by guinea pig airway smooth muscle in vitro. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1984, 231: 224.

198.-Aharony D., Dobson P.T., Krell R.D.: In vitro metabolism of (3H)-peptide leukotrienes in human and ferret lung: a comparison with yhe guinea pig. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1985, 131: 892.

199.-Churchill L., Chilton F.H., Resan H., et al.: Cyclooxygenase metabolism of endogenous arachidonic acid by cultured human tracheal epithelial cells. Am. Rev. Respir. Dis. 1989, 140: 449.

200.-Vigano T., Sautebin L., Magni F., et al.: Stimulus related difference in the formation of leukotrienes and PGD<sub>2</sub> after immunological and non immunological challenge of human lung parenchima in vitro. Prostaglandins Leukotrienes Med. 1986, 23: 109.

201.-Schulman E.S., Adkinson N.F.Jr., Newball H.H.: Cyclooxygenase metabolites in human lung anaphylaxis: airway v.s. parenchyma. J. Appl. Physiol. 1982, 53: 589.

202.-Mc Glashan D.W.Jr., Lichtenstein L.M.: Characteristics of human basophil sulfidopeptide leukotriene release: releasability defined as the ability of the basophil to respond to dimeric cross-links. J. Immunol. 1986, 136: 2231.

203.-Hammarström S., Lindgren J.A., Marub C., et al.: Arachidonic acid transformation in normal and psoriatic skin. J. Invest. Dermatol. 1979, 73: 180.

204.-Lewis R.A., Soter N.A., Diamond P.T., et al.: Prostaglandin D<sub>2</sub> generation after activation of rat and human mast cell with anti IgE. J. Immunol. 1982, 129: 1627.

205.-Galli S.J., Lichtenstein L.M.: Biology of mast cells and basophils. Cap. 7 en Allergy: principles and practice. Ed. por Middleton E.Jr., Reed C.E., Ellis E.F., Adkinson N.F.Jr., Yunginger J.W.. Edit. Mosby Co. St Louis. 1988.

206.-Levi-Schaffer F., Austen K.F., Caulfield J.P., et al.: Co-culture of human lung-derived mast cell (MC) with murine 3T3 fibroblast: morphology and IgE-mediated release of histamine, prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) and leukotrienes (LT). Fed. Proc. 1987, 46: 935.

207.-Mencia-Huerta J.M., Razini E., Ringel W., et al.: Immunologic and ionophore-induced generation of leukotriene B<sub>4</sub> from mouse bone marrow-derived mast cells. J. Immunol. 1983, 130: 1885.

208.-Levi-Schaffer F., Austen K.F., Caulfield J.P., et al.: Fibroblast maintain the phenotype and viability of the rat heparin-containing mast cell in vitro. J. Immunol. 1985, 135: 3454.

209.-Henderson W.R., Harley J.B., Fauci A.S.: Arachidonic acid metabolism in normal and hypereosinophilic syndrome eosinophils: generation of leukotrienes B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, and 15-lipoxygenase products. Immunology 1984, 51: 679.

210.-Laviolette M., Picard S., Braquet P., Borgeat P.: Comparison of 5 and 15-lipoxygenase activities in blood and alveolar leukocyte preparation from normal subjects and patients with eosinophilia. Prostaglandins Leukotrienes Med. 1986, 23:191.

211.-Jorg A., Henderson W.R., Murphy R.C., Klebanoff S.J.: Leukotriene generation by eosinophils. J. Exp. Med. 1982, 155: 390.

212.-Weller P.F., Lee C.W., Foster D.W., et al.: Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotrienes by human eosinophils. Predominant production of leukotriene C<sub>4</sub>. Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 1983, 80: 7626.

213.-Borgeat P., Fruteau de Laclos B., Ravinovich H., et al.: Eosinophil-rich human polymorphonuclear leukocyte preparations characteristically release leukotriene C<sub>4</sub> on ionophore A 23187 challenge. J. Allergy Clin. Immunol. 1984, 74: 310.

214.-Goetzl E.J.: Selective feed-back inhibition of the 5 lipoxygenation of arachidonic acid in human T lymphocytes. Bioch. Biophys. Res. Commun. 1981, 101: 344.

215.-Hamberg M., Samuelsson B.: Prostaglandin endoperoxides. A novel transformations of arachidonic acid in human platelets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1974, 71: 3400.

216.-Peters S.P., Schimer R.P., Kagey-Sobotka A., et al.: The role of prostaglandin D<sub>2</sub> in IgE mediated reactions in man. Trans. Assoc. Am. Phys. 1982, XCV: 221.

217.-Mita H., Yui Y., Taniguchi N., Yasuda H., Shida T.: Increased activity of 5-lipoxygenase in polymorphonuclear leukocytes from asthmatic patients. Life Sci. 1985, 37: 907.

218.-Thomas E.D., Ramberg R.E., Sale G.E., et al.: Direct evidence for bone-marrow origin of the alveolar macrophage in man. Science 1976, 192: 1016.

219.-Brain J.D., Gehr P., Kanet R.I.: Airway macrophages: the

importance of the fixation method. Am. Rev. Respir. Dis. 1984, 129: 823.

220.-Merrill W.W., Naegel G.P., Matthay R.A., Reynolds H.Y.: Alveolar macrophage-derived chemotactic factor. Kinetics of in vitro production and partial characterization. J. Clin. Invest. 1980, 65: 268.

221.-Rankin A.: The contribution of alveolar macrophages to hyperreactive airway disease. J. allergy Clin. Immunol. 1989, 83: 722.

222.-Godart P., Damon M., Pujol J.L., et al.: Cellular activation and bronchial asthma. P. 162 en Progress in Allergy and Clinical Immunology. Ed. por Pichler W.J., Stadler B.H., Dahinden C.A., et al. Edit. Hogrefe and Huber Publishers. Toronto 1989.

223.-Drazen J.M., Austen K.F.: Leukotrienes and airway responses. Am. Rev. Respir. Dis. 1987, 136: 985.

224.-Mong S., Wu H.L., Stadel M., et al.: Solubilization of (3H)leukotriene  $D_4$  receptor complex from guinea pig lung membranes. Mol. Pharmacol. 1986, 29: 235.

225.-Cheng J.B., Townley R.G.: Evidence for a similar receptor site for binding of (3H)leukotriene  $E_4$  and (3H)leukotriene  $D_4$  to the guinea pig crude lung membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1984, 122: 949.

226.-Goldman D.W., Goetzl E.J.: Specific binding of leukotriene B<sub>4</sub> to receptors on human polymorphonuclear leukocytes. J. Immunol. 1982, 1129: 1600.

227.-O'Flaherty J., Kosfeld S., Nishihira J.: Binding and metabolism of leukotriene B<sub>4</sub> by neutrophils and their subcellular organelles. J. Cell. Physiol. 1986, 126: 359.

228.-Smith W.L.: The eicosanoids and their biochemical mechanism of action. Biochem. J. 1989, 259: 315.

229.-Dahlen S., Hansson G., Hedqvist P., et al.: Allergen Challenge of lung tissues from asthmatics elicits bronchial contraction that correlates with the release of leukotrienes C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, and E<sub>4</sub>. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1983, 80: 1712.

230.-Drazen J.M., Austen K.F., Lewis R.A., et al.: Comparative airway and vascular activities of leukotrienes C and D in vivo and in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1980, 77: 4354.

231.-Drazen J.M., Austen K.F.: Effects of intravenous administration of slow-reacting substance of anaphylaxis, histamine, bradykinin and Prostaglandin F<sub>2</sub> alpha on pulmonary mechanics in the guinea pig. J. Clin. Invest. 1974, 53: 1679.

232.-Smith L.J., Greenberger P.A., Patterson R., et al.: The effect of inhaled leukotriene D<sub>4</sub> in humans. Am. Rev. Respir. Dis.

1985, 131: 368.

233.-Lee T.H., Austen K.F., Corey E.J., Drazen J.M.: Leukotriene E<sub>4</sub> induced airway hyperresponsiveness of guinea pig tracheal smooth muscle to histamine and evidence for three separate sulfidopeptide leukotrienes receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984, 81: 4922.

234.-Austen K.F., Lewis R.A., Wasserman S.I., Goetzl E.J.: Generation and release of chemical mediators of immediate hypersensitivity to human cells. In New directions in asthma. Park Ridge III. Ed. por Stein M..American College of Chest Physicians. 1975.

235.-Palmer R.M.J., Higgs G.A., Eakins K.E.: Chemotactic activity of arachidonic acid lipoxygenase products on leukocytes of different species. Prostaglandins 1980, 204: 411.

236.-Goldman D.W., Goetzl E.J.: Heterogeneity of human polymorphonuclear leukocyte receptors for leukotriene B<sub>4</sub>. J. Exp. Med. 1984, 159: 1027.

237.-Nagy L., Lee T.H., Goetzl E.J., et al.: Complement receptor enhancement and chemotaxis of human neutrophils and eosinophils by leukotrienes and other lipoxygenase products. Clin. Exp. Immunol. 1982, 47: 541.

238.-Jacques C., Crea A., Spur B., Lee T.H.: The contractile

activity of lipoxin A<sub>4</sub> and lipoxin B<sub>4</sub> on guinea pig airway. J. Allergy Clin. Immunol. 1988, 81: 311.

239.-Sirois P.: In vitro effects of leukotriene B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub>. Evidence that changes in blood are mediated by prostaglandins. Prostaglandins Med. 1981, 7: 363.

240.-Omini C., Folco G.C., Vigano T., et al.: Leukotriene C<sub>4</sub> induces generation of PGI<sub>2</sub> and TxA<sub>2</sub> in guinea pig in vivo. Pharmacol. Res. Commun. 1981, 13: 633.

241.-Levine J.D., Gooding J.L., Donatoni P., et al.: The role of polymorphonuclear leukocyte in hyperalgesia. J. Neurosci. 1985, 5: 3025.

242.-Vanderhoek J.Y., Bryant R.W., Bailey J.M.: Inhibition of leukotriene biosynthesis by the leukocyte product 15-hydroxy 5,8,11,13 eicosatetraenoic acid. J. Biol. Chem. 1980, 255: 10064A.

243.-Bray M.A., Cunningham F.M., Ford-Hutchison A.W., Smith M.J.H.: Leukotriene B<sub>4</sub>, a mediator of vascular permeability. Br. J. Pharmacol. 1981, 72: 483.

244.-Leitch A.G., Corey E.J., Austen K.F., Drazen J.M.: Indomethacin potentiates the pulmonary response to aerosol leukotriene C<sub>4</sub> in the guinea pig. Am. rev. Respir. Dis. 1983, 128: 639.

245.-Stewart A.G., Thomson D.C., Fennessy M.R.: Leukotriene D<sub>4</sub> potentiates histamine-induced bronchoconstriction in guinea pig. Agents and Actions 1984, 15: 146.

246.-Barnes N.C., Costello J.F.: Leukotrienes and asthma. P. 194 en Asthma, clinical, pharmacology and therapeutic progress. Ed. por Kay A.B. Edit. Blackwell Scientific Publications. Oxford 1986.

247.-Abraham W.M.: The importance of lipoxygenase products of arachidonic acid in allergen-induced late responses. Am. Rev. Respir. Dis. 1986, 135-6-2º p.: S49.

248.-Robinson C., Holgate S.T.: The synthesis, release and effects of prostaglandins in the lung. P. 213 en Asthma, clinical, pharmacology and therapeutics progress. Ed. por Kay A.B. Edit. Blackwell Scientific Publications. Oxford 1986.

249.-Creticos P.S., Peters S.P., Adkinson N.F.Jr., et al.: Peptide leukotriene release after antigen challenge in patients sensitive to ragweed. N. Engl. J. Med. 1984, 310: 1626.

250.-Togias A.G., Nanclerio R.M., Peters S.P., et al.: Local generation of sulfidopeptide leukotrienes upon nasal provocation with cold dry air. Am. Rev. Respir. Dis. 1986, 133: 1133.

251.-Volovitz B., Osur S.L., Bernstein J.M., Ogra P.L.:

Leukotriene C<sub>4</sub> release in upper respiratory mucosa during natural exposure to ragweed in ragweed-sensitive children. J. Allergy Clin. Immunol. 1988, 82: 414.

252.-Arm J.P., Spur B.W., Lee T.H.: The effect of inhaled leukotriene E<sub>4</sub> on the airway responsiveness to histamine in subjects with asthma and normal subjects. J. Allergy Clin. Immunol. 1988, 82: 654.

253.-Black P.N., Maltby N.H., Taylor G.W., et al.: Urinary levels of leukotriene E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>) and histamine are elevated in acute asthma. Am. rev. Respir. Dis. 1988, 137: A427.

254.-Murray J.J., Tonnel A.B., Brash A.R., et al.: Release of PGD<sub>2</sub> into human airways during acute antigen challenge. N. Engl. J. Med. 1986, 315: 800.

255.-Lam S., Chan H., Le Riche J.C., et al.: Release of leukotrienes in patients with bronchial asthma. J. Allergy Clin. Immunol. 1988, 81: 711.

256.-Wardlaw A.J., Hay H., Cromwell O., et al.: Leukotrienes LTC<sub>4</sub> and LTB<sub>4</sub> in bronchoalveolar lavage in bronchial asthma and other respiratory diseases. J. Allergy Clin. Immunol. 1989, 84: 19.

257.-Wenzel S.E., Wescott J.Y., Smith H.R., Larsen G.L.: Spectrum of prostanoid release after bronchoalveolar allergen challenge in atopic asthmatic and control groups. Am. Rev. Respir. Dis.

1989, 139: 450.

258.-Barnes N., Piper P.J., Costello J.: The effect of an oral leukotriene antagonist L-649,923 on histamine and leukotriene D<sub>4</sub>-induced bronchoconstriction in normal man. J. Allergy Clin. Immunol. 1987, 78: 816.

259.-Britton J.R., Hanley S.P., Tarrttersfield A.E.: The effect of an oral leukotriene D<sub>4</sub> antagonist L-649,923 on response to inhaled antigen in asthma. J. Allergy Clin. Immunol 1987, 79: 811.

260.-Shaker G., Glovky M.M., Kebo D. et al.: Reversal of exercise induced asthma by the LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> antagonist LY 71883. J. Allergy Clin. Immunol. 1988, 81: 315 (abstrct).

261.-Israel E., Juniper E.F., Morris M.M., et al.: A leukotriene D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) receptor antagonist, LY 171883, reduces the bronchoconstriction induced by cold air challenge in asthmatics: a randomized double-blind placebo control trial. Am. Rev. Respir. Dis. 1988, 137: A27.

262.-Fuller R.W., Black P.N., Dollery C.T.: Effect of the oral leukotriene D<sub>4</sub> antagonist LY 171883 on inhaled and intradermal challenge with antigen and leukotriene D<sub>4</sub> in atopic subjects. J. Allergy Clin. Immunol. 1989, 83: 939.

263.-Cloud M., Enas G., Kemp J., Platt-Mills T., et al.: A

specific LTD<sub>4</sub>/LTE<sub>4</sub> receptor antagonist improves pulmonary function in patients with mild, chronic asthma. Am. Rev. Respir. Dis. 1989, 140: 1336.

264.-Nigans S., Kunkel G., Helrod D., et al.: Nasal polyps and their content of arachidonic acid. N. Engl. Reg. Allergy Proc. 1986, 7: 109.

265.-Godard P., Chantreuil J., Damon M., et al.: Functional assessment of alveolar macrophages: comparison of cells from asthmatic and normal subjects. J. Allergy Clin. Immunol. 1982, 70: 88.

266.-Szczeklik A.: Eicosanoids and aspirin-sensitive asthma. P. 195 en PAF, Platelets and Asthma. Ed. por Schmitz-Schumann M., Menz G., Page C.P.. AAS 21. Edit. Birkhauser Verlag. Basel 1987.

267.-Goetzl E.J., Valacer D.J., Payan D.G., Wong M.Y.S.: Abnormal responses to leukocyte oxygenation of arachidonic acid in adults with aspirin intolerance. J. Allergy Clin. Immunol. 1986, 77: 693.

268.-Capron A., Ameisen J.C., Joseph M., et al.: New functions for platelets and their pathological implications. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 1985, 77: 107.

269.-Ameisen J.C., Capron A., Joseph M., et al.: Platelets and aspirin induced asthma. P. 226 en Asthma: clinical, pharmacology

and therapeutic progress. Ed. por Kay A.B. Edit. Blackwell Scientific Publications. Oxford 1986.

270.-Joseph M., Capron A., Butterworth A.E., et al.: Cytotoxicity of human and baboon mononuclear phagocytes against schistosomula in vitro: induction by immune complexes containing IgE and *Schistosoma mansoni* antigens. *Cli. Exp. Immunol.* 1978, 33: 48.

271.-Kuehl F.A., Dougherty H.W., Ham E.A.: Interactions between prostaglandins and leukotrienes. *Biochem. Pharmacol.* 1984, 33: 1.

272.-Mugridge K.G., Higgs G.A., Monceda S.: Prostacyclin modulates the responses to leucotrienes C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub> of guinea pig airway smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 1984, 104: 1.

273.-Nizankowska E., Sheridan A.Q., Maile M.H., et al.: Pharmacological attempts to modulate leukotriene synthesis in aspirin-induced asthma. P. 203 en *PAR, Platelets and Asthma*. Ed. por Schmitz-Scuman M., Menz G., Page C.P.. AAS 21. Edit. Birkhause Verlag. Basel. 1987.

274.-Ferreri N.R., Howland W.C., Stevenson D.D., Spiegelberg H.L.: Release of leukotrienes, prostaglandins and histamine into nasal secretions of aspirin-sensitive asthmatic during reaction to aspirin. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988, 137: 847.

275.-Arm J.P., O'Hickey S.P., Spur B.W., Lee T.H.: Airway

responsiveness to histamine and leukotriene E<sub>4</sub> in subjects with aspirin-induced asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989, 140: 148.

276.-Christie P., Arm J.P., Tagasi P., et al.: Leukotriene E<sub>4</sub> release after aspirin challenge in aspirin sensitive asthmatic subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1990, 85-2: 248 (abstract).

277.-Maltby N.H., Taylor G.W., Ritter J.M., et al.:  
Leukotriene C<sub>4</sub> elimination and metabolism in man. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1990, 85: 3.

278.-Capron A., Dessaint J.P., Capron M., Bazin H.: Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature* 1975, 253: 474.

279.-Dessaint J.P., Torpier G., Capron M., et al.: Cytophilic binding of IgE to the macrophage. *Cell. Immunol.* 1979, 46: 12.

280.-Melewicz F.M., Zeigel R.S., Mellon M.H., et al.: Increased peripheral blood monocytes with Fc receptors for IgE in patients with severe allergic disorders. *J. Immunol.* 1981, 126: 1592.

281.-Joseph M., Tonnel A.B., Torpier G., et al.: Involvement of immunoglobulin E in the secretory processes of alveolar macrophages from asthmatic patients. *J. Clin. Invest.* 1983, 71: 221.

282.-Fels A.O.S., Pawlowski N.A., Cramer E.B., et al.: Human

alveolar macrophages produce leukotriene B<sub>4</sub>. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1982, 79: 7866.

283.-Arnoux B., Duval D., Benveniste J.: Release of platelet-activating factor (PAF-aceter) from alveolar macrophages by the calcium ionophore (A 23187) and phagocytosis. Eur. J. Clin. Invest. 1980, 10: 437.

284.-Bentler B., Cerami A.: Cachetin: more than a tumor necrosis factor. N. Engl. J. Med. 1987, 316: 379.

285.-Nathan C.F.: Secretory products of macrophages. J. Clin. Invest. 1987, 79: 319.

286.-Martinet Y., Rom W.N., Grotendorst G.R., et al.: Exaggerated spontaneous release of platelet-derived growth factor by alveolar macrophages from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. N. Engl. J. Med. 1987, 317: 202.

287.-Merrill W.W., Naegel G.P., Matthay R.A., Reynolds H.Y.: Alveolar macrophage-derived chemotactic factor: kinetics of in vitro production and partial characterization. J. Clin. Invest. 1980, 65: 268.

288.-Nagy L., Lee T.H., Goetzl E.J., et al.: Complement receptor enhancement and chemotaxis of human neutrophils and eosinophils by leukotrienes and other lipoxygenase products. Clin. Exp. Immunol. 1982, 47: 541.

289.-Wardlaw A.J., Moqbel R., Cronwell O., Kay A.B.: Platelet activating factor: a potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils. *J. Clin. Invest.* 1986, 78: 1701.

290.-Elsas P., Lee T.H., Lenzi H.L., Dessein A.I.: Monocytes activate eosinophils for enhanced helminth toxicity and increased generation of leukotriene C<sub>4</sub>. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.* 1987, 138: 97.

291.-Dessein A.I., Lee T.H., Elsas P., et al.: Enhancement by monokines of leukotriene generation by human eosinophils and neutrophils stimulated with calcium ionophore A 23187. *J. Immunol.* 1986, 136: 3829.

292.-Fitzharris P., Moqbel R., Thorne K.J.I., Richardson B.A., et al.: Monocyte derived eosinophil activating factor (EAF) enhances LTC<sub>4</sub> production by human eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1986, 77: 235. (Abstract).

293.-Howell C.J., Pujol J.L., Crea A., et al.: Identification of an alveolar macrophage derived activity in bronchial asthma that enhances leukotriene C<sub>4</sub> generation by human eosinophils stimulated by ionophore A 23187 as granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989, 140: 1340.

294.-Shulman E.S., Liu M.C., Proud D., et al.: Human lung macrophages induce histamine release from basophils and mast

cells. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1985, 131: 230.

295.-Liu M.C., Pround D., Lichtenstein L.M., et al.: Human lung macrophage-derived histamine release activity is due to IgE-dependent factors. *J. Immunol.* 1985, 136: 2588.

296.-Patterson R., Susko I.M., Harris K.E.: The in vivo transfer of antigen induced airway reactions by bronchial lumen cells. *J. Clin. Inves.* 1978, 61: 519.

297.-Dessaint J.P., Capron A., Joseph M., Bazin M.: Cytophilic binding Of IgE to the macrophage.II. Immunologic release by lysosomal enzyme from macrophages by IgE and anti-IgE in the rat. *Cell. Immunol.* 1979, 46: 24.

298.-Bach M.K., Brashel J.R., Hammarstrom S., Samuelsson B.: Identification of leukotriene C as a major component of slow-reactin substance from rat mononuclear cell. *J. Immunol.* 1980, 125: 115.

299.-Moscat J., Aracil M., Diez E., Garcia-Barreno P., Municio A.M.: Effect of ethanol on the arachidonic acid metabolism in mouse peritoneal macrophages. *Prostaglandins* 1987, 34: 853.

300.-Rankin J.A.: IgE immune complexes induce LTB<sub>4</sub> release from rat alveolar macrophages. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.* 1986, 137: 364.

301.-Rankin J.A., Hitchcock M., Merrill W.W., et al.: IgE dependent release of leukotriene C<sub>4</sub> from alveolar macrophages. Nature 1982, 297: 329.

302.-Ferreri N.R., Howland W.C., Spiegelberg H.: Release of leukotrienes C<sub>4</sub> and B<sub>4</sub> and prostaglandin E<sub>2</sub> from human monocytes stimulated with aggregated IgG, IgA and IgE. J. Immunol. 1986, 136: 4188.

303.-Fuller R.W., Morris P.K., Sykes R.D., et al.: Immunoglobulin E-dependent stimulation of human alveolar macrophages: significance in type I hypersensitivity. Clin. Exp. Immunol. 1986, 65: 416.

304.-Tonnel M., Tonnel A.B., Capron A., Voisin C.: Enzyme release and superoxide anion production by human alveolar macrophages stimulated with immunoglobulin E. Clin. Exp. Immunol. 1980, 40: 416.

305.-Arnoux B., Simoes-Ceaioro M.H., Landes A., et al.: Alveolar macrophages from asthmatics release PAF-acether and lyso-PAF-acether when stimulated with specific antigen. Am. Rev. Respir. Dis. 1982, 125: 70A.

306.-Goddart P., Chaintreuil J., Damon M., et al.: Functional assessment of alveolar macrophages: comparison of cells from asthmatics and normal subjects. J. Allergy Clin. Immunol. 1982, 70: 88.

307.-Aubas P., Cosso B., Godard P., et al.: Depressed suppressor-cell activity of alveolar macrophages in bronchial asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1984, 130: 875.

308.-Cluzel M., Damon M., Chanez P., et al.: Enhanced alveolar cell luminol-dependent chemiluminescence in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1987, 80: 195.

309.-Carroll M.P., Durham S.R., Walsh G., Kay A.B.: Activation of neutrophils and monocytes after allergen-and histamine-induced bronchoconstriction. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1985, 75: 290.

310.-Tonnel A.B., Grosset P.H., Joseph M., et al.: Stimulation of alveolar macrophages in asthmatic patients after local provocation test. *Lancet* 1983, 1: 1406.

311.-Murray J.J., Tonnel A.B., Brash A.R., et al.: Release of prostaglandin D<sub>2</sub> into human airways during acute antigen challenge. *N. Engl. J. Med.* 1986, 315: 800.

312.-Lewiss R.A., Austen K.F.: Mediation of local homeostasis and inflammation by leukotrienes and other mast cell dependent compounds. *Nature* 1981, 293: 103.

313.-Dunnill M.S.: The pathology of asthma. Cap. 37 en *Allergy, principles and practice*. Ed. por Middleton E.Jr., Reed C.E., Ellis E.F.. Edit. C.V. Mosby. St. Louis 1978.

314.-Metzger W.J., Zavala D., Richerson H.B., et al.: Local allergen challenge and bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987, 135: 433.

315.-Cunningham A.L., Merigan T.C.: Leu 3+T-cells produce gamma-interferon in patients with recurrent herpes labialis. *J. Immunol.* 1984, 132: 197.

316.-Rankin J.A., Schrader C.E., Smith S., Lewis R.A.: Recombinant interferon-gamma primes alveolar macrophages cultured in vitro for the release of leukotriene B<sub>4</sub> in response to IgG stimulation. (En prensa). *J. Clin. Invest.*

317.-Lee T.H.: Interactions between alveolar macrophages, monocytes and granulocytes. Implications for airway inflammation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1986, 135-6 2<sup>o</sup> part: S14.

318.-Kay A.B.: Inflammatory cells in acute and chronic asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1986, 135-6 2<sup>o</sup> part.: S63.

319.-Wyllie A.H., Poznansky M.C., Gordon A.C.H.: Glucocorticoid-resistant asthma: evidence for a defect in mononuclear cells. P. 306 en *Asthma: clinical pharmacology and therapeutics progress*. Ed. por Kay A.B.. Edit. Blackwell Scientific Publications. Oxford 1986.

320.-Bowden D.H., Adamson I.Y.R.: Role of monocytes and interstitial cells in the generation of alveolar macrophages: I.

Kinetic studies in normal mice. *Lab. Invest.* 1980, 42: 511.

321.-Nakamura I., Morita Y., Kuriyama M., et al.: Platelet-activating factor in late asthmatic response. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1987, 82: 57.

322.-Feldberg W., Kellaway C.H.: Liberation of histamine and formation of lysolecithin-like substance by cobra venom. *J. Physiol.(Lond.)* 1938, 94: 187.

323.-Samuelsson B.: Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 1983, 220: 568.

324.-Kaliner M.A., Eggleston P.A., Mathews K.P.: Rhinitis and asthma. *JAMA* 1987, 258: 2851.

325.-Poulter L.W., Burkes C., Gallaher E., Kidney J.: Does a cell mediated immunereaction contribute to asthma. *Thorax (Abstract)* 1988.

326.-Fujimura M., Sasaki F., Naatsumi Y., et al.: Effects of a thromboxane synthetase inhibitor (OKY-046) and a lipoxigenase inhibitor (AA-861) on bronchial responsiveness to acetylcholine in asthmatic subjects. *Thorax* 1986, 41: 955.

327.-Szczeklik A., Nizankowska E.: Asthma improved by aspirin-like drugs. *Br. J. Dis. Chest* 1983, 77: 153.

328.-Schleimer R.P.: Effects of glucocorticosteroids on inflammatory cells relevant to their therapeutic applications in asthma. Am. Rev. Respir. Dis. 1990, 141-2-2<sup>o</sup> p. S 59.