

LA HIPERREACTIVITAT BRONQUIAL

INDUÏDA PER L'OZÓ

Josefina López Aguilar

UNITAT DE RECERCA EXPERIMENTAL

HOSPITAL DE BELLVITGE

Aquest projecte ha estat dissenyat dins l'àmbit de treball desenvolupat pel grup de Fisiopatologia Respiratòria de la **Unitat de Recerca Experimental de l'Hospital de Bellvitge**, i s'ha fet possible gràcies a la subvenció concedida per la convocatòria de **Beques 94-95 de L'Ajuntament de l'Hospitalet de Llobregat**.

INDEX

I.- INTRODUCCIÓ

1.- INTRODUCCIÓ

2.- CONCEPTES GENERALS

2.1.- L'ARBRE RESPIRATORI

2.2.- CONCEPTE D'HIPERREACTIVITAT BRONQUIAL

3.- LA INFLAMACIÓ I EL DESACOBLAMENT MECÀNIC EN LA HRB

4.- UTILITZACIÓ DE MODELS ANIMALS PER L'ESTUDI DE LA HRB

II.- DESCRIPCIÓ DE L'ESTUDI REALITZAT

1.- ESQUEMA DE L'ESTUDI

2.- CONDICIONS D'EXPOSICIÓ

3.- CONDICIONS DE MEDICACIÓ

4.- PROTOCOL EXPERIMENTAL

5.- ADMINISTRACIÓ DEL BRONCOCONSTRICTOR

6.- OBTENCIÓ I PROCESSAT DE LES MOSTRES

III.- PROCESSAT DE LES DADES I RESULTATS

1.- ESTUDI BIOMECÀNIC

- GRÀFIQUES: Dmx, SUP, BasR i E, MxVarR i E, PC150R i E, IRR, IRE.
- TAULES
- RESULTATS INDIVIDUALS D'ELASTÀNCIA
- RESULTATS INDIVIDUALS DE RESISTÈNCIA

2.- ESTUDI ANATOMOPATOLÒGIC

- CÉL.LULES IMPLICADES EN LA RESPOSTA INFLAMATÒRIA
 - . NEUTRÒFILS
 - . EOSINÒFILS
 - . MASTÒCITS I BASÒFILS
 - . MONÒCITS I MACRÒFAGS
 - . CÉL.LULES EPITELIALS

3.- ESTUDI HISTOQUÍMIC

- ESTUDI HISTOQUÍMIC
- MEDIADORS INFLAMATORIS
 - . TAULA
 - . GRÀFIQUES: TXB2, PGF2a, LTC4D4E4, LTB4, PGD2

4.- TRACTAMENT ESTADÍSTIC

5.- CONCLUSIONS

IV. BIBLIOGRAFIA

I. INTRODUCCIÓ

1.- INTRODUCCIÓ

L'exposició aguda a ambients rics en ozó, contaminant freqüent dins l'àmbit industrial, condueix entre d'altres trastorns a un estat reversible d'**Hiperreactivitat Bronquial** (HRB), màxim a les 24-48 hores conseqüents a l'exposició i decreixent fins desaparèixer en un període de temps variable depenent del grau de l'exposició, tant en el subjecte normal com en l'animal d'experimentació.

Aprofitant aquesta possibilitat de realitzar un estudi experimental amb animals de laboratori, i amb el coneixement previ de la existència de Inflamació de les vies aèries en la HRB, el treball aporta la hipòtesi de que la Inflamació és la responsable de la HRB induïda per l'ozó però no necessàriament a través d'un increment dels mediadors hístics sino també o principalment pel desacoblament mecànic que es produeix entre el teixit i la via aèria. Les implicacions pràctiques d'aquesta interdependència mecànica a nivell del peribronqui són interessants tant pel coneixement de la gènesi de la HRB i els seus mecanismes, com per disposar d'un model per interpretar l'efecte protector dels tractaments antiinflamatoris.

D'altra banda és important fer recaure l'interès d'aquest treball sobre la interrelació existent entre la Hiperreactivitat Bronquial i l'**Asma Bronquial**, malaltia crònica molt comú en la població normal . Aquesta interrelació

justifica l'estudi de la HRB en el laboratori com mitjà de simulació d'una de les característiques més significatives de l'Asma Bronquial.

El diagnòstic d'Asma es troba lligat a diversos factors possibles: en alguns pacients , es tracta de l'aparició clínica d'episodis curts d'obstrucció greu , però reversible , de les vies respiratòries, normalment associats a desencadenants alèrgics coneguts. En d'altres casos la simptomatologia és crònica. Al augmentar els nostres coneixements sobre aquesta malaltia s'han erigit models més complexos de l'asma, en els que dos aspectes, però, semblen tenir una importància essencial: la Hiperreactivitat Bronquial i la Inflamació de les vies aèries.

2.- CONCEPTES GENERALS

• 2.1.- L'ARBRE RESPIRATORI

Les vies aèries estan constituïdes per elements cel·lulars que presenten una organització morfològica de disseny complicat i funció regulada per diferents sistemes (uns activadors i d'altres inhibidors), que exerceixen un control continu sobre les mateixes. La seva principal missió és acondicionar i conduir l'aire inspirat fins les zones del pulmó on té lloc l'intercanvi gasós. Es tracta d'un conjunt de tubs , que desde la traquea fins el seu extrem distal (sacs alveolars), es divideixen 23 vegades seguint un patró dicotòmic irregular, disminuint el diàmetre del tub a cada bifurcació, fins arribar a la part més distal on la superfície s'optimitza per afavorir el transport de les mol·lècules d'oxigen necessàries per les cèl·lules fins a la perifèria.

En aquest procés es poden distingir tres etapes determinades per tres zones:

- Etapa de conducció que inclou traquea i bronquis
- Etapa de transició
- Zona respiratòria al final .

A mesura que es produeix la ramificació les parets canvien de configuració fent-se progressivament més primes. Estan constituïdes per tres components : a) mucosa, b) múscle llis i c) una capa conjuntiva envoltant el conjunt.

Tot aquest complicat sistema està lluny de ser una estructura rígida , ja que el seu diàmetre oscil·la en funció del canvi de pressió que es produeix durant el cicle respiratori. Aquesta flexibilitat es deu també en part a la presència del múscle llis , que té la facultat de disminuir o augmentar el diàmetre de la llum com resposta a una gran varietat d'estímuls de forma quasi immediata .

El volum de gas que és transportat durant la respiració aporta a l'organisme l'oxígen necessari per mantenir cobertes les necessitats metabòliques, però a la vegada pot ser vehicle d'agents ambientals potencialment irritants i nocius (partícules orgàniques i inorgàniques , microorganismes, gasos tòxics , fums, etc.). En front d'aquest constant atac el pulmó disposa de tota una sèrie de dispositius anatòmics, bioquímics, biofísics, cel·lulars i immunes, de defensa per mantenir el sistema íntegre. L'adaptabilitat del pulmó té molt a veure amb la seva flexibilitat i capacitat de resposta.

Un dels papers més destacats en els mecanismes de defensa el representa el múscle llis present en la paret de les vies aèries, que respon amb la contracció bé per l'acció directa o per mecanismes reflexes relacionats amb el sistema nerviós autònom (SNA) reduint la possibilitat de penetració de l'agent extern. Aquest fenomen rep el nom de Reactivitat Bronquial (RB).

- **2.2.- CONCEPTE D'HIPERREACTIVITAT BRONQUIAL**

En determinades ocasions, com ja s'ha dit, l'arbre bronquial pot experimentar una reducció significativa de la seva llum quan es veu exposat a diversos estímuls, que en general només produeixen una resposta broncoconstrictora poc significativa o nul·la. El terme **Hiperreactivitat Bronquial (HRB)** descriu una situació especial de major sensibilitat de la via aèria, de manera que els estímuls són capaços de provocar una broncoconstricció de magnitud més important que l'habitual. La anormalitat no es troba en la broncoconstricció per sí mateixa, la seva presència no és indicativa necessàriament de patologia de la via aèria, la anomalia es troba en la desproporció que es dona entre la quantia de l'estímul i la resposta obtinguda. Cal fer una distinció doncs entre RB i HRB, el primer terme es refereix al comportament normal de defensa del sistema i el segon a una exageració d'aquest. La frontera existent entre RB (normal) i HRB (patològica) es defineix estadísticament depenent de diferents paràmetres a tenir en compte.

Aquesta anomalia (HRB) s'ha observat com una de les característiques més significatives de l'**Asma Bronquial**, encara que no és exclusiva i definitiva d'aquesta, ja que la HRB es dona també en altres circumstàncies :

- Malalts amb bronquitis crònica, fibrosi quística, rinitis al·lèrgica,

sarcoidiosi, etc.

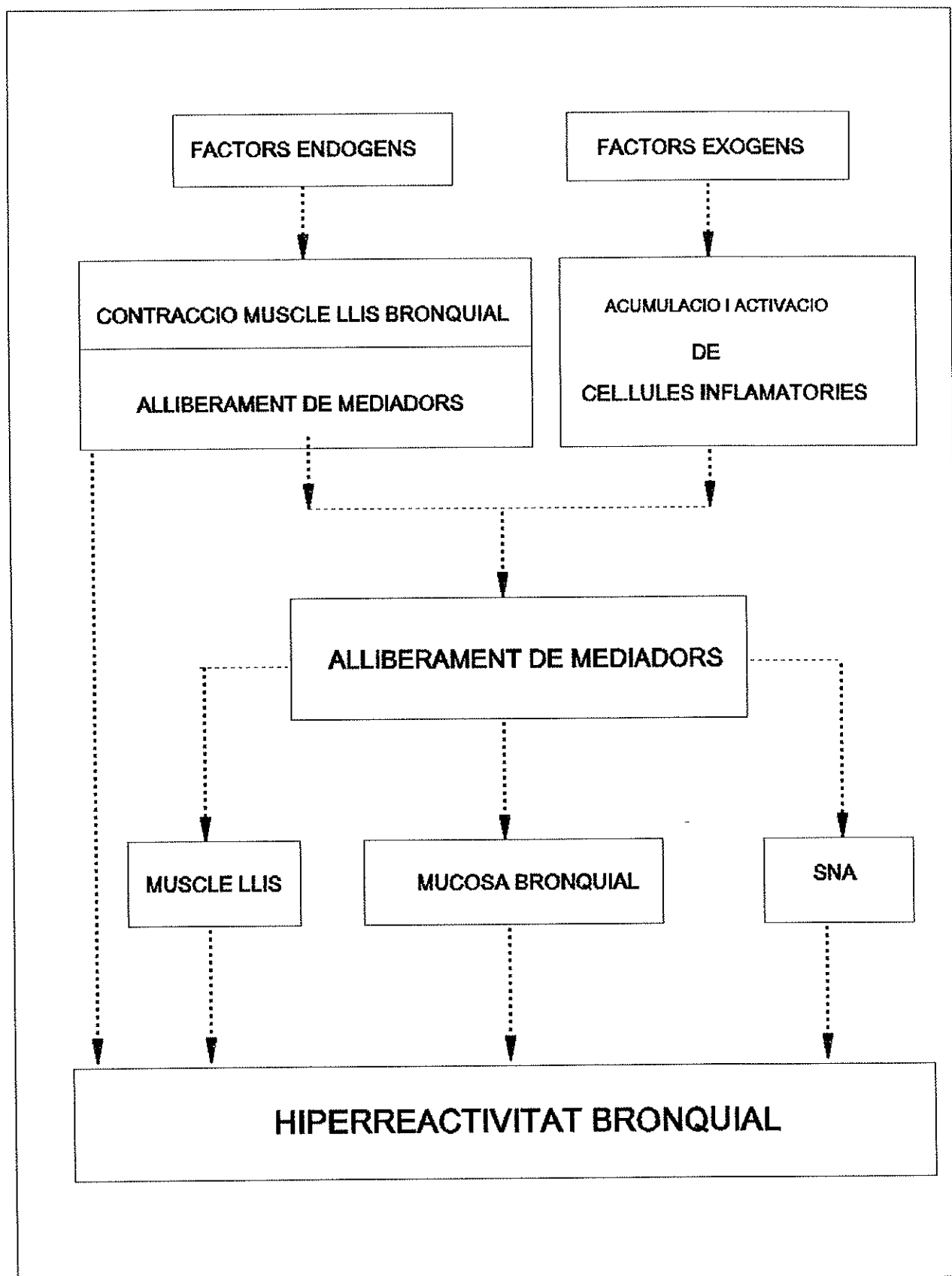
- Individus sans en condicions especials com infeccions víriques del tracte respiratori o exposats a contaminants atmosfèrics.

- Pacients sotmesos a transplantament cardiopulmonar.

En qualsevol cas HRB i Asma Bronquial són dos termes clarament associats, i per tant s'utilitza l'estudi de la HRB com aproximació a l'estudi de l'Asma , per la important incidència d'aquesta malaltia en la població normal.

Això indica que l'origen de la HRB pot no ser idèntic en tots el casos, i que és el resultat d'un conjunt de mecanismes induïts per factors endògens i exògens, que no sempre es combinen de forma similar , la qual cosa dificulta l'estudi del mecanisme en sí, ja que cal posar en joc un gran nombre de paràmetres explicatoris (Fig 1) .

FIG. 1



3.-LA INFLAMACIÓ I EL DESACOBLAMENT MECÀNIC EN LA HIPERREACTIVITAT BRONQUIAL

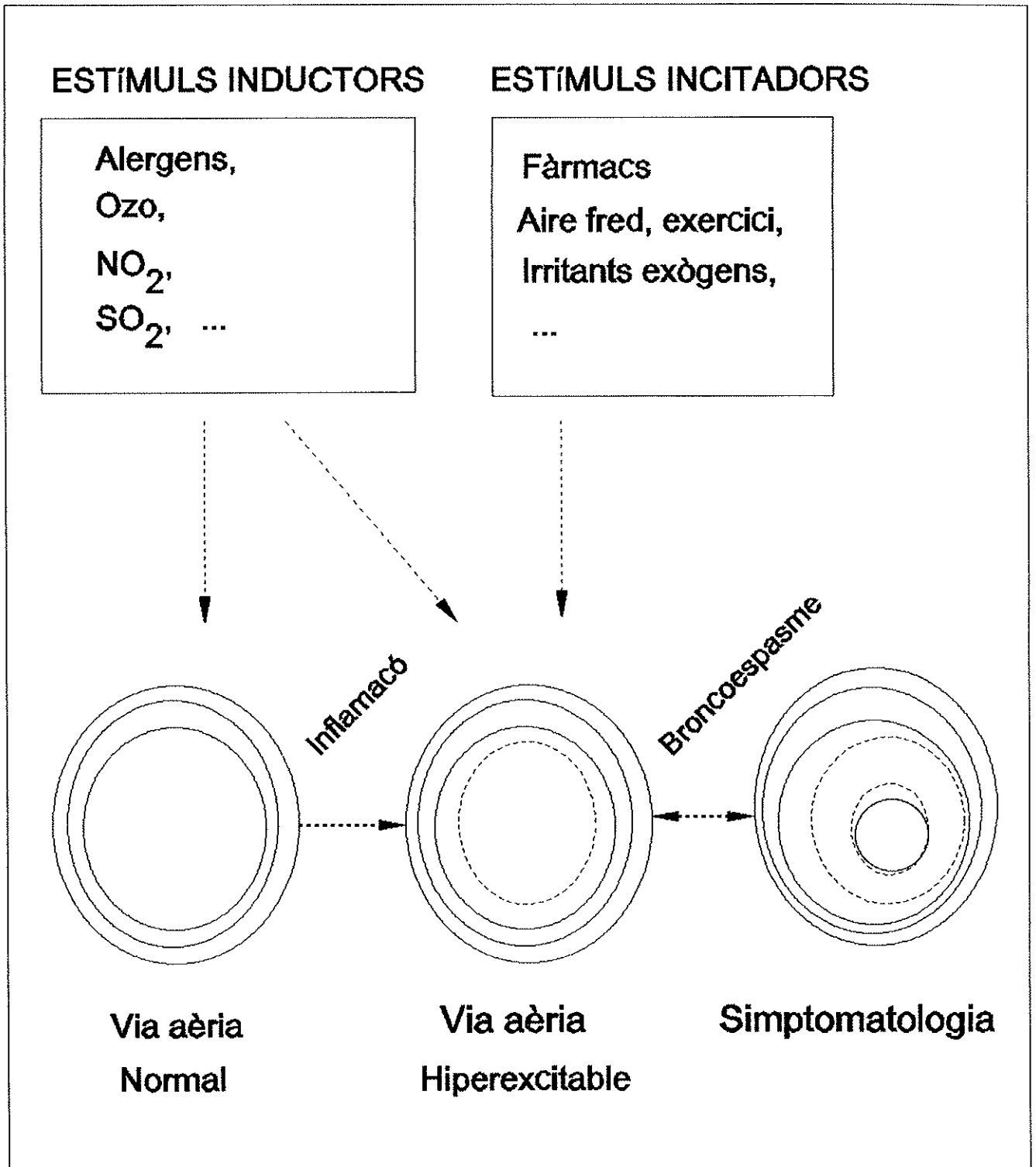
En la majoria de les patologies o situacions especials anteriorment citades en que es dona la HRB trobem una característica comú, la **Inflamació de la via aèria**. Actualment s'accepta que el fenomen inflamatori es troba implicat d'alguna forma , directa o indirectament, en els mecanismes fisiopatològics de la HRB, sobretot en el cas de l'Asma Bronquial. La inflamació és la resposta normal de qualsevol teixit vascularitzat en front a una situació d'alerta, i les alteracions histopatològiques que l'acompanyen són ben conegudes, de manera que no seran l'objectiu principal d'aquest estudi.

És conegut que la majoria dels processos clínics que desenvolupen una HRB s'acompanyen simultàniament de la Inflamació de la via aèria . La resposta hipersensible observada en la HRB es deu en part a factors musculars locals, que provoquen un augment de la permeabilitat de l'epiteli bronquial, motivat per un augment de la descàrrega local d'inductors de la contracció o per disminució del rentat local dels agonistes. En aquestes condicions d'augment de la permeabilitat els agents agressors externs poden assolir amb més facilitat l'entorn del Muscle Llis Bronquial afavorint el seu efecte.

Un altre mecanisme que es sugereix i en el que està basat el nostre projecte és el **Desacoblament Mecànic entre parènquima i via aèria**, que es veu afavorit per la presència d'edema a la mucosa bronquial. Segons alguns autors la inflamació de la mucosa bronquial incrementa la fracció incompressible de l'àrea situada en el interior del peribronqui, de manera que el radi intern de la llum bronquial disminueix més que l'extern per una determinada disminució del perímetre extern del bronqui (Fig 2). Es tracta d'un trencament de l'estabilitat del conjunt que fa possible el manteniment de la capacitat de reacció.

El sistema es converteix en una estructura rígida de la banda externa, fet que s'observa clarament en el moment de la contracció més que en situacions basals. Aquesta rigidesa externa va en contra del manteniment del diàmetre interior.

FIG. 2



4.-UTILITZACIÓ DE MODELS ANIMALS PER L'ESTUDI DE LA HIPERREACTIVITAT BRONQUIAL.

S'ha observat que l'exposició d'un individu sa a determinats agents ambientals, de caràcter químic o físic desencadena una reacció fisiològica caracteritzada per un augment de la resistència de les vies aèries, conseqüència de la contracció del Muscle Llis Bronquial. Com s'ha comentat abans, es tracta d'un mecanisme de defensa del pulmó d'aquesta manera la HRB pot ser reproduïda en el laboratori per l'administració controlada d'alguns agents inductors.

Fins el moment actual l'enfoc general dels estudis ha consistit en l'exàmen de les vies qèries abans i després d'una intervenció.

Donat que els teixits de les vies aèries no es poden obtenir fàcilment per l'experimentació en individus sans, s'ha intentat posar a punt diferents models experimentals de provocació de la HRB en animals de laboratori (Rates, conills, cobaies i gossos) per comprendre el fenomen.

A la vegada que aquest sistema permet mantenir unes condicions de treball altament reproduïbles

En general els models animals utilitzats es poden agrupar en tres categories:

1.- Models d'**exposició aguda** a l'agent (ozó, antígen, virus, endotoxina o determinats productes químics) on el temps d'exposició és curt.

2.- Models d' **Exposició prolongada** a estímuls irritants .

3.- Models de **HRB persistent** tractats amb inhibidors coneguts de la inflamació.

En el nostre treball s'ha tractat de reproduir la HRB amb una exposició aguda d'una hora a una concentració elevada d'ozó (4 ppm), i s'ha combinat amb el tractament dels individus amb antiinflamatoris (Indometacina).

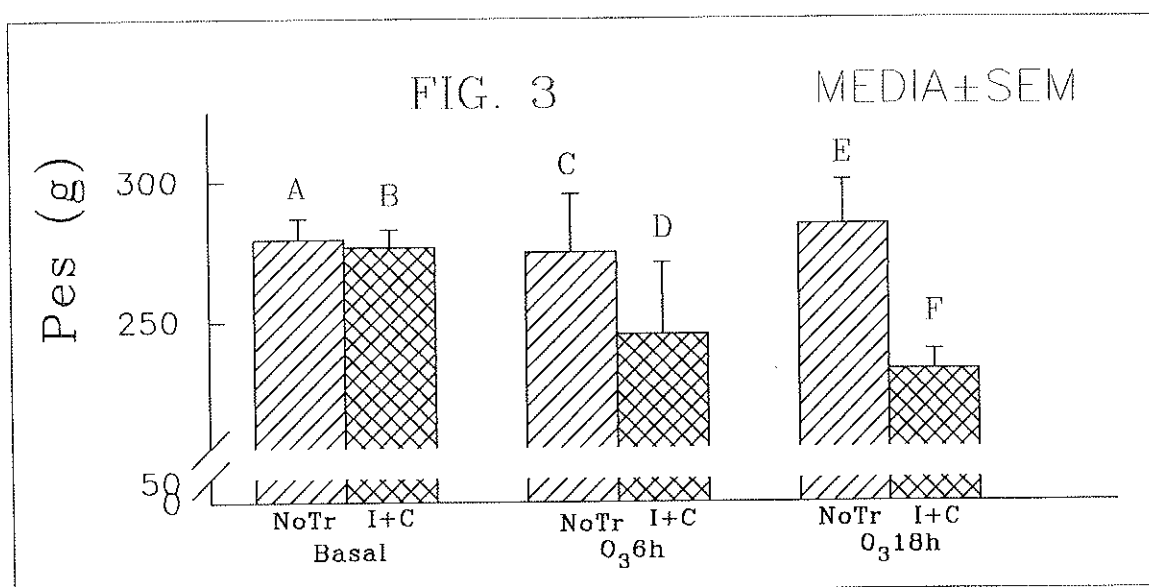
II. DESCRIPCIÓ DE L'ESTUDI REALITZAT

1.- ESQUEMA DE L'ESTUDI REALITZAT

S'ha realitzat l'estudi experimental de 45 rates Sprague Dawley de Pes 253.96 ± 54 g (Fig 3) , sense tenir en compte el sexe, segons els següents grups:

NOM	GRUP	OZÓ	TRACTAMENT	NºIND
A	C.BASAL	-	SF	10
B	C. I+C	-	I+C	5
C	O3 6h	6 h	SF	5
D	O3 18h	18 h	SF	5
E	O3 6 h I+C	6 h	I+C	10
F	O3 18h I+C	18 h	I+C	10

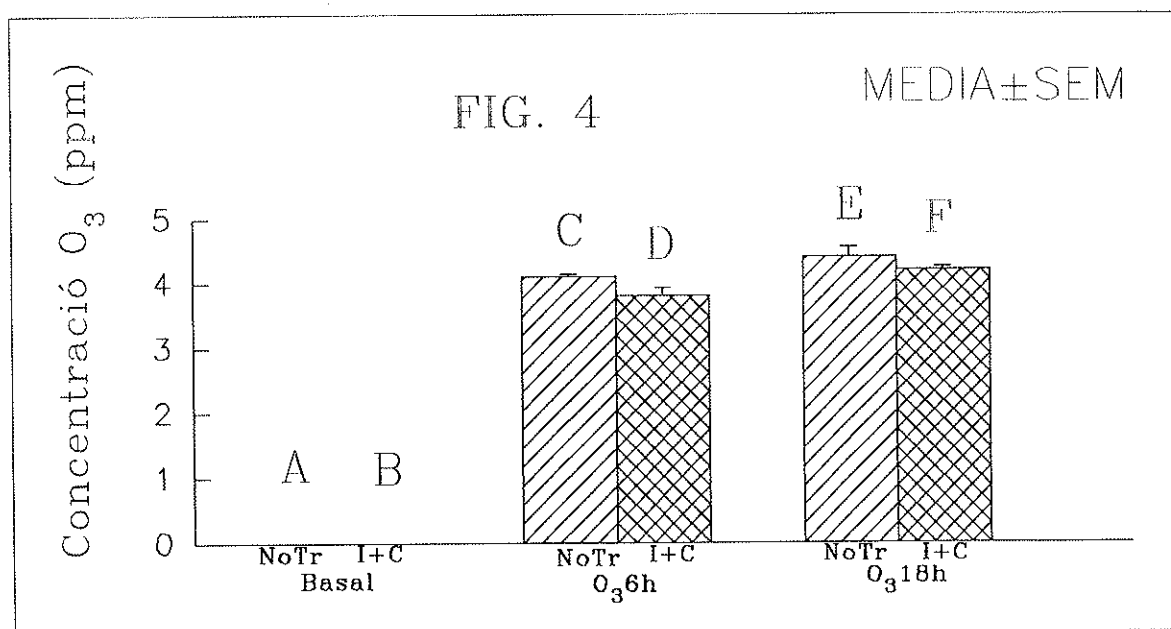
La pauta d'estudi emprada ha estat la descrita en la memòria prèviament presentada.



Per problemes tècnics s'ha treballat amb un grup de rates de pes significativament inferior al de la mitja (Grups *D* i *F*) encara que el tractament estadístic d'aquest paràmetre ha demostrat que aquesta diferència no té influència en els resultats.

2.- CONDICIONS D'EXPOSICIÓ

- Pel cas dels **grups control** no exposats a l'ozó (A - B), els animals varen respirar durant 1 h l'aire filtrat dins la Càmera d'Ambient Controlat (CAC).
- Pel cas dels **grups exposats** (C - D - E - F), les rates van ser sotmeses durant 1 h a una concentració de Ozó de 4.08 ± 0.36 ppm dins la CAC.(Fig 4)



Les concentracions d'ozó a les que s'han sotmés les rates no presenten diferències significatives entre els grups que les reben.

3.- CONDICIONS DE MEDICACIÓ

- El tractament es va administrar de forma dual : **Antiinflamatori + Antihistamínic (Indometacina + Clorfeniramina respectivament)** pel cas dels grups que reben medicació (B - D - E), per via intramuscular tres hores abans de l'estudi experimental dosi-resposta a la Metacolina .

Les dosis administrades són de 5 mg/Kg calculades en funció del pes dels animals per un volum d'injecció de 1 ml, dosi que ha demostrat la seva eficàcia en d'altres estudis consultats a la bibliografia.

Els fàrmacs utilitzats són:

- **INDOMETACINA (I): INACID I.M.**

- **CLORFENIRAMINA (C): POLARAMINE (Dexclorfeniramina Maleato).**

- Pels animals **no medicats** , s'ha administrat com Placebo 1 ml de **Solució Salina Fisiològica** via intramuscular en les mateixes condicions abans contemplades.

4.- PROTOCOL EXPERIMENTAL

A partir d'aquest punt l'estudi és comú per tots els individus i grups seguint el protocol experimental següent , tres hores després de l'administració del tractament indicat en la pauta per cada grup.

- **Anestèsia** amb Pentotal Sòdic per via intraperitoneal.
- **Traqueostomia** i col.locació de la **cànula traqueal** de doble llum (2 mm de diàmetre intern), per la monitorització contínua dels paràmetres **Fluxe aeri (F)** mitjançant un Neumotacògraf Fleisch i de la **Pressió traqueal (PTR)** amb un Transductor Piezoelèctric.
- Col.locació de la **cànula esofàgica** pel seguiment de la **Pressió Esofàgica (PESOF)** durant l'experiment mitjançant un Transductor de pressió en líquids.
- El **Volum (V)** es calcula per integració del Fluxe aeri.
- En aquest punt realitzem tres registres de 10" amb tres canals Fluxe, Pressió Traqueal i Pressió esofàgica per tal de tenir descrites les condicions basals, i un test d'oclusió per assegurar la correcta col.locació de la cànula esofàgica i obtenir una mesura correcta.

Per aquests registres disposem del **Software LABDAT** del programa **ANADAT** de la Universitat de McGill de Montreal, utilitzant una freqüència de mostreig de 200 Hz.

- Els animals es mantenen amb **respiració espontània** durant tot l'experiment.

5.- ADMINISTRACIÓ DEL BRONCOCONSTRICTOR

Com substància broncoconstrictora s'utilitza la **Metacolina** (PM 195.7, SIGMA), i s'administra en dosis inhalades de 15" de durada, a concentracions creixents. La sèrie administrada és la següent en mg/ml:

SF, 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64

Per l'administració del broncoconstrictor s'utilitza un Nebulitzador tipus HEYER ULTRASONIC , carregat amb 5 ml de la solució a inhalar. El temps d'inhalació és de 15" i 1 minut després de cada dosi es realitza un registre de 10" de durada.

Amb aquest procediment s'obté la corba **Concentració -Resposta** per cada animal en front a l'administració del broncoconstrictor . Entre aquests registres s'intercalen alguns tests d'oclusió per constatar que es mantenen estables les condicions d'estudi al llarg de l'administració, i per tant que els resultats obtinguts són directament comparables.

En els animals on ha estat possible s'ha arribat a administrar la concentració màxima de Metacolina prevista (64 mg/ml), però en alguns casos d'animals que presenten hiperreactivitat s'han observat aturades respiratòries a concentracions més baixes , algunes recuperables amb ventilació assistida i altres no, la qual cosa obliga a aturar l'administració abans d'arribar a la concentració màxima prevista, per poder seguir amb l'experiment.

Finalitzada l'administració del broncoconstrictor els animals que han superat aquesta etapa reben una dosi única de 1 mg/ml d'**Atropina** inhalada (**Broncodilatador** de PM 676.8 SIGMA), durant 30" per tal d'estudiar la recuperació post-Metacolina.

6.- OBTENCIÓ I PROCESSAT DE LES MOSTRES

Una vegada finalitzada tota la sèrie d'administració de Metacolina i Atropina es dona per finalitzat l'experiment fent un altre test d'oclusió per comprovar si la cànula esofàgica reflexa la mesura de pressió esofàgica correctament, validant amb això els resultats.

A continuació es sacrifiquen els animals i s'extrau el bloc cardio-pulmonar pel següent processat de les mostres.

NEUMONECTOMIA ESQUERRA :

- Per obtenció de les mostres que són fixades amb una solució de Formalina al 10% per la obtenció de talls histològics pel posterior **Estudi Morfomètric de l'Anatomia Patològica.**

NEUMONECTOMIA DRETA :

- Per obtenció de les mostres que es preserven congelades a -60°C i que s'utilitzen per fer homogenats amb solució isotònica per **estudis Histoquímics dels paràmetres mediadors de la Inflamació : Leucotriè B4 i LTC4D4E4 , Prostaglandina D2 i PGF2alfa , Tromboxà B2 i Citokines.**

Una vegada finalitzada aquesta etapa la resta del treball s'ha dividit en els següents blocs:

- 1.- **Estudi Biomecànic** de les corbes Dosi-Resposta.
- 2.- **Estudi Anatomo Patològic** de les mostres fixades en formalina obtingudes de la neumonectomia esquerra.
- 3.- **Estudi Histoquímic** de les mostres que preservem congelades procedents de la neumonectomia dreta.
- 4.- **Estudi amb Tractament Estadístic de les dades.**

III. PROCESSAT DE DADES

I RESULTATS

1.- ESTUDI BIOMECÀNIC

1.-ESTUDI BIOMECÀNIC

De l'anàlisi de les corbes dosi-resposta a la Metacolina s'obtenen els paràmetres que permeten definir les característiques biomecàniques de cada grup.

- **CÀLCULS:**

Corregint la pendent de la Pressió esofàgica (PESOF) s'obtenen la Pressió Pleural (PPL), a partir de la qual es calcula la Pressió Transpulmonar (PTP) d'una manera senzilla:

$$PPL = PESOF * ct \text{ de correcció}$$

$$PTP = PPL - PTR$$

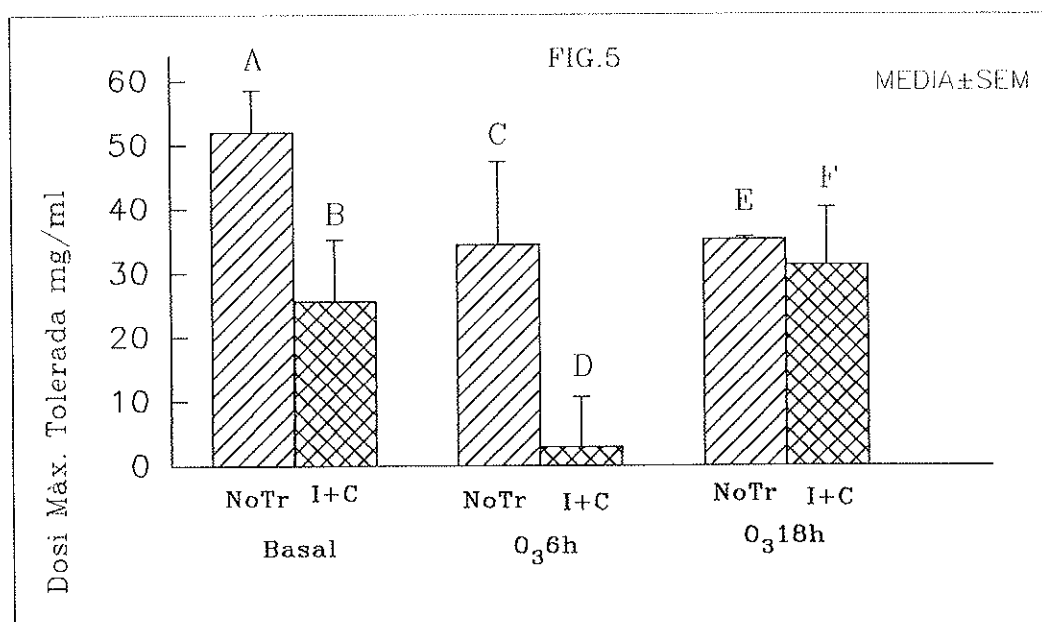
L'anàlisi de cada cicle respiratori registrat es realitza aplicant la Equació de moviment respiratori, mitjançant el Software específic ANADAT de McGill de Montreal.

$$PTP = (EI * V) + (Res * F) + K$$

D'aquesta Equació s'obtenen els dos paràmetres principals per l'estudi biomecànic com són la **Elastància** (EI) relacionada amb el Flux (F) i la **Resistència** (Res) Pulmonar relacionada amb el Volum (V), que ens permeten dibuixar les corbes dosi-resposta per grups, així com les taules de resultats.

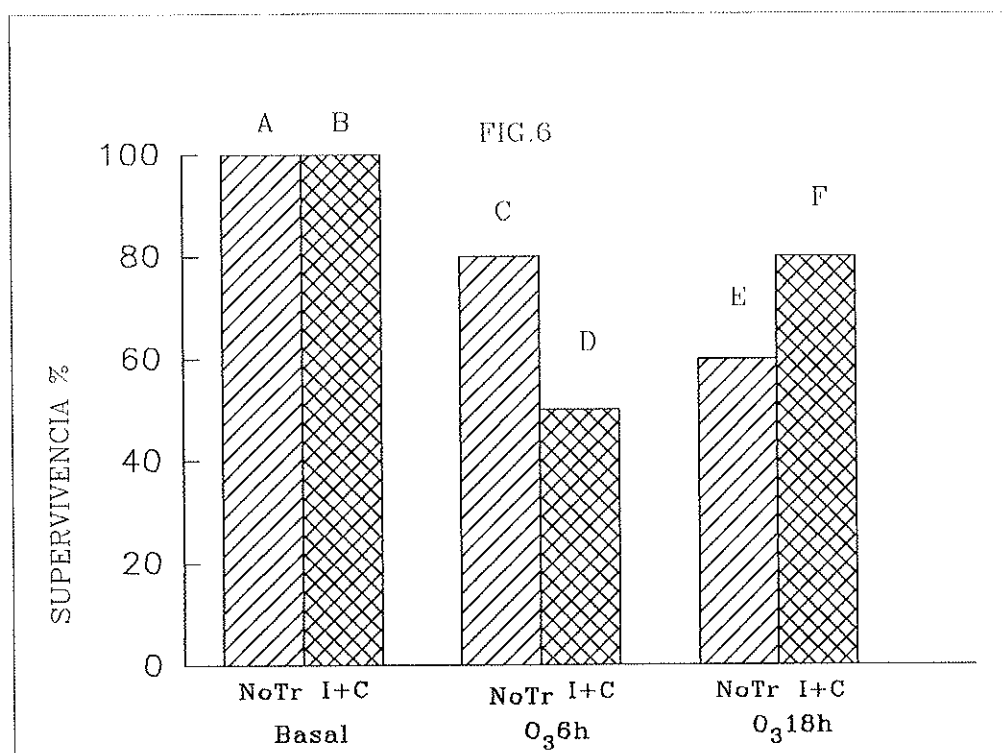
A partir dels resultats de l'equació de moviment definim , a continuació, altres valors que considerem interessants pel nostre estudi.

- **DMX** : DOSI MÀXIMA DE METACOLINA TOLERADA pels animals al llarg de l'experiment (Fig 5).



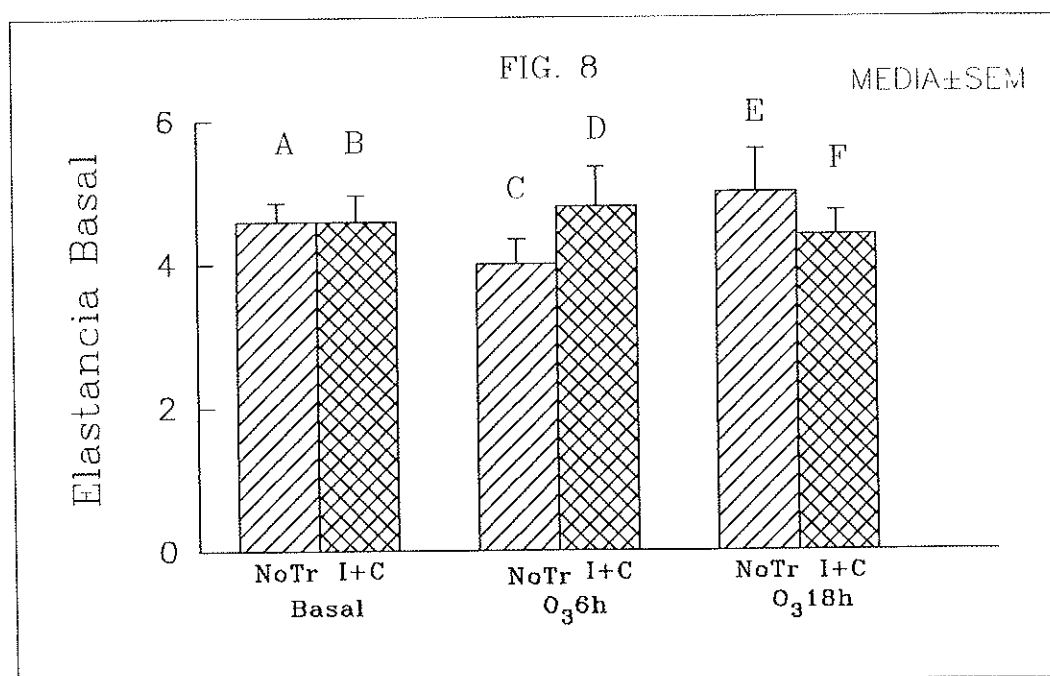
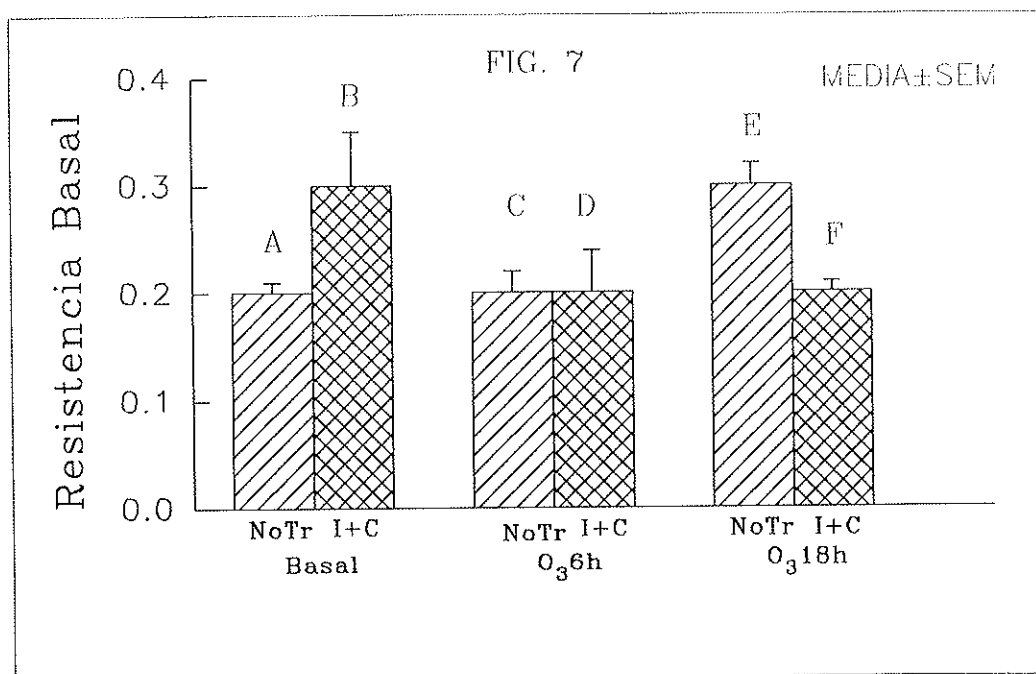
Analitzant aquests valors s'observa que els grups sotmesos tant a tractament com a ozonització suporten dosis inferiors a les dels animals que serveixen de control. Es pot apreciar aquesta circumstància encara de manera més clara després del tractament Antiinflamtori-Antihistaminic durant les 6 hores immediatament posteriors a l'ozó .

- **Sup** : La observació de les gràfiques de SUPERVIVENCIA demostra clarament la incidència negativa de la ozonització (Fig. 6) , tant en l'estudi realitzat a curt termini (6 hores) com a llarg termini (18 hores).

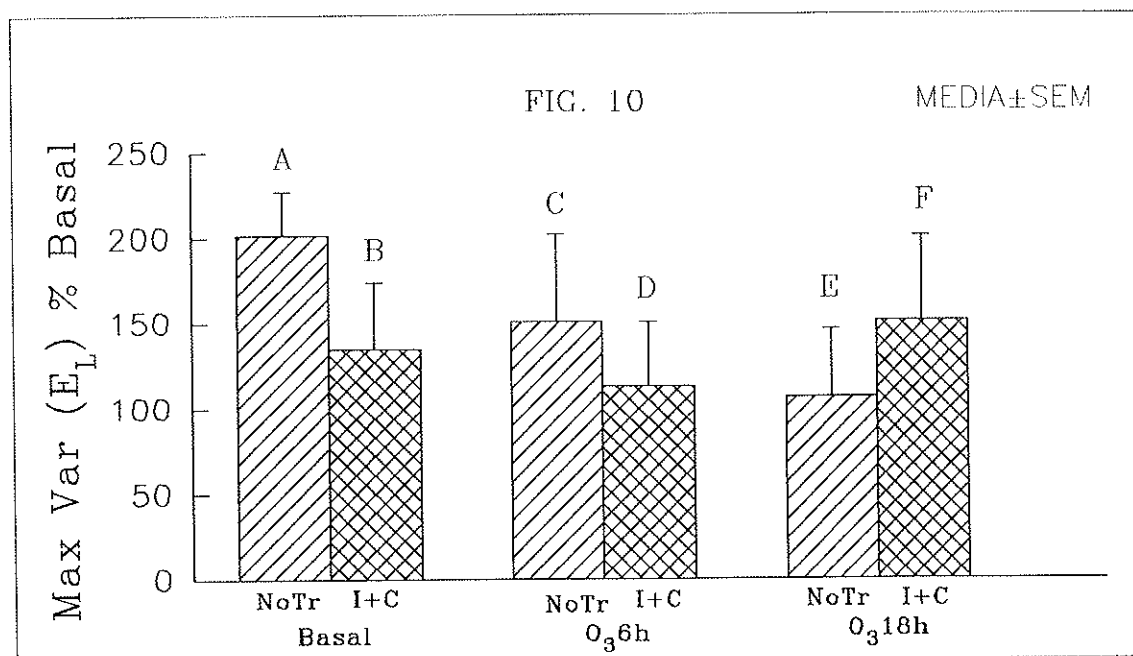
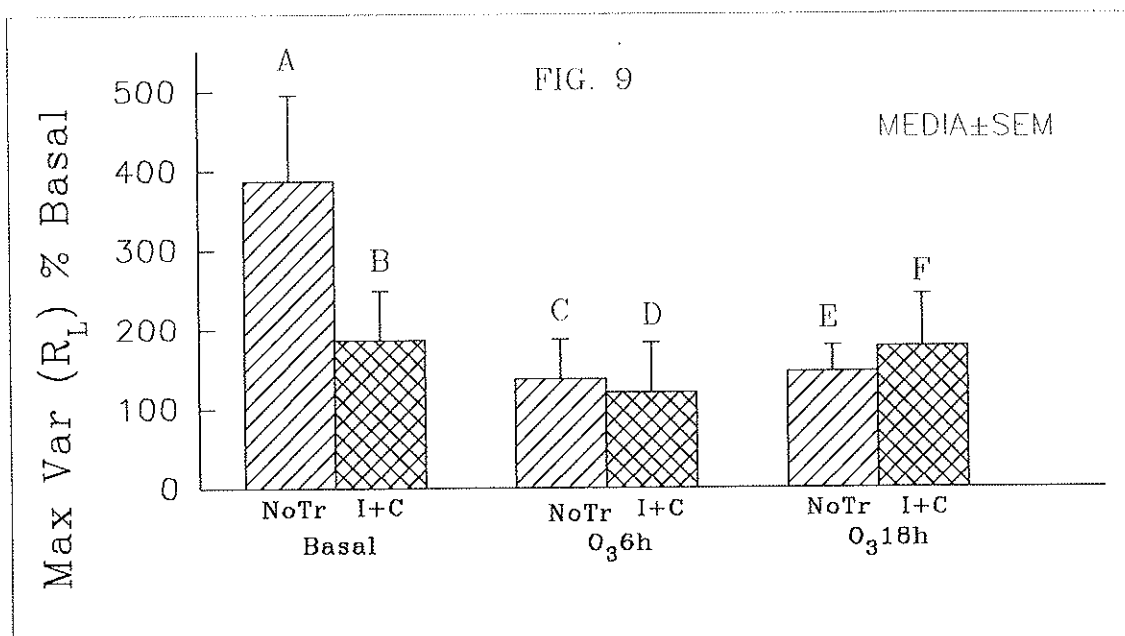


Curiosament també s'aprecia que el tractament produeix una devallada de l'ordre del 40% en la supervivència del grup 6 h, que pot està relacionada amb la circumstància de que és el grup que tolera dosis màximes de Metacolina més baixes. Però l'administració del tractament a les 18 h , quan ja s'ha establert la inflamació , i la única conseqüència que aporta és la inhibició de l'alliberament de mediadors inflamatoris i Histamina , resulta beneficiosa, augmentant l'index de Supervivència del grup F.

- **BASR i BASE:** RESISTENCIA I ELASTÀNCIA EN CONDICIONS BASALS. Aquests paràmetres ens descriuran l'estat inicial dels individus abans del Test de Metacolina (Fig. 7 i 8).

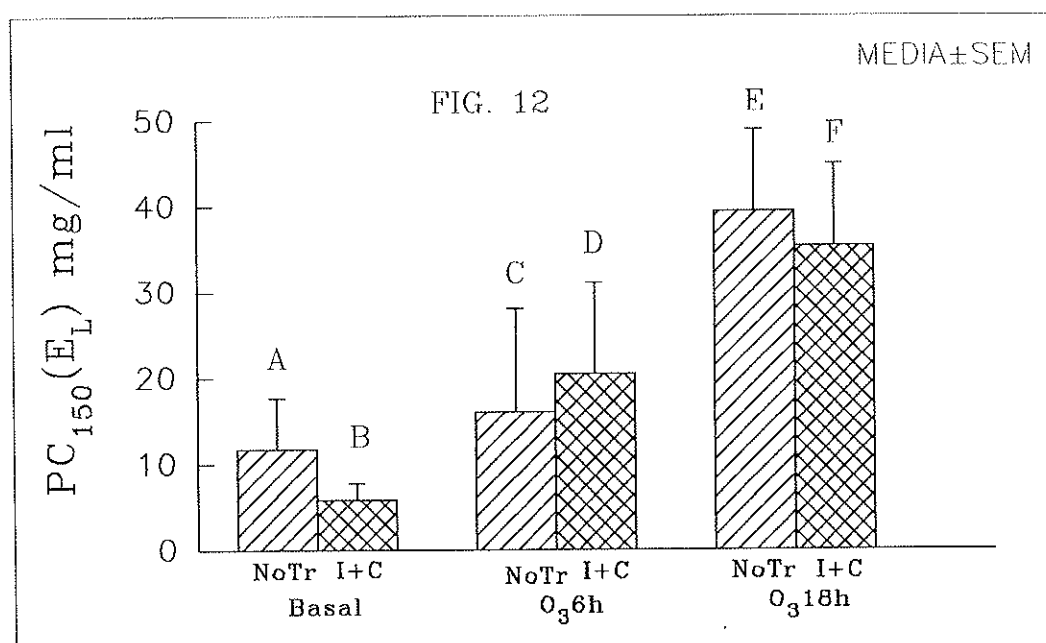
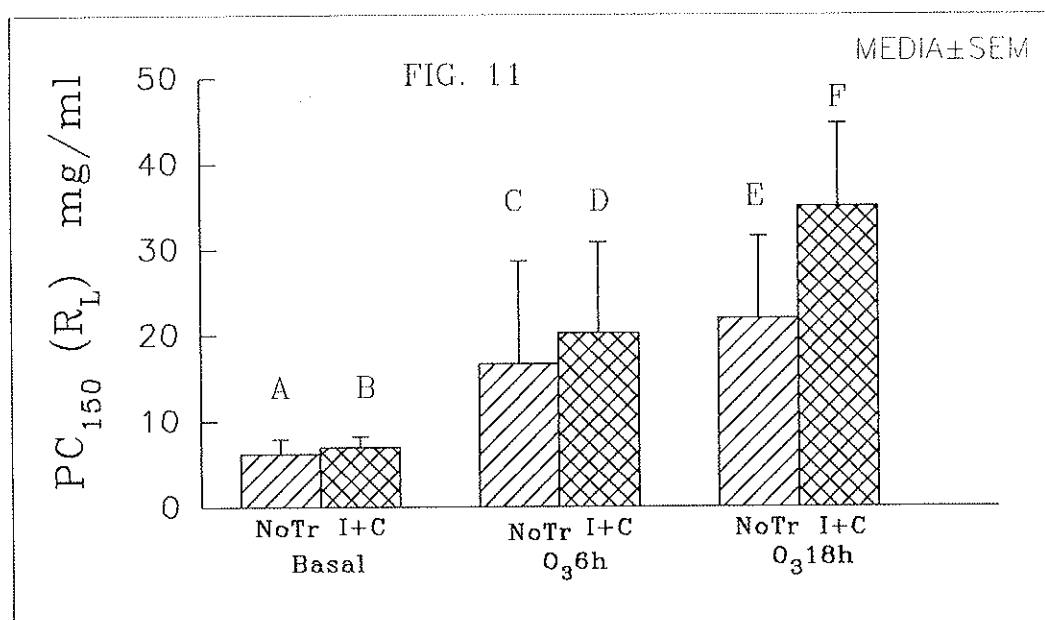


- **MXVarR i MXVarE:** VARIACIÓ MÀXIMA DE LA RESISTÈNCIA I L'ELASTÀNCIA RESPECTE DELS BASALS durant l'administració de la Metacolina (Fig. 9 i 10). Aquests paràmetres ens indiquen la magnitud de la resposta broncoconstrictora obtinguda respecte dels valors basals.



S' ha de remarcar que el grup on s'aconsegueix una resposta més important és el grup control (*A*) amb individus teòricament intactes, mentre que la magnitud de resposta pels grups *D* i *F* és petita circumstància també relacionada amb la seva gran mortalitat.

- **PC150R i PC150E** : PUNTS CRÍTICS 150. Concentració de Metacolina a la qual els valors de Resistència i Elastància són de l'ordre del 150% dels valors basals de referencia.(Fig.11 i 12).

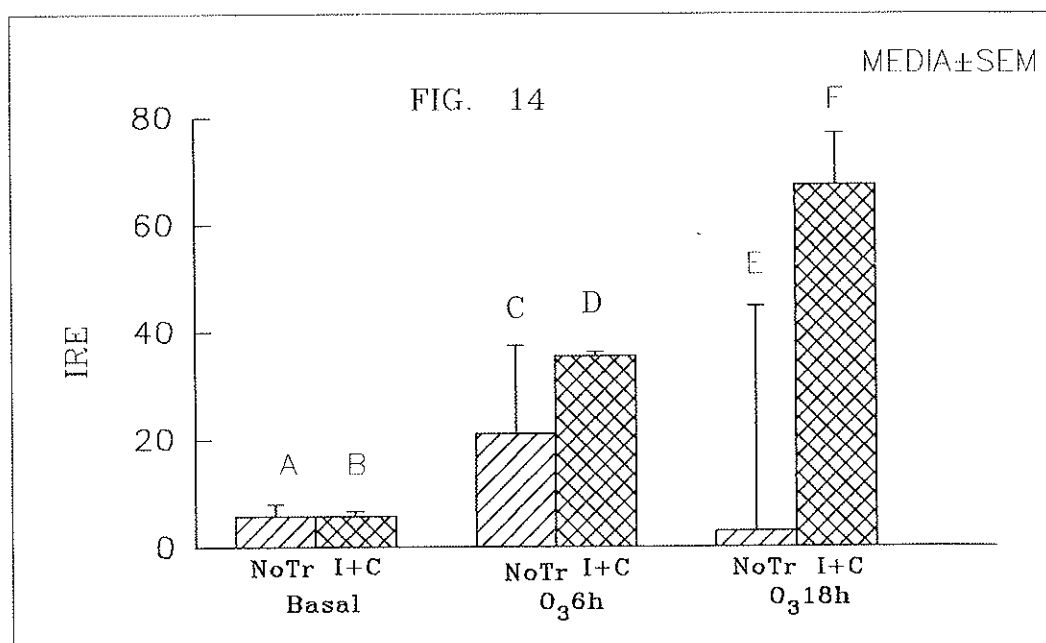
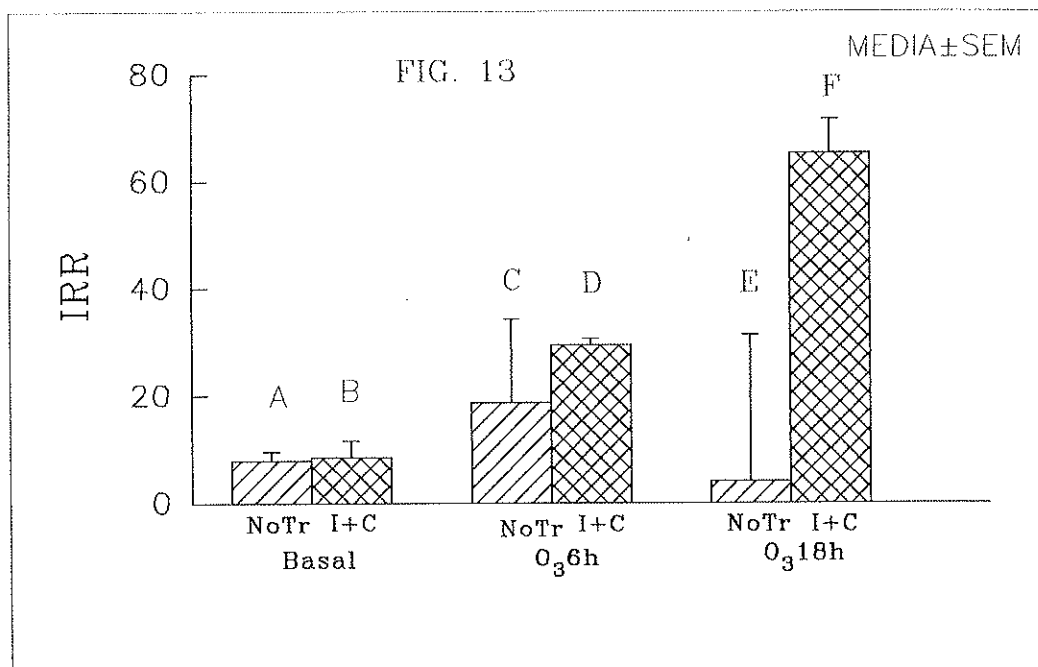


El baix valor de PC_{150} obtinguda pels grups control (*A* i *B*) indica que la corba dosi-resposta té un valor de pendent constant i mantingut , mentre que ens els altres grups (*C*, *D*, *E* i *F*) la variació es dona de manera brusca, aquest punt es relaciona amb les diferències en els index de supervivència.

- IRR i IRE: INDEX DE REACTIVITAT calculats com:

$$\text{IRR} = \text{MXR} / \text{DMX}$$

$$\text{IRE} = \text{MXE} / \text{DMX} \text{ (Fig. 13 i 14)}$$



És de destacar que el grup més reactiu és l' F.

RESULTATS:

GRUP	PES (M±SEM)	O ₃ ppm	TCT	DMX	SUP. (%)
A. CONTROL BASAL	279.5±7.37	0	SF	52±6.4	100
B. CONTROL I+C	276.8±6.30	0	I+C	25.6±9.6	100
C. CONTROL O ₃ 6 h	274.8±20.8	4.1	SF	34.4±13	80
D. CONTROL O ₃ 18 h	284.8±25.9	4.4	SF	35.2±7.8	60
E. O ₃ 6 h I+C	245.2±15.7	3.8	I+C	2.8±0.42	50
F. O ₃ 18 h I+C	232.5±7.04	4.2	I+C	31.2±9.02	80

GRUP	PC ₁₅₀ E	IRE	PC ₁₅₀ R	IRR
A. CONTROL BASAL	11.7±5.97	5.7±2.27	6.2±1.7	7.9±1.7
B. CONTROL I+C	5.8±1.96	5.8±0.87	6.9±1.3	8.5±3.1
C. CONTROL O ₃ 6 h	16±12.05	21.1±16.4	16.6±12	18.7±15.5
D. CONTROL O ₃ 18 h	39.4±10.7	3±0.8	21.9±10.6	4±1.25
E. O ₃ 6 h I+C	20.4±9.52	35.5±41.9	20.2±9.56	29.4±27.4
F. O ₃ 18 h I+C	35.4±9.61	67.5±9.6	35±9.71	65.3±6.33

GRUP	BasR	MxVarR %	BasE	MxVarE %
A. CONTROL BASAL	0.2±0.01	387.3±108	4.6±0.25	201.5±25.4
B. CONTROL I+C	0.3±0.05	186.3±61.57	4.6±0.36	135±39.05
C. CONTROL O ₃ 6 h	0.2±0.02	137.1±50.08	4±0.34	150.7±51.4
D. CONTROL O ₃ 18 h	0.3±0.04	145.6±63.22	5±0.56	106.5±37.9
E. O ₃ 6 h I+C	0.2±0.02	119.9±32.99	4.8±0.6	112.8±39.7
F. O ₃ 18 h I+C	0.2±0.01	177.4±65.58	4.4±0.34	151.1±49.7

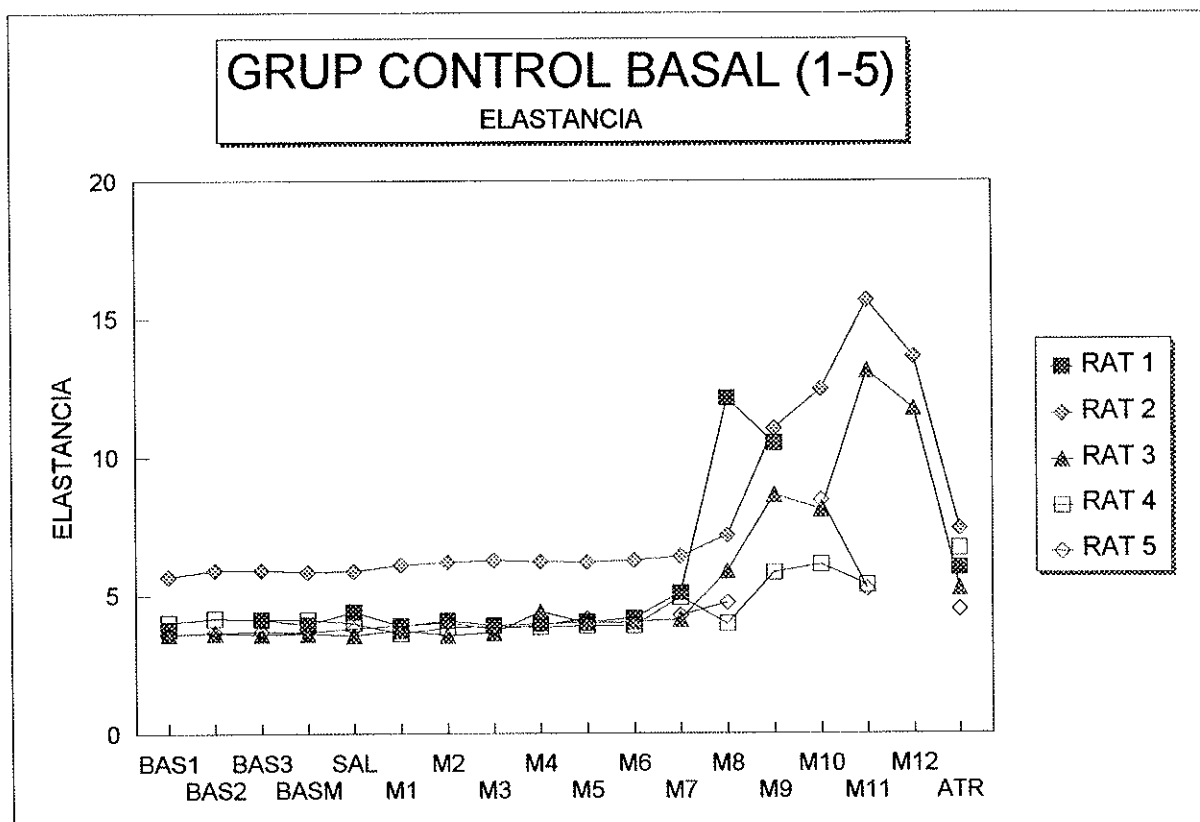
RESULTATS INDIVIDUALS

ELASTÀNCIA

GRUP CONTROL BASAL

ELASTANCIA

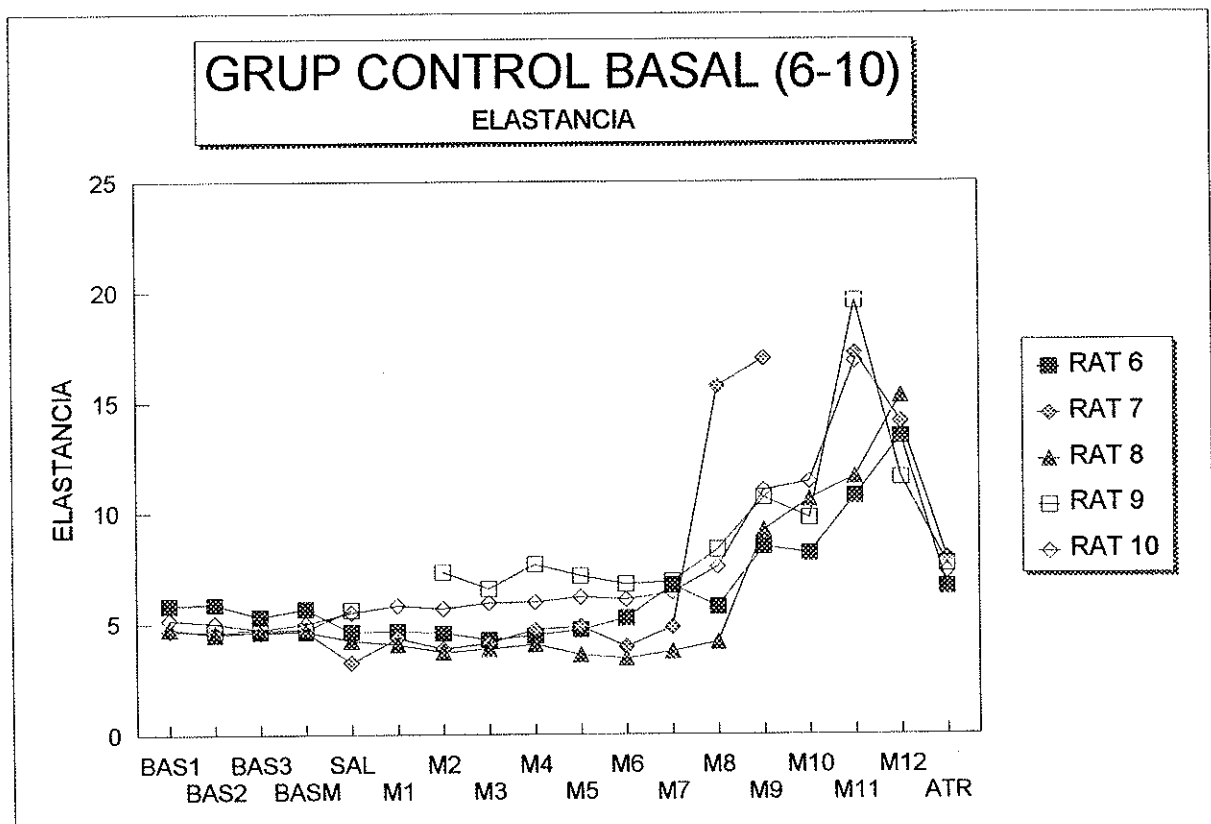
	<u>RAT1</u>	<u>RAT2</u>	<u>RAT3</u>	<u>RAT4</u>	<u>RAT5</u>
BAS1	3,77	5,68	3,58	4,03	3,59
BAS2		5,89	3,63	4,17	3,66
BAS3	4,11	5,89	3,58	4,12	3,67
BASM	3,94	5,82	3,60	4,11	3,64
SAL	4,40	5,86	3,53	3,97	3,78
M1	3,88	6,08	3,72	3,61	3,91
M2	4,06	6,19	3,54	3,82	4,00
M3	3,92	6,25	3,62	3,87	3,77
M4	3,95	6,21	4,39	3,83	3,92
M5	4,03	6,17	3,98	3,87	4,13
M6	4,17	6,24	4,02	3,87	
M7	5,07	6,40	4,12	4,91	4,26
M8	12,12	7,15	5,85	3,95	4,71
M9	10,48	11,03	8,61	5,80	
M10		12,43	8,08	6,09	8,43
M11		15,65	13,10	5,34	5,20
M12		13,62	11,74		
ATR	5,97	7,39	5,22	6,67	4,47



GRUP CONTROL BASAL

ELASTANCIA

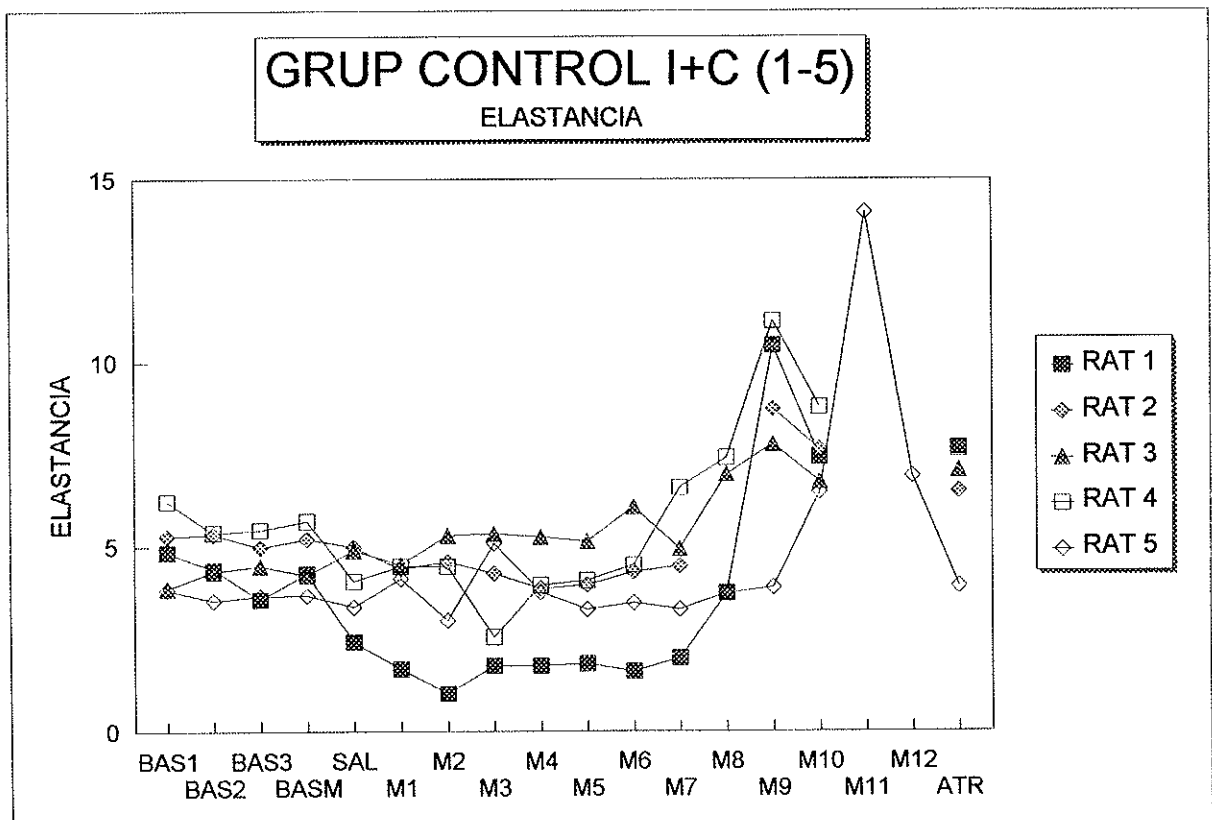
	<u>RAT6</u>	<u>RAT7</u>	<u>RAT8</u>	<u>RAT9</u>	<u>RAT10</u>
BAS1	5,85	4,68	4,76		5,18
BAS2	5,87	4,59	4,52	4,69	5,03
BAS3	5,33	4,58	4,62	4,7	4,75
BASM	5,68	4,62	4,63	4,70	4,99
SAL	4,62	3,22	4,22	5,6	5,49
M1	4,65	4,33	4,03		5,8
M2	4,57	3,84	3,69	7,31	5,67
M3	4,24	4,11	3,83	6,56	5,93
M4	4,45	4,72	4,03	7,66	5,94
M5	4,72	4,86	3,57	7,14	6,19
M6	5,24	3,94	3,4	6,75	6,08
M7	6,71	4,82	3,73	6,88	6,39
M8	5,75	15,73	4,15	8,32	7,54
M9	8,46	16,96	9,21	10,67	11,01
M10	8,15		10,59	9,74	11,4
M11	10,75	17,23	11,64	19,59	16,84
M12	13,42	14,08	15,28	11,58	
ATR	6,63	7,93		7,66	7,31



GRUP CONTROL I+C Pre

ELASTANCIA

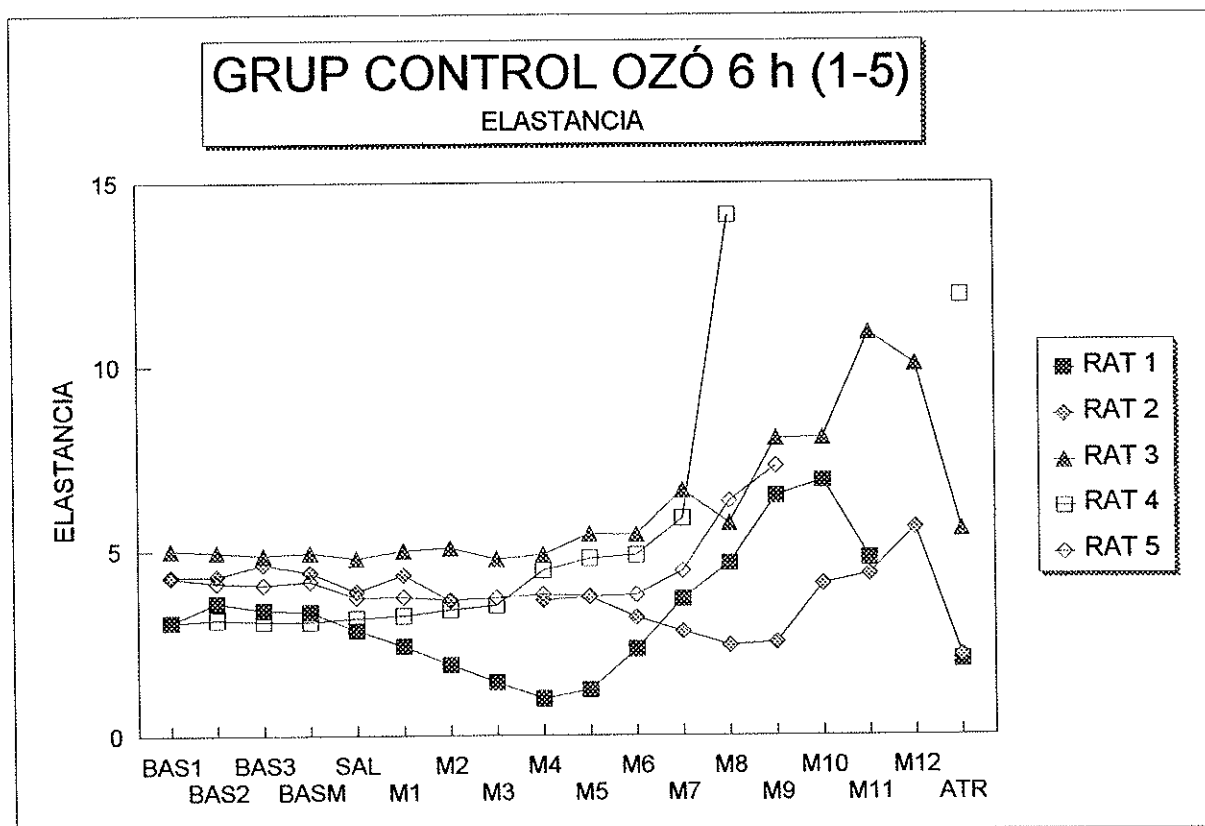
	<u>RAT1</u>	<u>RAT2</u>	<u>RAT3</u>	<u>RAT4</u>	<u>RAT5</u>
BAS1	4,84	5,27	3,87	6,23	3,84
BAS2	4,39	5,33	4,33	5,38	3,54
BAS3	3,58	4,99	4,48	5,44	3,66
BASM	4,27	5,20	4,23	5,68	3,68
SAL	2,41	4,99	4,89	4,06	3,37
M1	1,67	4,39	4,51	4,47	4,13
M2	1,02	4,59	5,30	4,45	2,99
M3	1,77	4,27	5,35	2,55	5,09
M4	1,76	3,86	5,26	3,95	3,77
M5	1,82	3,95	5,14	4,08	3,30
M6	1,60	4,31	6,08	4,50	3,47
M7	1,97	4,45	4,93	6,60	3,30
M8	3,72		6,96	7,42	3,72
M9	10,45	8,73	7,78	11,13	3,88
M10	7,44	7,64	6,76	8,78	6,48
M11					14,08
M12					6,91
ATR	7,69	6,49	7,06	7,64	3,93



GRUP CONTROL OZO 6h

ELASTANCIA

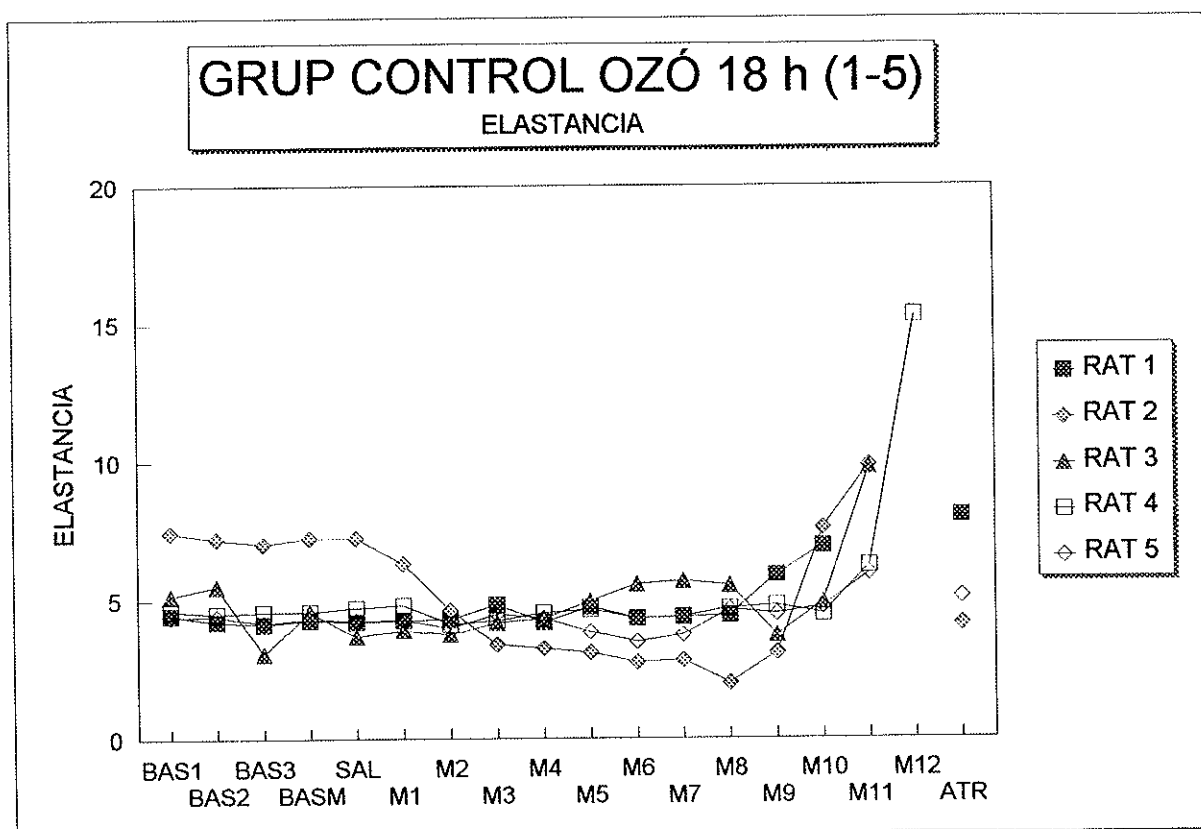
	RAT1	RAT2	RAT3	RAT4	RAT5
BAS1	3,06	4,30	5,01	3,06	4,27
BAS2	3,59	4,31	4,96	3,13	4,13
BAS3	3,41	4,63	4,87	3,08	4,08
BASM	3,35	4,41	4,95	3,09	4,16
SAL	2,85	3,88	4,79	3,17	3,74
M1	2,41	4,34	5,00	3,25	3,75
M2	1,91	3,64	5,07	3,40	3,67
M3	1,43		4,77	3,52	3,74
M4	0,98	3,67	4,90	4,47	3,82
M5	1,23	3,75	5,44	4,80	3,77
M6	2,32	3,19	5,43	4,87	3,79
M7	3,70	2,81	6,64	5,87	4,44
M8	4,65	2,43	5,73	14,11	6,34
M9	6,47	2,52	8,04		7,29
M10	6,89	4,10	8,06		
M11	4,79	4,35	10,90		
M12		5,60	10,06		
ATR	2,03	2,15	5,55	11,91	



GRUP OZO CONTROL 18h

ELASTANCIA

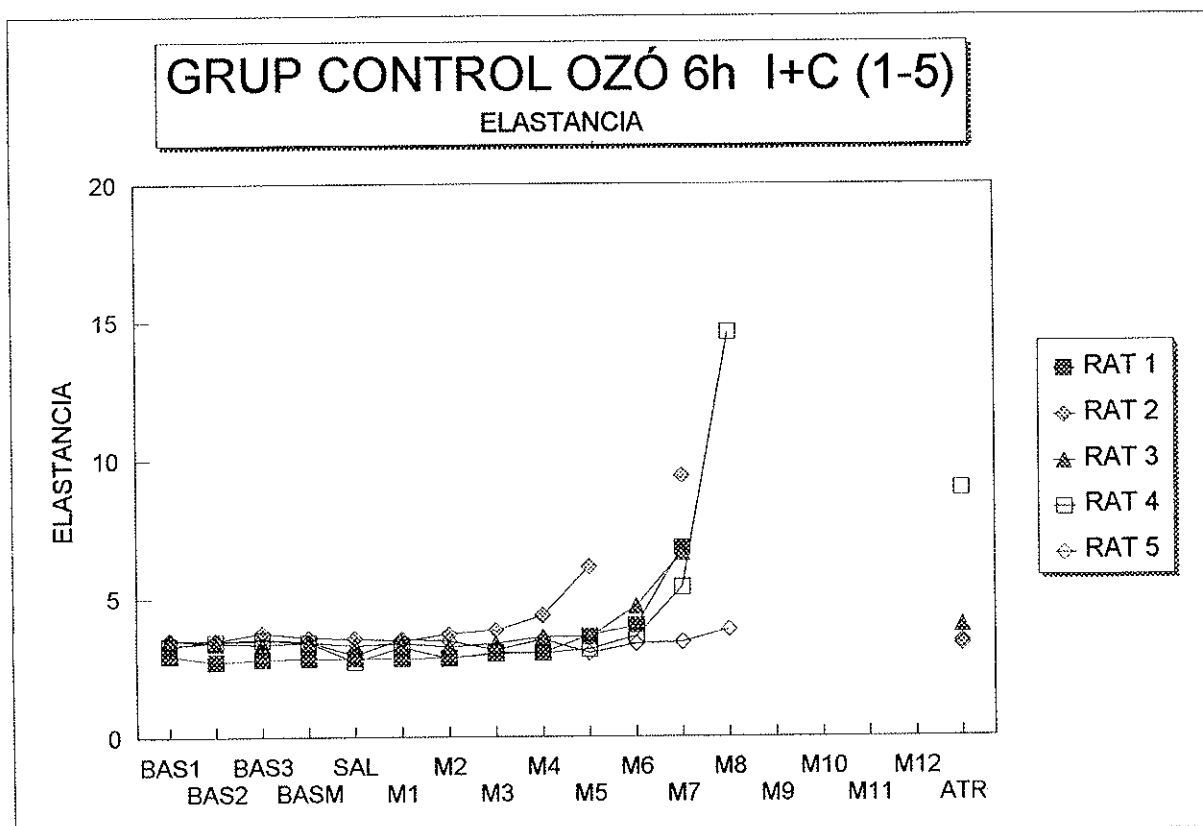
	<u>RAT1</u>	<u>RAT2</u>	<u>RAT3</u>	<u>RAT4</u>	<u>RAT5</u>
BAS1	4,46	7,45	5,16	4,63	4,41
BAS2	4,24	7,21	5,51	4,51	4,41
BAS3	4,13	7,04	3,05	4,58	4,18
BASM	4,28	7,23	4,57	4,57	4,33
SAL	4,21	7,25	3,68	4,71	4,25
M1	4,28	6,31	3,92	4,81	4,27
M2	4,30	4,63	3,74	4,13	4,01
M3	4,84	3,38	4,18	4,25	4,48
M4	4,18	3,24	4,32	4,54	4,36
M5	4,74	3,07	4,95	4,64	3,84
M6	4,31	2,73	5,56	4,32	3,48
M7	4,37	2,79	5,66	4,39	3,72
M8	4,43	1,98	5,51	4,70	4,65
M9	5,91	3,08	3,73	4,78	4,48
M10	6,93	7,58	4,90	4,49	4,73
M11		9,87	9,80	6,22	5,95
M12				15,32	
ATR	8,03	4,12			5,10



GRUP OZO 6h I+C Pre

ELASTANCIA

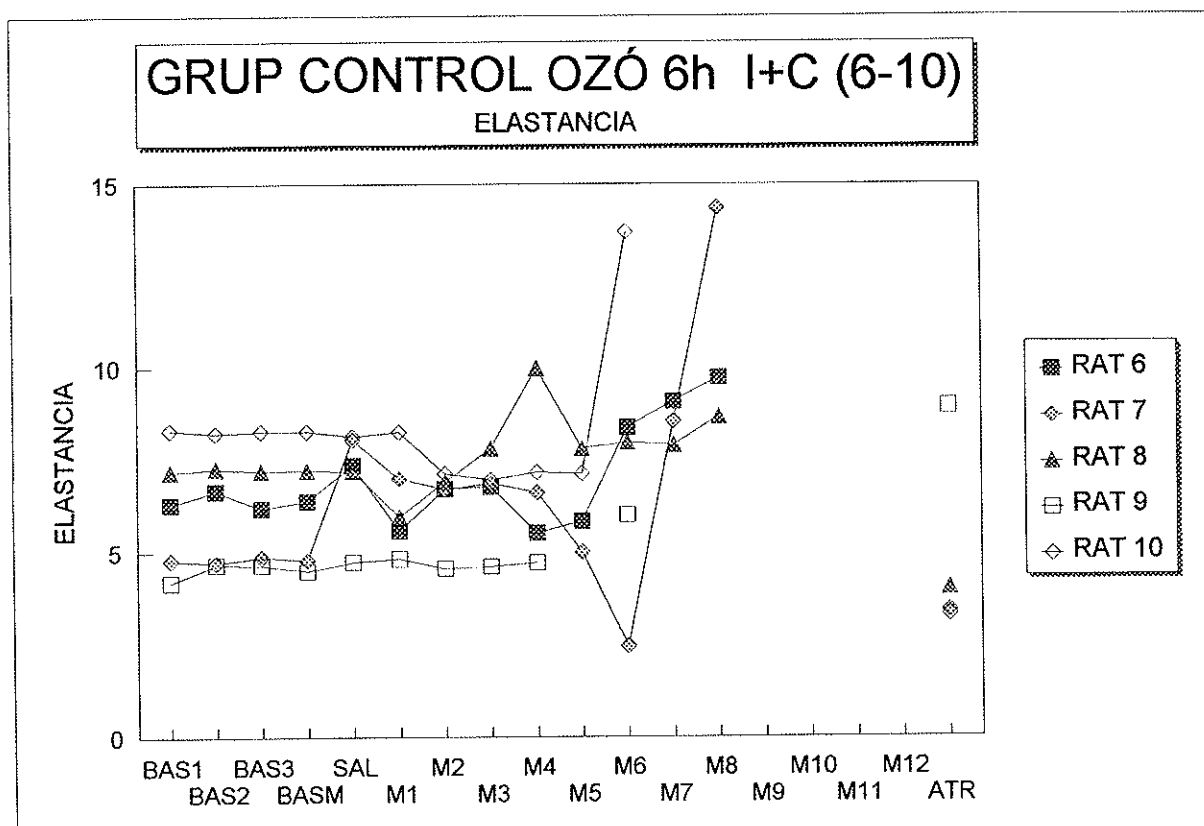
	<u>RAT1</u>	<u>RAT2</u>	<u>RAT3</u>	<u>RAT4</u>	<u>RAT5</u>
BAS1	2,93	3,49	3,50	3,29	3,28
BAS2	2,71	3,48	3,37	3,41	3,44
BAS3	2,79	3,74	3,32	3,50	3,51
BASM	2,81	3,57	3,40	3,40	3,41
SAL	2,81	3,53	3,28	2,69	2,94
M1	2,81	3,45	3,34	3,21	3,51
M2	2,85	3,70	3,24	2,83	3,43
M3	2,97	3,83	3,34	3,04	3,11
M4	3,04	4,37	3,58	3,00	3,49
M5	3,63	6,13	3,59	3,14	3,00
M6	4,00		4,69	3,60	3,32
M7	6,80	9,43	6,61	5,39	3,40
M8				14,61	3,85
M9					
M10					
M11					
M12					
ATR		3,39	4,01	8,94	3,30



GRUP OZO 6h I+C Pre

ELASTANCIA

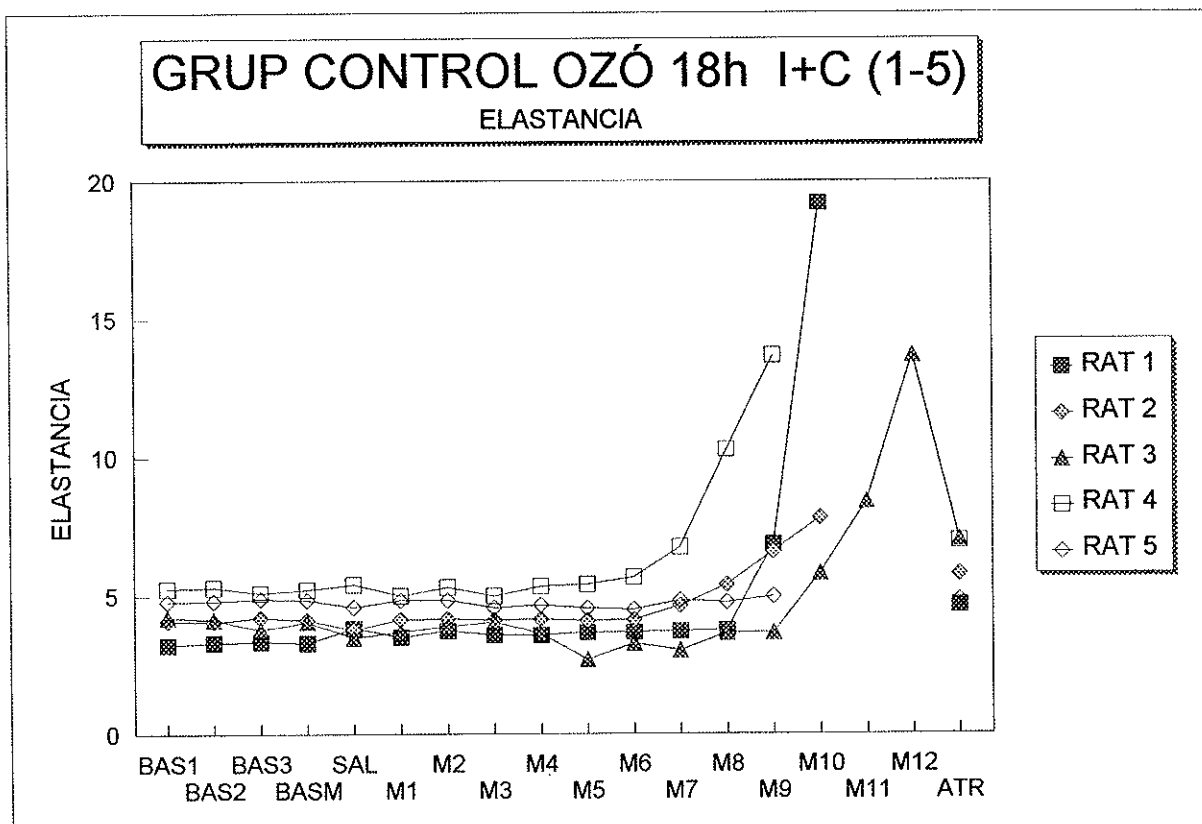
	<u>RAT6</u>	<u>RAT7</u>	<u>RAT8</u>	<u>RAT9</u>	<u>RAT10</u>
BAS1	6,31	4,79	7,19	4,18	8,32
BAS2	6,67	4,73	7,28	4,67	8,23
BAS3	6,20	4,87	7,21	4,65	8,28
BASM	6,39	4,80	7,23	4,50	8,28
SAL	7,36	8,05	7,20	4,74	8,15
M1	5,58	7,00	5,96	4,83	8,27
M2	6,72	6,71	6,92	4,57	7,13
M3	6,77	6,86	7,81	4,62	6,96
M4	5,53	6,61	9,98	4,72	7,17
M5	5,83	5,00	7,81		7,14
M6	8,37	2,45	7,97	6,01	13,70
M7	9,08	8,55	7,91		
M8	9,72	14,33	8,67		
M9					
M10					
M11					
M12					
ATR		3,39	4,01	8,94	3,30



GRUP OZO 18h I+C Pre

ELASTANCIA

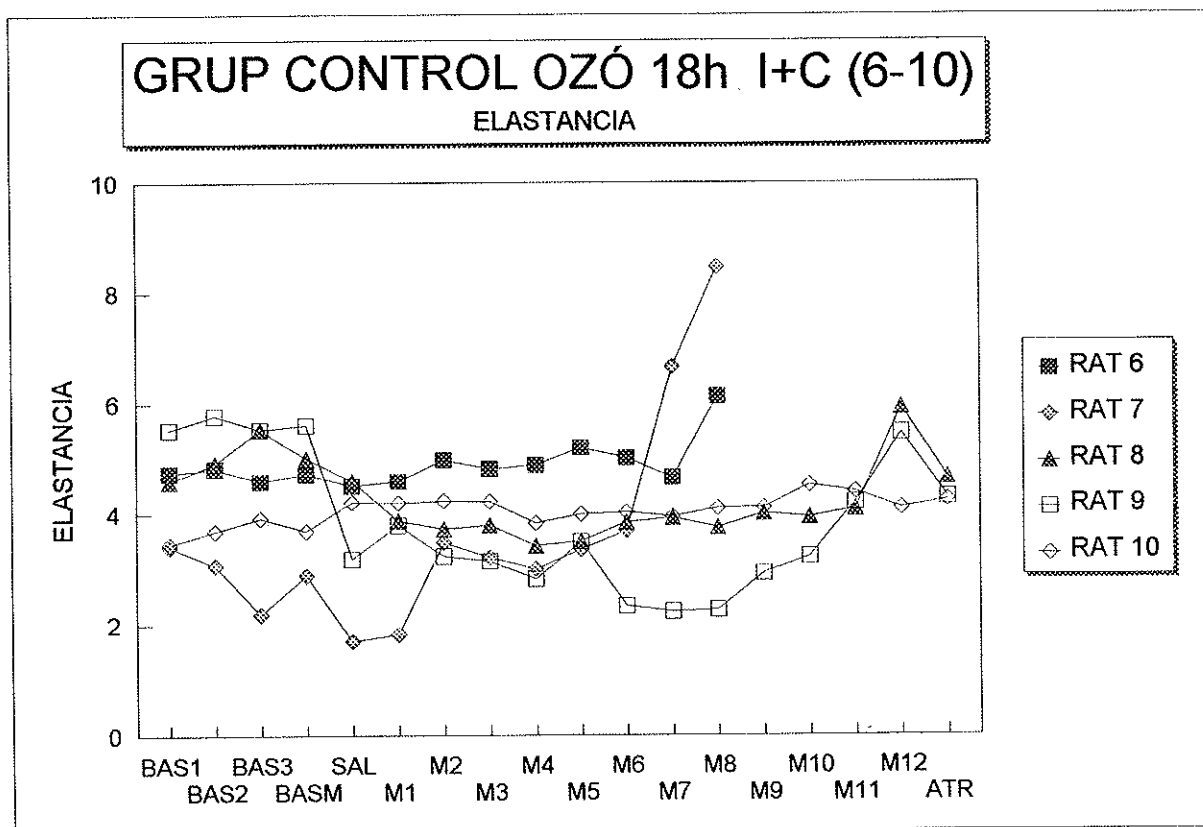
	<u>RAT1</u>	<u>RAT2</u>	<u>RAT3</u>	<u>RAT4</u>	<u>RAT5</u>
BAS1	3,22	4,10	4,24	5,25	4,78
BAS2	3,30	4,06	4,14	5,30	4,81
BAS3	3,32	4,21	3,77	5,09	4,88
BASM	3,28	4,12	4,05	5,21	4,82
SAL	3,81	3,77	3,46	5,39	4,59
M1	3,49	4,13	3,67	5,00	4,83
M2	3,73	4,17	3,89	5,31	4,83
M3	3,56	4,11	4,04	4,97	4,55
M4	3,56	4,13	3,60	5,33	4,64
M5	3,64	4,08	2,68	5,39	4,54
M6	3,64	4,11	3,25	5,64	4,48
M7	3,70	4,62	3,00	6,73	4,81
M8	3,75	5,36	3,62	10,28	4,73
M9	6,84	6,57	3,64	13,66	4,94
M10	19,17	7,78	5,79		
M11			8,39		
M12			13,66		
ATR	4,62	5,74	7,00	6,94	4,81



GRUP OZO 18h I+C Pre

ELASTANCIA

	<u>RAT6</u>	<u>RAT7</u>	<u>RAT8</u>	<u>RAT9</u>	<u>RAT10</u>
BAS1	4,75	3,42	4,59	5,53	3,46
BAS2	4,83	3,08	4,92	5,79	3,69
BAS3	4,59	2,19	5,54	5,53	3,92
BASM	4,72	2,90	5,02	5,62	3,69
SAL	4,51	1,7	4,61	3,19	4,21
M1	4,60	1,83	3,88	3,8	4,2
M2	4,98	3,48	3,73	3,24	4,24
M3	4,82	3,22	3,79	3,15	4,22
M4	4,89	3,01	3,43	2,82	3,83
M5	5,20	3,35	3,51	3,49	3,99
M6	5,01	3,69	3,84	2,34	4,03
M7	4,65	6,66	3,92	2,23	3,95
M8	6,12	8,47	3,75	2,26	4,1
M9			4	2,93	4,11
M10			3,93	3,23	4,52
M11			4,09	4,2	4,4
M12			5,93	5,46	4,1
ATR			4,65	4,3	4,25



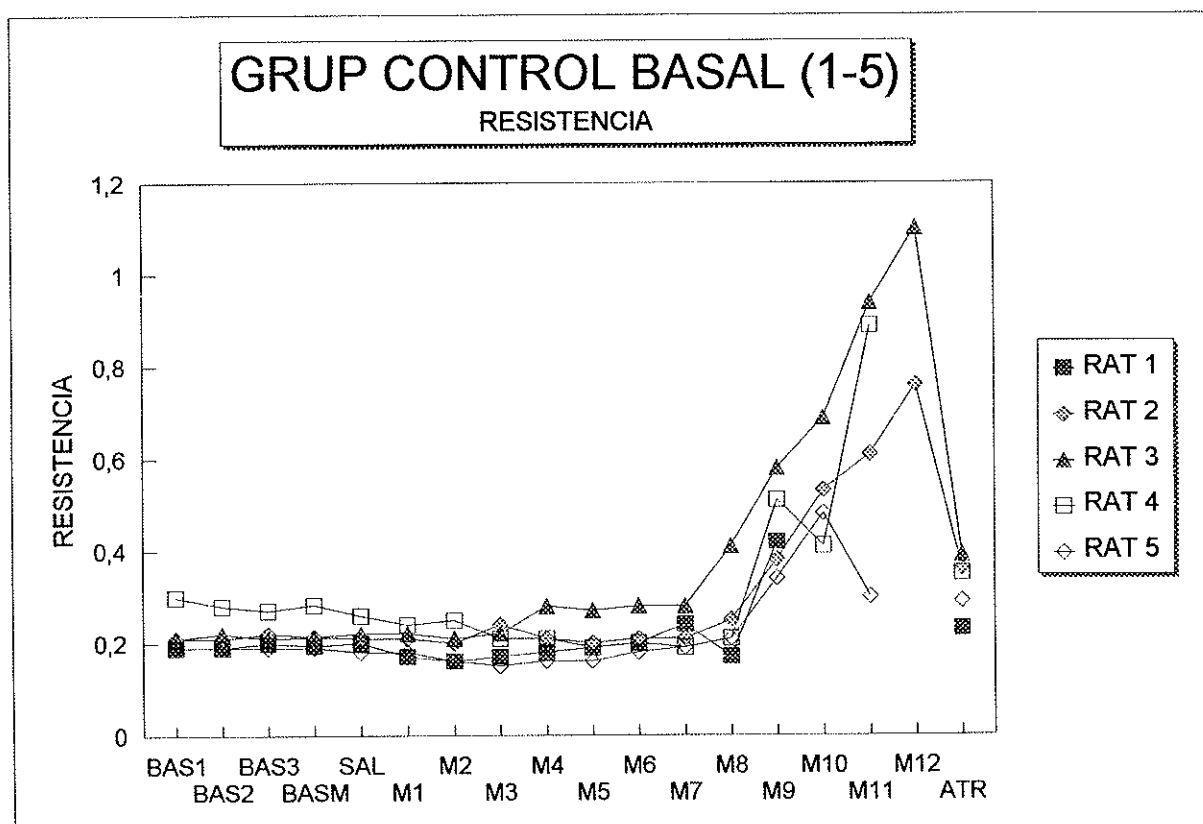
RESULTATS INDIVIDUALS

RESISTÈNCIA

GRUP CONTROL BASAL

RESISTENCIA

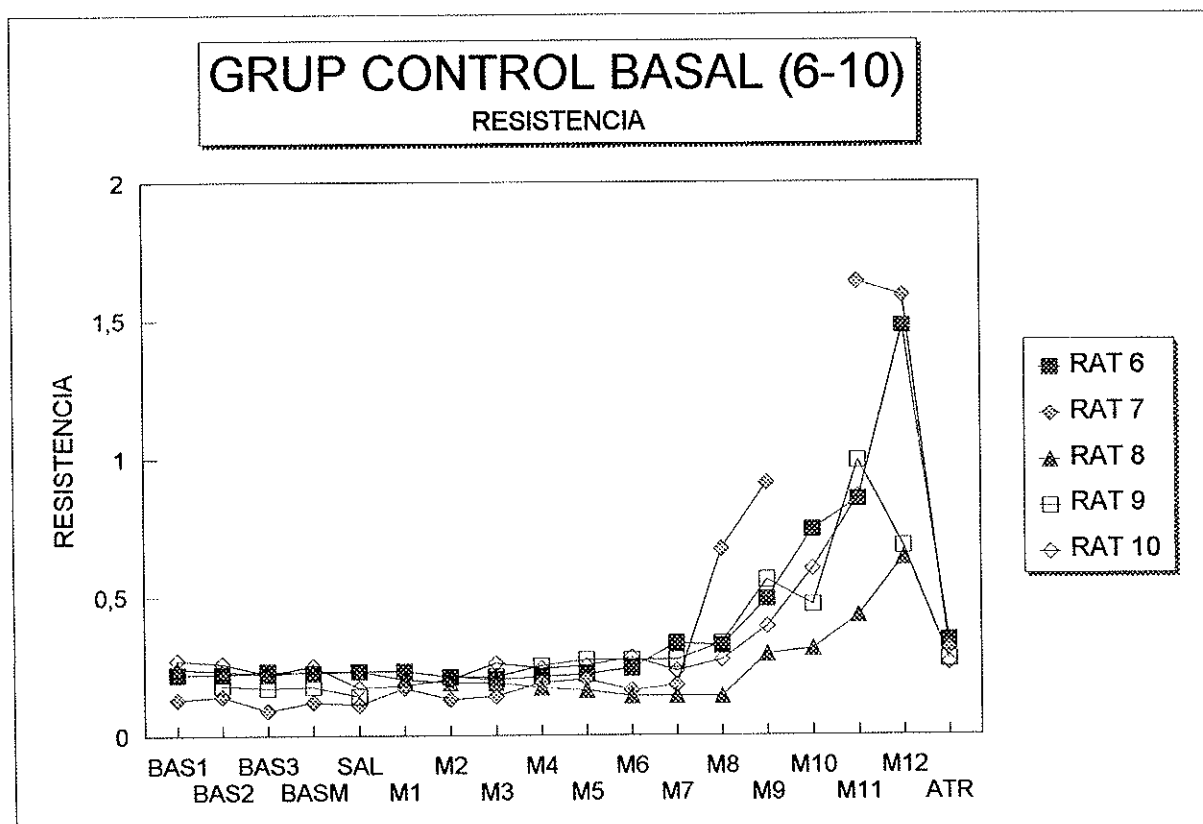
	RAT1	RAT2	RAT3	RAT4	RAT5
BAS1	0,19	0,21	0,21	0,30	0,19
BAS2	0,19	0,21	0,22	0,28	0,19
BAS3	0,20	0,22	0,21	0,27	0,19
BASM	0,19	0,21	0,21	0,28	0,19
SAL	0,20	0,21	0,22	0,26	0,18
M1	0,17	0,21	0,22	0,24	0,18
M2	0,16	0,20	0,21	0,25	0,16
M3	0,17	0,24	0,22	0,21	0,15
M4	0,18	0,21	0,28	0,21	0,16
M5	0,19	0,20	0,27	0,19	0,16
M6	0,20	0,21	0,28	0,20	0,18
M7	0,24	0,21	0,28	0,19	0,19
M8	0,17	0,25	0,41	0,21	0,21
M9	0,42	0,38	0,58	0,51	0,34
M10		0,53	0,69	0,41	0,48
M11		0,61	0,94	0,89	0,30
M12		0,76	1,10		
ATR	0,23	0,36	0,39	0,35	0,29



GRUP CONTROL BASAL

RESISTENCIA

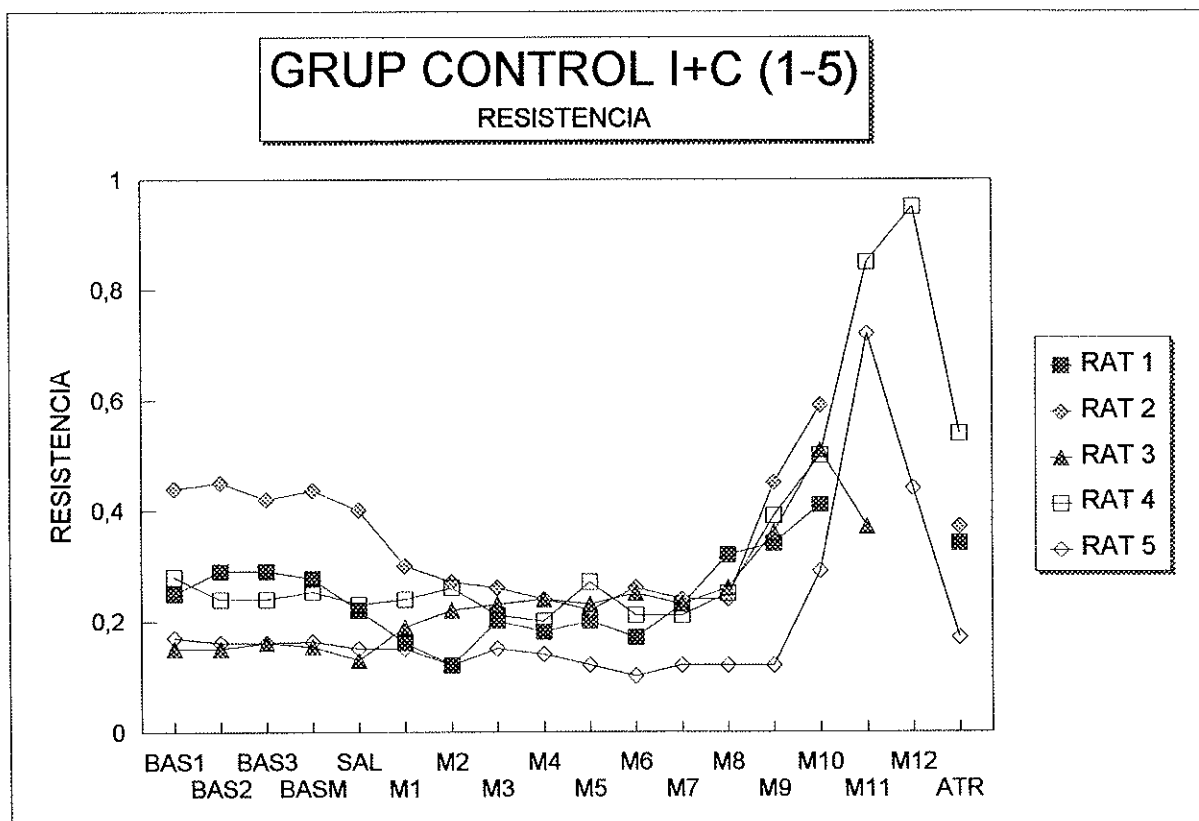
	<u>RAT6</u>	<u>RAT7</u>	<u>RAT8</u>	<u>RAT9</u>	<u>RAT10</u>
BAS1	0,22	0,13	0,24		0,27
BAS2	0,22	0,14	0,23	0,18	0,26
BAS3	0,23	0,09	0,22	0,17	0,22
BASM	0,22	0,12	0,23	0,18	0,25
SAL	0,23	0,11	0,23	0,14	0,17
M1	0,23	0,17	0,2		0,18
M2	0,21	0,13	0,19	0,21	0,2
M3	0,2	0,14	0,19	0,21	0,26
M4	0,21	0,19	0,17	0,25	0,24
M5	0,22	0,2	0,16	0,27	0,25
M6	0,24	0,16	0,14	0,27	0,28
M7	0,33	0,18	0,14	0,27	0,23
M8	0,32	0,67	0,14	0,33	0,27
M9	0,49	0,91	0,29	0,56	0,39
M10	0,74		0,31	0,47	0,6
M11	0,85	1,64	0,43	0,99	0,86
M12	1,48	1,59	0,64	0,68	
ATR	0,34	0,31		0,27	0,26



GRUP CONTROL I+C Pre

RESISTENCIA

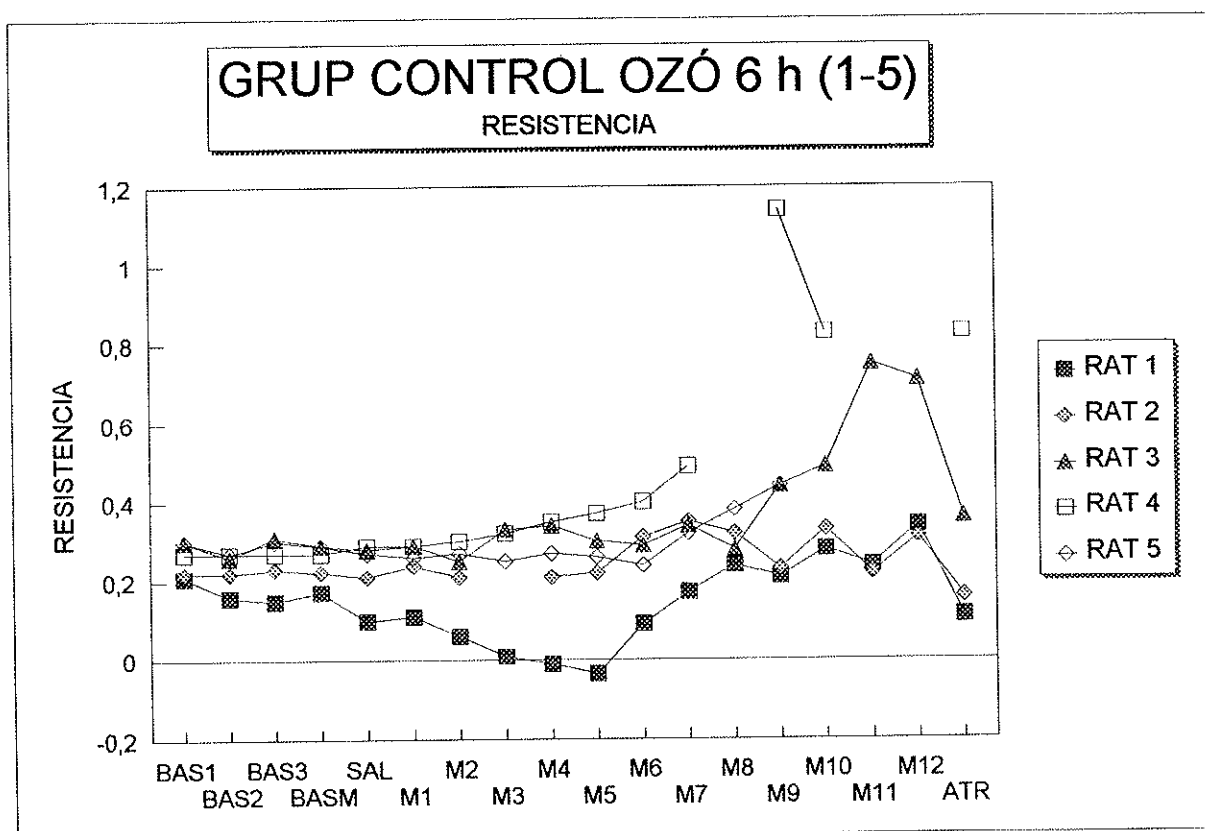
	<u>RAT1</u>	<u>RAT2</u>	<u>RAT3</u>	<u>RAT4</u>	<u>RAT5</u>
BAS1	0,25	0,44	0,15	0,28	0,17
BAS2	0,29	0,45	0,15	0,24	0,16
BAS3	0,29	0,42	0,16	0,24	0,16
BASM	0,28	0,44	0,15	0,25	0,16
SAL	0,22	0,40	0,13	0,23	0,15
M1	0,16	0,30	0,19	0,24	0,15
M2	0,12	0,27	0,22	0,26	0,12
M3	0,20	0,26	0,23	0,21	0,15
M4	0,18	0,24	0,24	0,20	0,14
M5	0,20	0,22	0,23	0,27	0,12
M6	0,17	0,26	0,25	0,21	0,10
M7	0,23	0,24	0,23	0,21	0,12
M8	0,32	0,24	0,26	0,25	0,12
M9	0,34	0,45	0,36	0,39	0,12
M10	0,41	0,59	0,51	0,50	0,29
M11			0,37	0,85	0,72
M12				0,95	0,44
ATR	0,34	0,37		0,54	0,17



GRUP CONTROL OZO 6h

RESISTENCIA

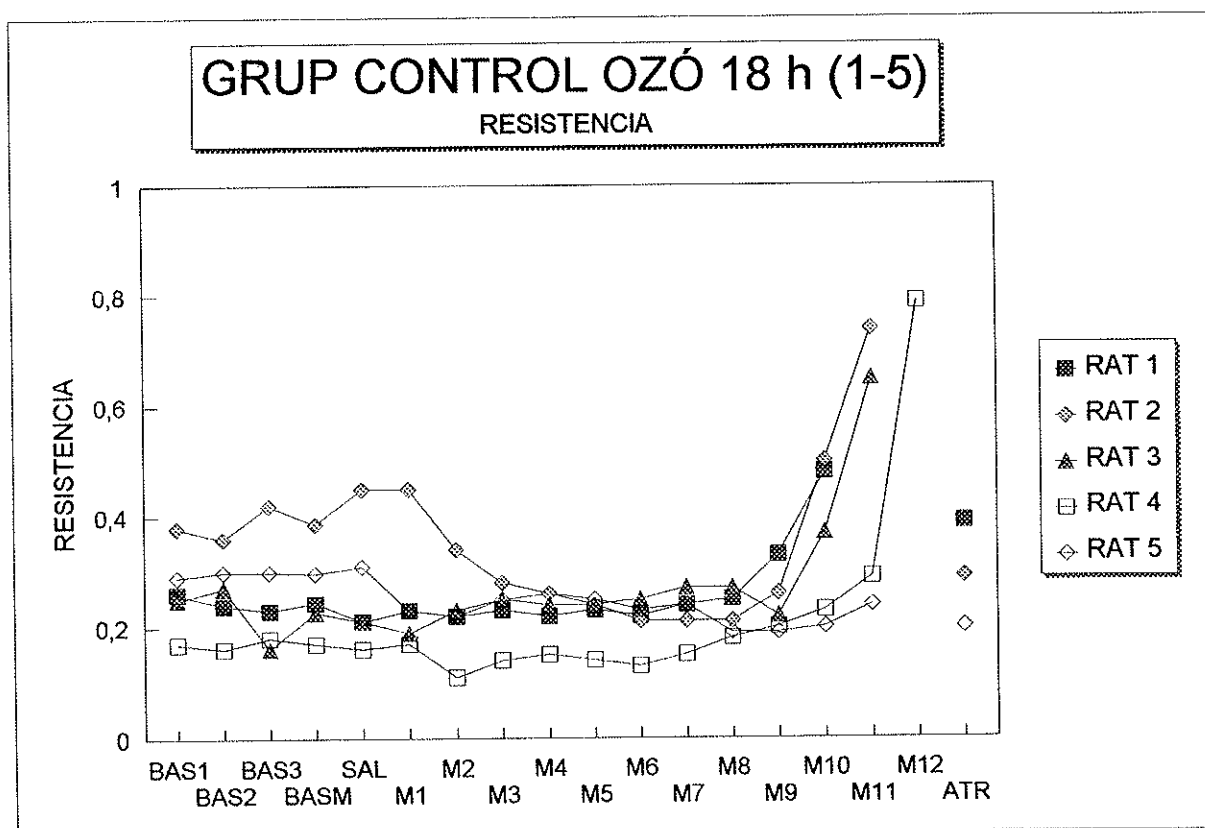
	RAT1	RAT2	RAT3	RAT4	RAT5
BAS1	0,21	0,22	0,30	0,27	0,30
BAS2	0,16	0,22	0,26	0,27	0,27
BAS3	0,15	0,23	0,31	0,27	0,30
BASM	0,17	0,22	0,29	0,27	0,29
SAL	0,10	0,21	0,28	0,29	0,27
M1	0,11	0,24	0,29	0,29	0,26
M2	0,06	0,21	0,25	0,30	0,27
M3	0,01		0,33	0,32	0,25
M4	-0,01	0,21	0,34	0,35	0,27
M5	-0,04	0,22	0,30	0,37	0,26
M6	0,09	0,31	0,29	0,40	0,24
M7	0,17	0,35	0,34	0,49	0,32
M8	0,24	0,32	0,28		0,38
M9	0,21	0,23	0,44	1,14	0,44
M10	0,28	0,33	0,49	0,83	
M11	0,24	0,22	0,75		
M12	0,34	0,31	0,71		
ATR	0,11	0,16	0,36	0,83	



GRUP OZO CONTROL 18h

RESISTENCIA

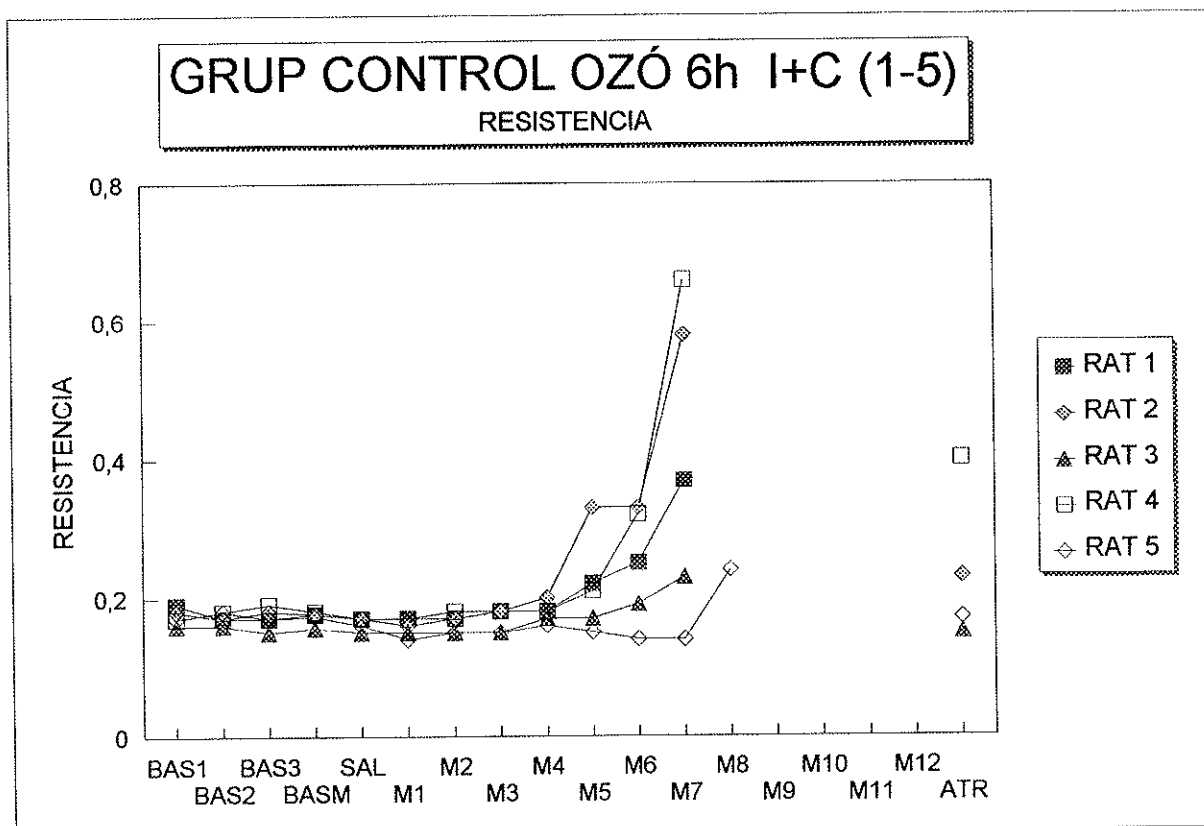
	<u>RAT1</u>	<u>RAT2</u>	<u>RAT3</u>	<u>RAT4</u>	<u>RAT5</u>
BAS1	0,26	0,38	0,25	0,17	0,29
BAS2	0,24	0,36	0,27	0,16	0,30
BAS3	0,23	0,42	0,16	0,18	0,30
BASM	0,24	0,39	0,23	0,17	0,30
SAL	0,21	0,45	0,21	0,16	0,31
M1	0,23	0,45	0,19	0,17	0,23
M2	0,22	0,34	0,23	0,11	0,22
M3	0,23	0,28	0,25	0,14	0,25
M4	0,22	0,26	0,24	0,15	0,26
M5	0,23	0,24	0,24	0,14	0,25
M6	0,22	0,21	0,25	0,13	0,23
M7	0,24	0,21	0,27	0,15	0,24
M8	0,25	0,21	0,27	0,18	0,19
M9	0,33	0,26	0,22	0,20	0,19
M10	0,48	0,50	0,37	0,23	0,20
M11		0,74	0,65	0,29	0,24
M12				0,79	
ATR	0,39	0,29			0,20



GRUP OZO 6h I+C Pre

RESISTENCIA

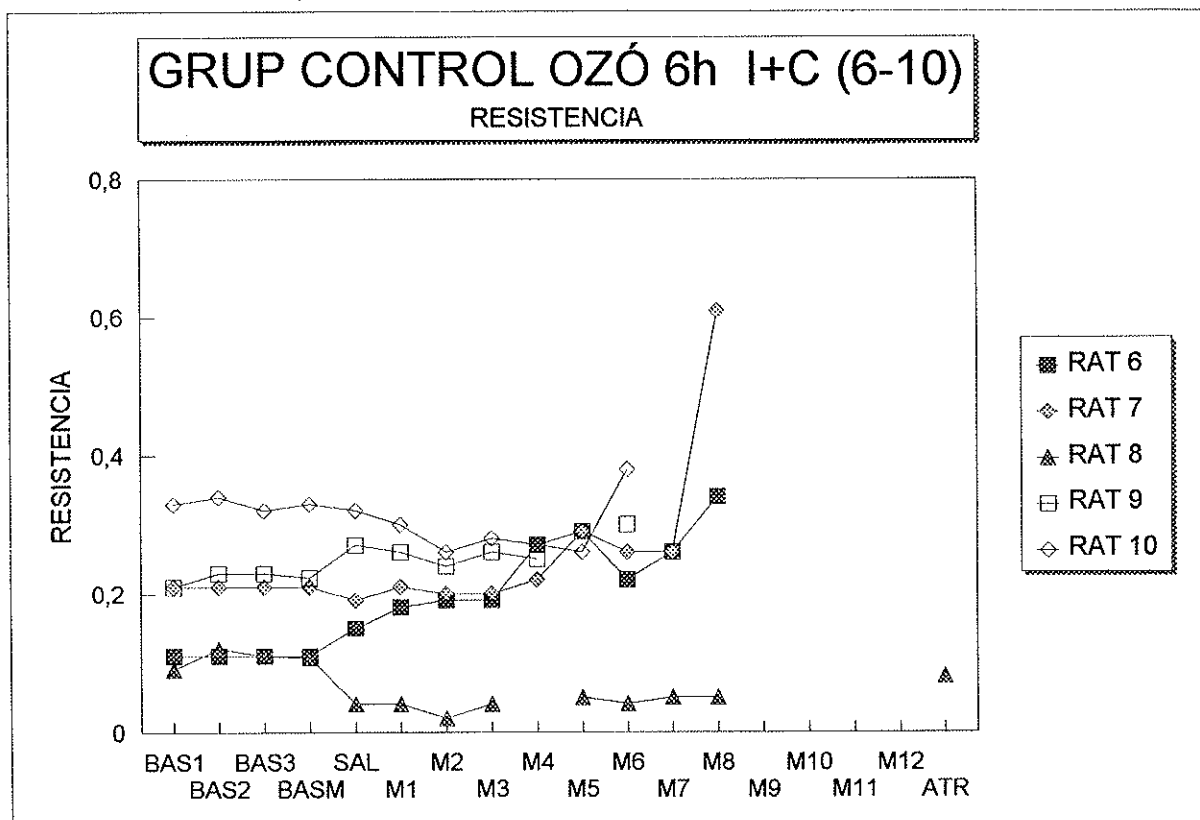
	<u>RAT1</u>	<u>RAT2</u>	<u>RAT3</u>	<u>RAT4</u>	<u>RAT5</u>
BAS1	0,19	0,18	0,16	0,17	0,17
BAS2	0,17	0,17	0,16	0,18	0,18
BAS3	0,17	0,18	0,15	0,19	0,17
BASM	0,18	0,18	0,16	0,18	0,17
SAL	0,17	0,17	0,15	0,17	0,16
M1	0,17	0,16	0,15	0,17	0,14
M2	0,17	0,17	0,15	0,18	0,15
M3	0,18	0,18	0,15	0,18	0,15
M4	0,18	0,20	0,17	0,18	0,16
M5	0,22	0,33	0,17	0,21	0,15
M6	0,25	0,33	0,19	0,32	0,14
M7	0,37	0,58	0,23	0,66	0,14
M8					0,24
M9					
M10					
M11					
M12					
ATR		0,23	0,15	0,40	0,17



GRUP OZO 6h I+C Pre

RESISTENCIA

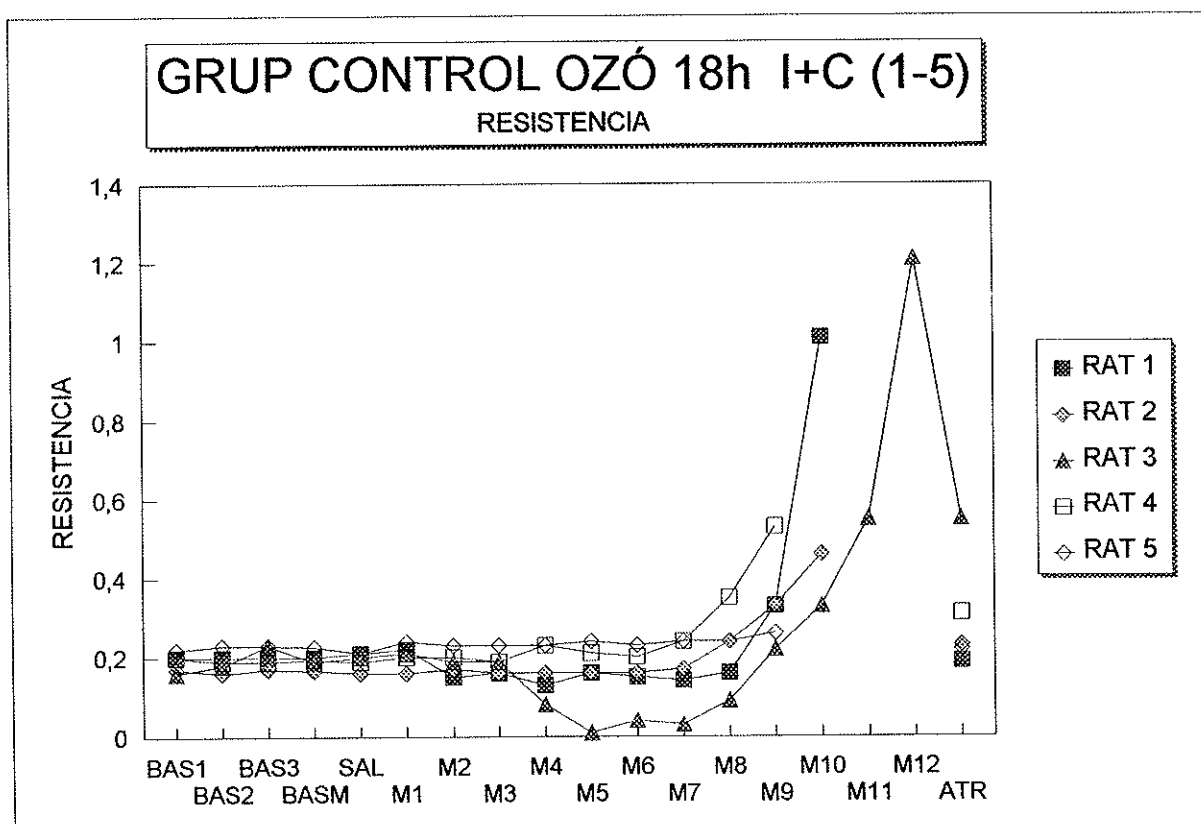
	<u>RAT6</u>	<u>RAT7</u>	<u>RAT8</u>	<u>RAT9</u>	<u>RAT10</u>
BAS1	0,11	0,21	0,09	0,21	0,33
BAS2	0,11	0,21	0,12	0,23	0,34
BAS3	0,11	0,21	0,11	0,23	0,32
BASM	0,11	0,21	0,11	0,22	0,33
SAL	0,15	0,19	0,04	0,27	0,32
M1	0,18	0,21	0,04	0,26	0,30
M2	0,19	0,20	0,02	0,24	0,26
M3	0,19	0,20	0,04	0,26	0,28
M4	0,27	0,22		0,25	0,27
M5	0,29	0,29	0,05		0,26
M6	0,22	0,26	0,04	0,30	0,38
M7	0,26	0,26	0,05		
M8	0,34	0,61	0,05		
M9					
M10					
M11					
M12					
ATR			0,08		



GRUP OZO 18h I+C Pre

RESISTENCIA

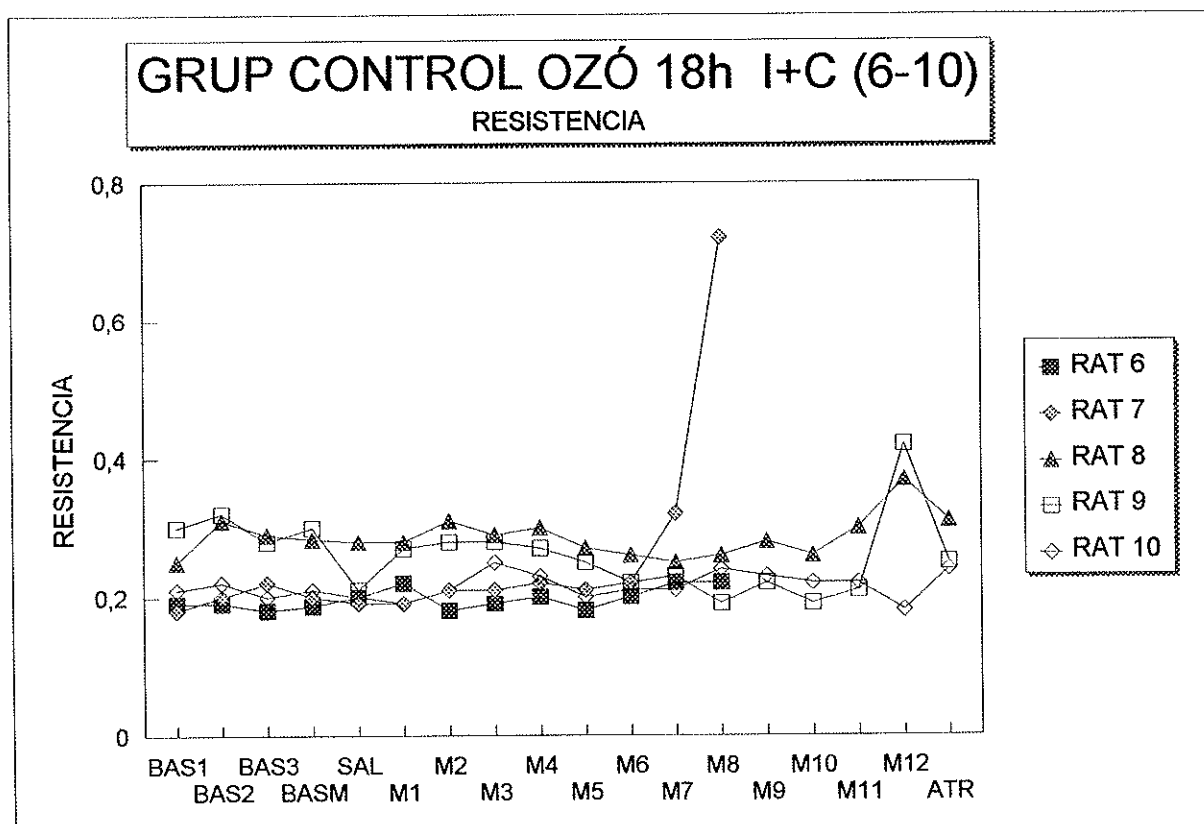
	<u>RAT1</u>	<u>RAT2</u>	<u>RAT3</u>	<u>RAT4</u>	<u>RAT5</u>
BAS1	0,20	0,17	0,16	0,20	0,22
BAS2	0,20	0,16	0,18	0,19	0,23
BAS3	0,20	0,17	0,23	0,19	0,23
BASM	0,20	0,17	0,19	0,19	0,23
SAL	0,21	0,16	0,20	0,19	0,21
M1	0,22	0,16	0,21	0,20	0,24
M2	0,15	0,17	0,19	0,20	0,23
M3	0,16	0,16	0,19	0,19	0,23
M4	0,13	0,16	0,08	0,23	0,23
M5	0,16	0,16	0,01	0,21	0,24
M6	0,15	0,16	0,04	0,20	0,23
M7	0,14	0,17	0,03	0,24	0,24
M8	0,16	0,24	0,09	0,35	0,24
M9	0,33	0,33	0,22	0,53	0,26
M10	1,01	0,46	0,33		
M11			0,55		
M12			1,21		
ATR	0,19	0,23	0,55	0,31	0,22



GRUP OZO 18h I+C Pre

RESISTENCIA

	<u>RAT6</u>	<u>RAT7</u>	<u>RAT8</u>	<u>RAT9</u>	<u>RAT10</u>
BAS1	0,19	0,18	0,25	0,30	0,21
BAS2	0,19	0,20	0,31	0,32	0,22
BAS3	0,18	0,22	0,29	0,28	0,20
BASM	0,19	0,20	0,28	0,30	0,21
SAL	0,20	0,19	0,28	0,21	0,20
M1	0,22	0,19	0,28	0,27	0,19
M2	0,18	0,21	0,31	0,28	0,21
M3	0,19	0,21	0,29	0,28	0,25
M4	0,20	0,22	0,30	0,27	0,23
M5	0,18	0,21	0,27	0,25	0,20
M6	0,20	0,22	0,26	0,22	0,21
M7	0,22	0,32	0,25	0,23	0,21
M8	0,22	0,72	0,26	0,19	0,24
M9			0,28	0,22	0,23
M10			0,26	0,19	0,22
M11			0,3	0,21	0,22
M12			0,37	0,42	0,18
ATR			0,31	0,25	0,24



2.- ESTUDI ANATOMOPATOLÒGIC

2.-ESTUDI ANATOMOPATOLOGIC

S'han realitzat talls Histològics de les mostres de pulmó obtingudes de la **Neumonectomia esquerra** fixades en formalina immediatament després de l'extracció.

Amb l'estudi anatomopatològic pretenem considerar dos aspectes:

- **Estudi qualitatiu:** Resultant de la observació microscòpica de les mostres, a on es tindrà en compte el tipus de cèl.lules observades i la presència de l'edema peribronquial.
- **Estudi quantitatiu:** Es tindrà en consideració la mesura del gruix de la paret bronquial , es realitzarà un comptatge dels diferents tipus cel.lulars infiltrats i una mesura de l'edema peribronquial.

S'observa un predomini del dany epitelial , similar al descrit anteriorment en estudis preliminars realitzats en conills, i especialment notori a les primeres 6 h post-exposició. Durant les 18-24 hores posteriors s'observa una infiltració cel.lular preferentment en el parènquima , amb polinuclears i denudació de l'epiteli. Aparentment aquestes alteracions morfològiques no es troben relacionades amb la reactivitat a la Metacolina.

3.- CÉL.LULES IMPLICADES EN EL PROCÉS INFLAMATORI

- **NEUTRÒFILS :**

Hi ha controversies en quant a l'evidència de que els neutròfils, per sí mateixos , juguin un paper important en la HRB. Alguns estudis experimentals, incloent el que ens ocupa donen indicació de que els neutròfils poden jugar un determinat paper en l'estadi precoç del procés. Els neutròfils semblen ser residents normals en les vies aèries grans, tant en subjectes normals com hiperreactius , per tant la seva presència en sí mateixa no és indicativa de HRB.

Durant la inflamació observada , es produeix un acúmul de neutròfils superior al normal, i està comprovat que tenen el potencial de produir llessions tissulars significatives. Així doncs aquest important nombre de cél.lules d'aquest tipus s'associa amb llessions tissulars durant processos inflamatoris. Els mecanismes que poden provocar aquestes llessions inclouen l'alliberament de metabòlits d'oxígen, proteases i cations.

Els neutròfils són també una font potencial de gran varietat de mediadors inflamatoris , que inclouen Prostaglandines (PG), Tromboxans (TX), Leucotriè B₄ (LT B₄) i Factor Activador de les Plaquetes (PAF), els quals poden contribuir a les respostes de la via aèria o a augmentar la reacció inflamatòria.

Del nostre experiment s'obté l'evidència que suggereix la capacitat que els neutròfils tenen d'alterar les funcions normals de les vies aèries. Es pot assegurar que els neutròfils es troben implicats en la Hiperreactivitat induïda per l'ozó .

Extrapolant els nostres resultats amb les alteracions funcionals pròpies de l'Asma Bronquial, és difícil dir en què mesura els neutròfils hi participen, és una qüestió que encara resta oberta.

- **EOSINÒFILS**

S'observa que aquestes cèl.lules tenen una gran capacitat per produir dany epitelial. És conegut que la proteïna catiònica eosinofílica és citotòxica per l'epiteli respiratori "in vitro", i en animals d'experimentació, com és el nostre cas, pot contribuir a la denudació de l'epiteli observada en les nostres mostres procedents d'animals hiperreactius.

En els individus hiperreactius s'observa una elevació significativa del nivell d'eosinòfils . La elevada reactivitat observada doncs, és secundària al dany epitelial mitjançada pels productes dels grànuls eosinofílics.

Aquestes cèl.lules produeixen elevats nivells de LT C₄ , sobretot observats en fase tardana, i al igual que els neutròfils també produeixen PAF en quantitats semblants.

Aquestes valoracions van lligades a la eosinofília en sang o esput, una característica que trobem en els individus asmàtics. Els eosinòfils també destaquen en molts talls histològics efectuats a individus morts a causa de l'Asma.

Encara no s'ha trobat explicació al mecanisme de reclutament dels eosinòfils cap a les vies aèries asmàtiques en l'home.

• **MASTÒCITS I BASÒFILS**

Els mastòcits es localitzen a la llum de les vies aèries, a l'epiteli bronquial, a la submucosa i també al parènquima pulmonar . En el cas de HRB els basòfils no han estat identificats, encara que probablement estan presents, com a la major part dels òrgans.

Els mastòcits també produeixen $LT\ C_4$, $PG\ _2D$, PAF, pèptids quimiotàctics, enzims proteolítics i proteoglicans.

Els mastòcits tenen un important paper en la reacció tardana i els factors quimiotàctics que deriven expliquen la infiltració d'eosinòfils , neutròfils i basòfils.

Els mastòcits poden estar implicats en la inflamació general i es troben associats a diverses patologies pulmonars.

- **MONÒCITS I MACRÒFAGS (MONONUCLEARS):**

Els macròfags tenen capacitat de produir una gran varietat de mediadors lipídics que inclouen els eicosanoids, vies ciclo-oxigenasa i lipoxigenasa així com el PAF. També els mononuclears fabriquen i segreguen un gran conjunt de proteïnes i pèptids que tenen activitats biològiques i poden contribuir a les reaccions de les vies aèries. En la fase tardana es troben activats els macròfags pulmonars.

- **CÉL·LULES EPITELIALS:**

S'observa pèrdua de l'epiteli de les vies respiratòries en els casos d'HRB. Les cél·lules epitelials es descamen, a la vegada que es troba una important inflamació epitelial.

Recentment les cél·lules epitelials de les vies aèries eren considerades com un simple revestiment físic, però en la actualitat és evident que tenen un important paper defensiu, i també en els processos inflamatoris, per la seva localització en la interfase entre l'ambient extern i intern.

Les cél·lules inflamatòries com neutròfils i eosinòfils, deuen migrar a través de l'epiteli fins trobar el lumen de les vies aèries. Els granulòcits s'introdueixen a través de les unions que deixen les cél·lules epitelials. Aquesta migració ve donada en resposta a factors quimiotàctics que han travessat l'epiteli.

3.- ESTUDI HISTOQUÍMIC

3.-ESTUDI HISTOQUIMIC

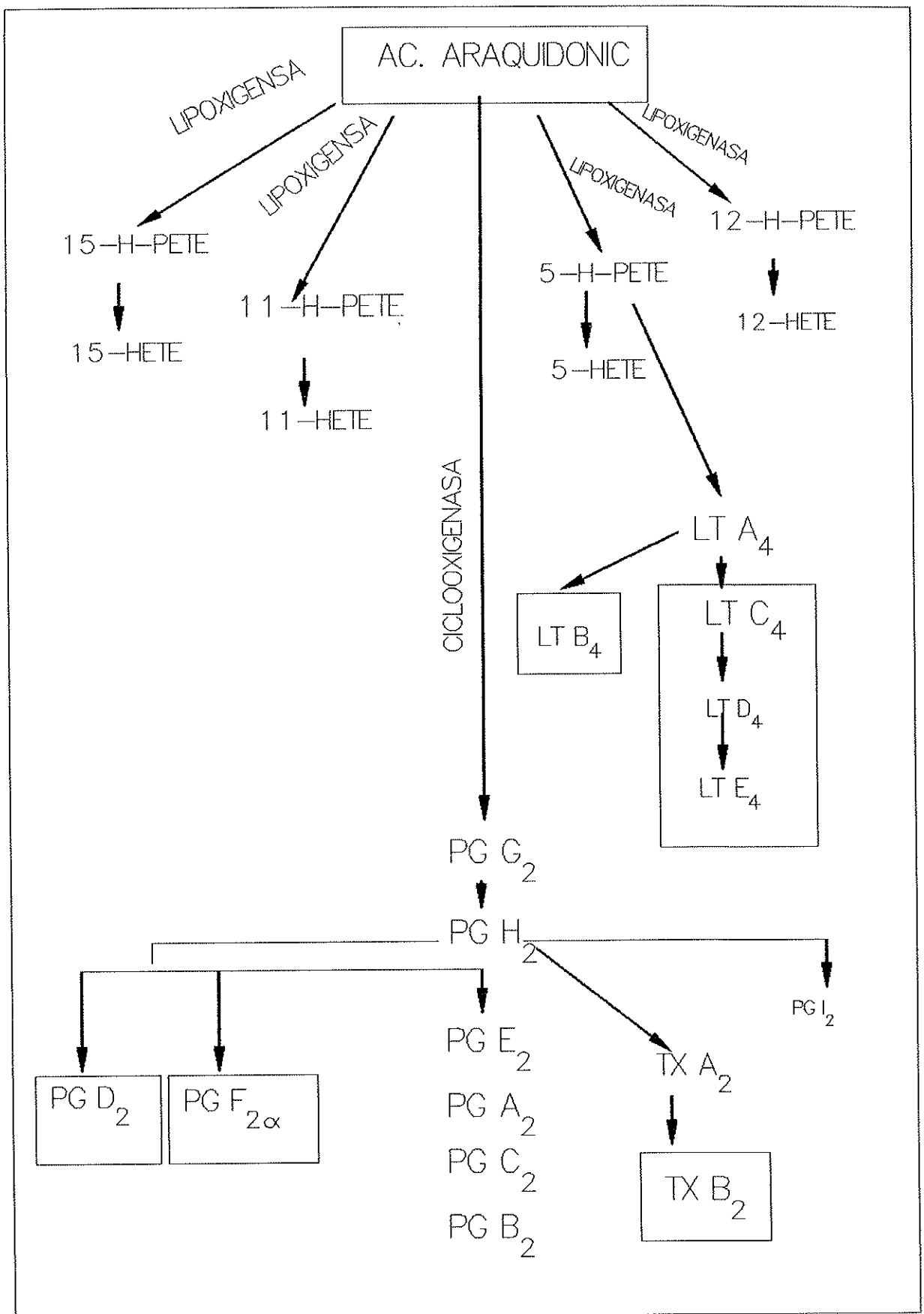
Es processen les mostres obtingudes de la Neumonectomia dreta congelades a -60°C . Aquestes mostres s'han tractat fent homogenats amb solució isotònica (Tampó Tris) per quantificar els paràmetres bioquímics implicats com mediadors en la resposta inflamatòria :

- Leucotriè B_4 i $\text{LT C}_4\text{D}_4\text{E}_4$
- Prostaglandina D_2 i $\text{PG F}_{2\alpha}$
- Tromboxà B_2 (TX B_2)

La preparació de la mostra es basa en una homogeneització en tampó TRIS HCl (100mM a pH 4), en una relació de 100mg teixit/ml tampó aproximadament. Es guarden aliquotes per la determinació de proteïnes. A partir de l'homogenat i per centrifugació (3000rpm, 10 min, 4°C) s'obté un sobrenadant d'on es farà l'anàlisi dels eicosanoids, per filtrat en columnes. Dels extractes obtinguts i mitjançant Electro-immunoassaig (EIA) amb kits comercialitzats podem analitzar els mediadors inflamatoris abans citats.

La figura 15 mostra l'esquema de formació dels diferents metabòlits implicats en la resposta inflamatòria.

FIG. 15



• **MEDIADORS INFLAMATORIS**

Com ja s'ha dit les cèl·lules inflammatòries produeixen molts mediadors químics diferents: la capacitat d'aquests per modificar les condicions de les vies aèries , produint constricció del múscle llis o alterant el balanç fluid, representa poderosos mecanismes pels quals la inflamació podria alterar la reactivitat de la via aèria. Aquests dos efectes també podrien interactuar.

Entre els possibles mediadors importants en la resposta inflamatòria trobem: lípids, pèptids i adenosina. Encara que el treball que ens ocupa està dirigit només a l'estudi dels lípids o eicosanoids.

L'origen, metabolisme (Fig 15) i farmacologia dels eicosanois ha estat molt estudiat , motiu pel qual intentarem centrar l'atenció en el possible paper que exerceixen en la inducció d'un estat d'HRB.

La capacitat de les prostaglandines, Tromboxans i Leucotriens per induir la HRB "in vivo" s'ha demostrat de diferents maneres, per injecció d'aquests mediadors en individus exposats a tests de broncoconstricció , rebaixant les dosis de reactivitat normals. Són molts els estudis "in vivo" d'aquest tipus sobre el paper dels eicosanoids.

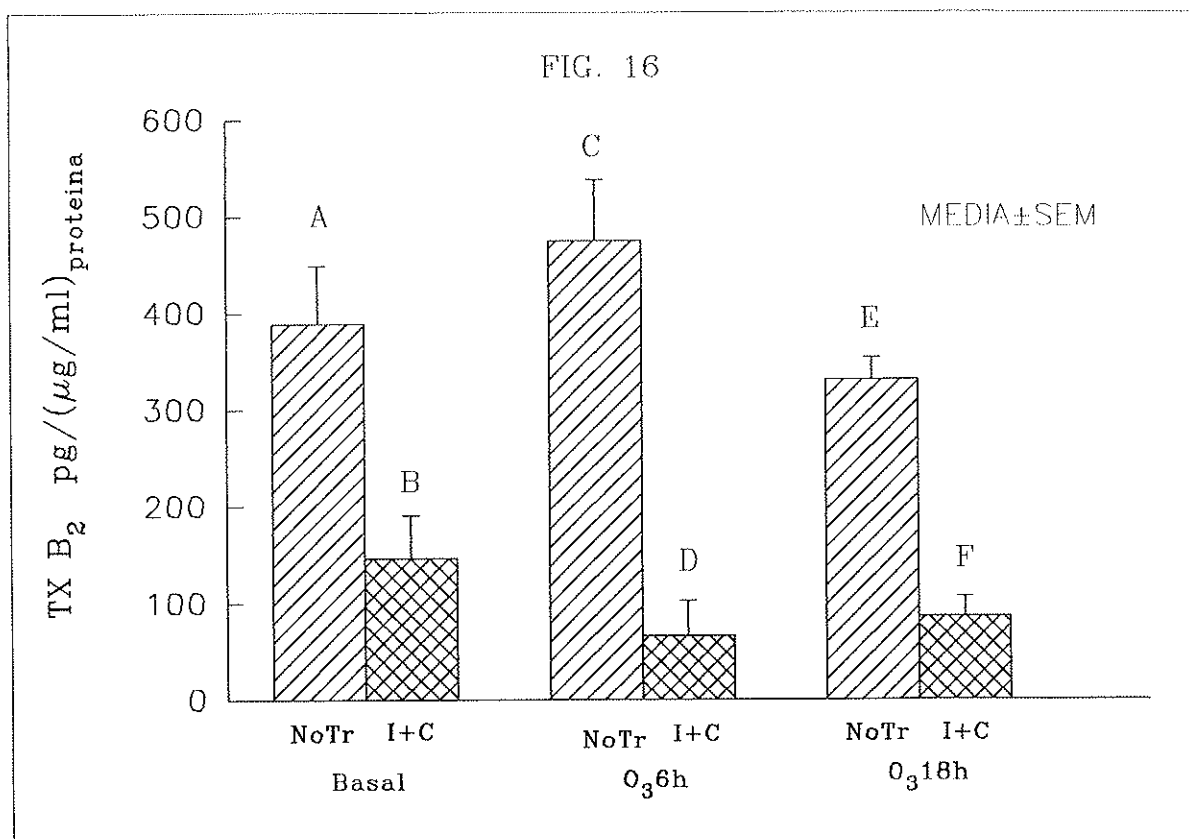
Un mètode alternatiu és l'estudi realitzat per nosaltres, examinant els efectes de la inhibició del metabolisme del Àcid Araquidònic per la via de la ciclo-oxigenasa o la lipo-oxigenasa. La substància inhibidora utilitzada en aquest cas ha estat la Indometacina.

A continuació s'exposen en forma de taula els resultats obtinguts en l'actual estudi:

M±SEM

GRUP	TX B ₂	PG F _{2α}	LT C ₄ D ₄ E ₄	LT B ₄	PG D ₂
A. CONTROL BASAL	388.6±60.1	675.7±188.3	707±361.3	272.5±7.2	1350.6±92
B. CONTROL I+C	146.8±43.7	450±162.09	301.4±62.7	316.2±81.8	238.6±83
C. CONTROL 0 ₃ 6 h	475±63.1	1846±211.57	296.5±44.7	298.8±16.8	2004±278
D. CONTROL 0 ₃ 18 h	331.3±36.3	2175.3±390.4	206.7±18.6	231.6±14.1	1438±212
E. 0 ₃ 6 h I+C	66.5±22.2	224.2±85.33	280.6±42.5	108.4±3.1	120.9±26
F. 0 ₃ 18 h I+C	86.5±20.2	131.3±26.08	269.2±24.2	135.4±6.2	143.9±21

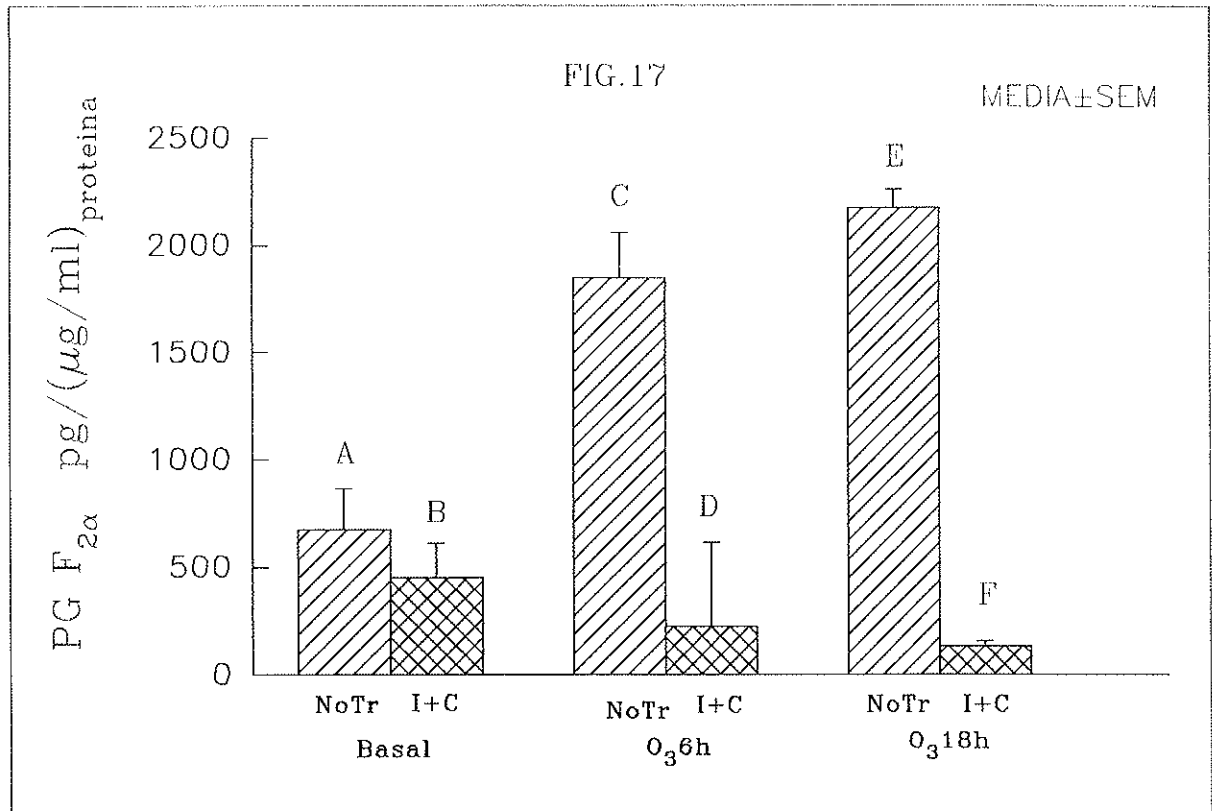
• **TROMBOXANS B₂:**



S'observa clarament que el tractament amb Indometacina (Antiinflamatori) produeix un bloqueig en la producció de TX B₂, de manera significativa respecte dels individus no medicats amb aquesta substància.

El percentatge de la devallada de TX B₂ deguda a la medicació, és més important pels individus exposats a ozonització.

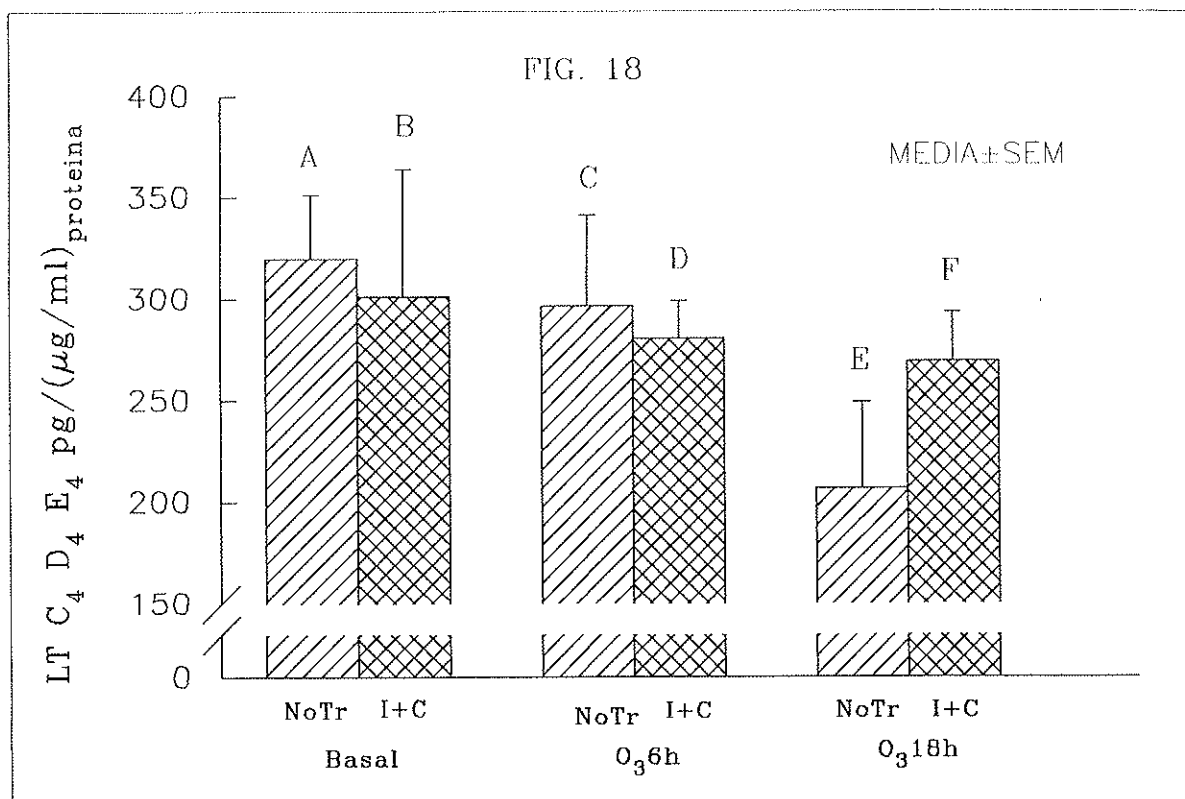
• **PROSTAGLANDINA $F_{2\alpha}$** :



El tractament amb Indometacina és molt eficaç per reduir els nivells de $PGF_{2\alpha}$.

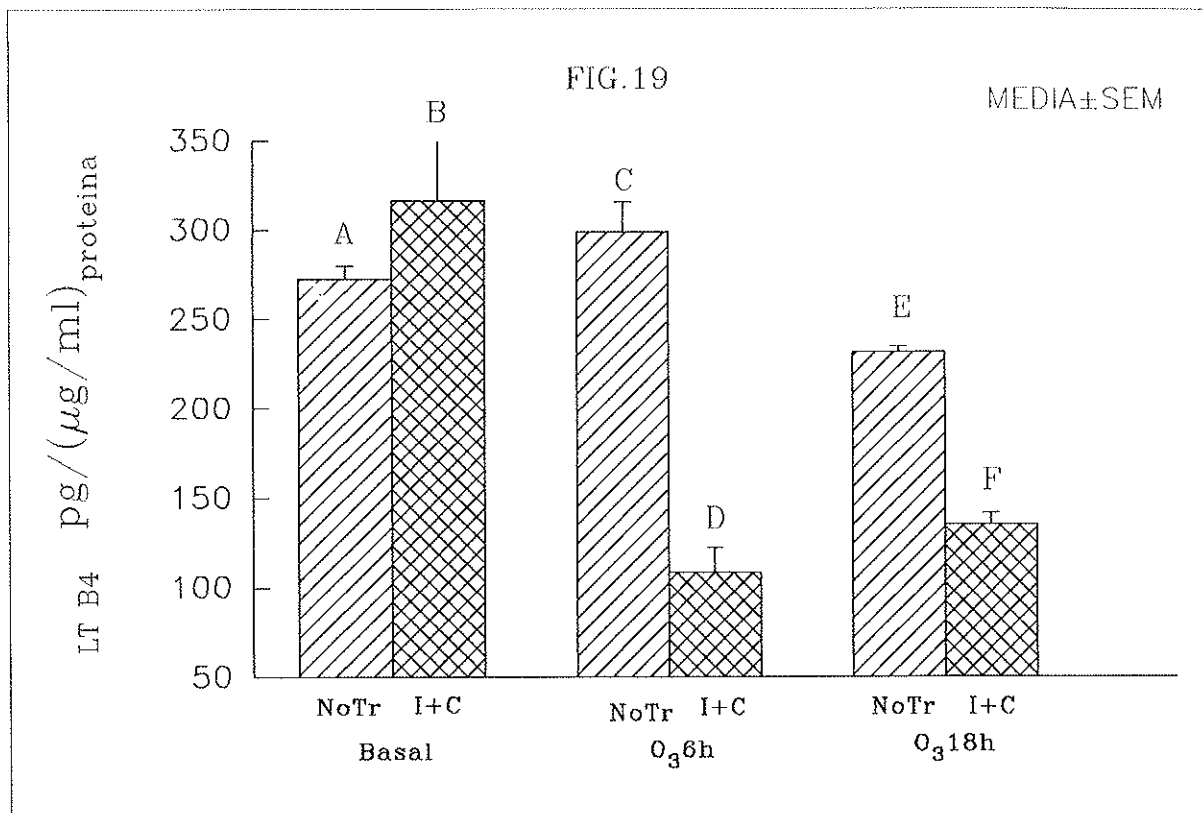
Hi ha una correlació molt elevada entre l'exposició dels individus a l'ozó i la producció d'aquest mediador inflamatori, encara que el tractament amb antiinflamatoris té un efecte protector sobre l'efecte de l'ozó pel que respecta a aquest paràmetre.

- **LEUCOTRIÈ C₄ D₄ E₄:**



Els valors d'aquest mediador es mantenen bastant estables al llarg de tots els grups, només s'observa una petita caiguda en els valors relacionada amb les mesures realitzades a les 18 h de l'exposició a l'ozó, pel cas dels individus no tractats.

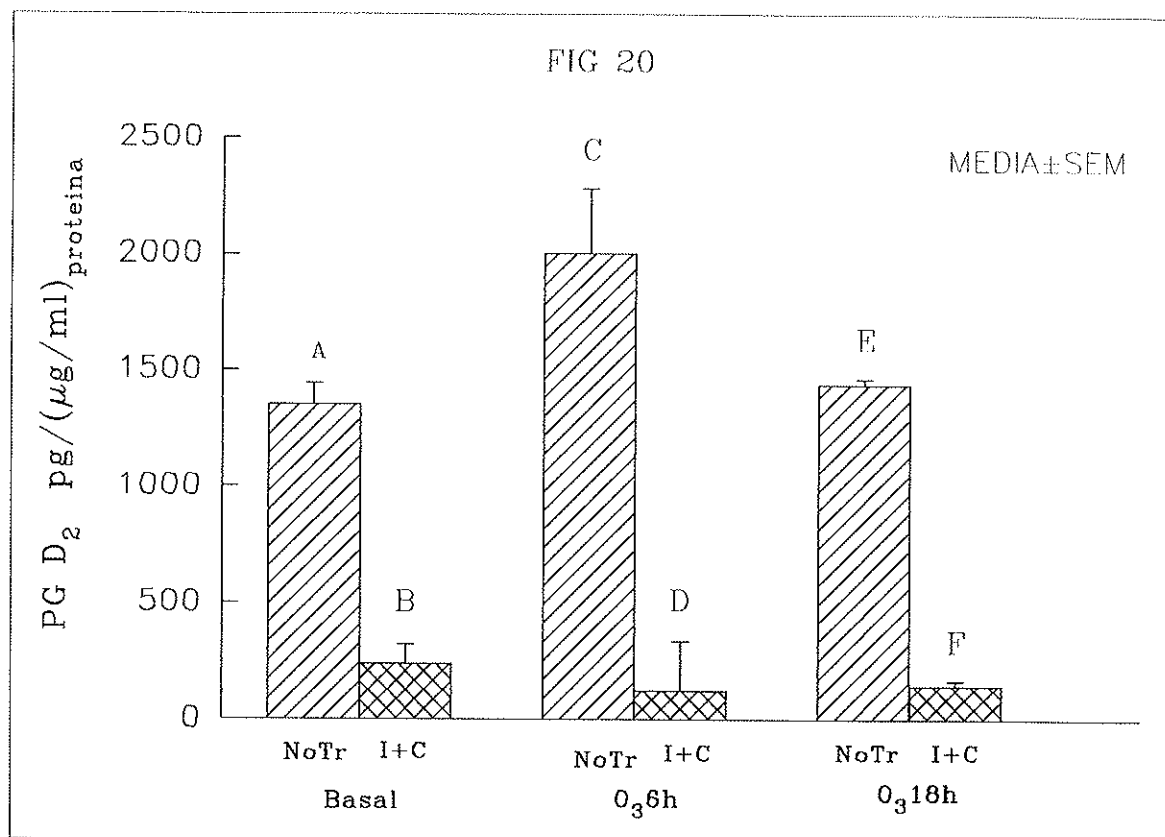
- **LEUCOTRIÈ B₄:**



Els LT B₄ mantenen nivells alts en els individus control, mentre que s'observa un efecte de caiguda temporal en quant a la ozonització. Es podria tractar d'una resposta tardana a l'ozó.

Els antiinflamatoris només demostren el seu efecte si s'ha forçat la inflamació però no en els casos controls.

- **PROSTAGLANDINES D₂:**



Les PG D₂ presenten gran sensibilitat al tractament Indometacínic. Dels resultats s'intueix un petit augment transitori en els valors d'aquest mediador durant les primeres hores posteriors a la ozonització, però que també desapareix amb el tractament antiinflamatori.

4.-TRACTAMENT ESTADÍSTIC

4.-TRACTAMENT ESTADÍSTIC DE LES DADES

La manipulació estadística de les dades s'ha basat en l'aplicació de Tests d'Anàlisi de la Variança no paramètrics (Kruskal-Wallis) d'una via, Tests de Barlett per variàncies iguals, i correlacions múltiples i parcials pels diferents paràmetres.

5.- CONCLUSIONS

5.- CONCLUSIONS

- La evidència de que la ozonització produeix una Hiperreactivitat Bronquial la tenim mitjançant la observació de les figures corresponents a les Dosis Màximes Tolerades (Fig.5) i Variació Màxima dels paràmetres mecànics (Fig,9). Es pot veure una caiguda important de l'umbral que produeix resposta a la provocació de la broncoconstricció amb Metacolina inhalada, sobretot durant les primeres 6 hores posteriors a la ozonització. Més clarament visible a nivell de vies aèries que a nivell de parènquima pulmonar.
- L'efecte del tractament amb antiinflamatoris no esteroideus (Indometacina), que actuen via bloqueig ciclooxygenàsic produeix una intensificació de la HRB induïda per l'ozó en els animals tractats. Sembla ser que el desequilibri induït sobre el balanç dels mediadors inflamatoris pot ser el causant d'aquest fet.
- És interessant destacar que l'efecte indometacínic sobre les vies aèries és màxim a les 6 h post-exposició a l'ozó , mentre que l'efecte a nivell del parènquima apareix a les 18 hores de l'exposició.
- La inflamació actua com un mecanisme protector davant la HRB induïda per l'ozó , i al ser trencat aquest mecanisme de resposta pel tractament antiinflamatori s'observen resultats negatius. L'efecte dels antiinflamatoris no esteroideus és doncs deleteri en aquest cas.

- Els individus ozonitzats i tractats presenten una reacció exagerada , coincidint amb una elevada mortalitat a dosis de metacolina poc elevades com s'observa en els valors de PC150 (Fig.11 i 12) , i índex de Reactivitat (Fig.13-14). Aquest fet és clarament patent en la revisió de les corbes dosi-resposta individuals tant pel que fa als valors de Resistencia com Elastancia.
- El present experiment demostra que els Neutròfils juguen un paper determinant en l'estadi precoç de l'ozonització (primeres 6 hores) , encara que són residents habituals tant en individus normals com hiperreactius. Per tant no es poden utilitzar com indicadors de la HRB per sí mateixos.
- L'aparició dels Neutròfils està clarament associada amb la lesió tissular i la inflamació. Els neutròfils presenten la capacitat d'alterar les funcions normals de les vies aèries.
- Els Eosinòfils també es troben associats a casos de dany epitelial, ja que alliberen determinats productes proteics de caràcter citotòxic, podent contribuir a la denudació de l'epiteli bronquial observada en les mostres procedents dels animals hiperreactius.
- Els eosinòfils produeixen LT C₄ sobretot en la Fase tardana de la resposta.
- Els Mastòcits tenen acció a nivell de la llum de les vies aèries, no han estat identificats a l'epiteli. Semblen tenir importància en la fase tardana de la reacció. Alliberen factors quimiotàctics que poden explicar la infiltració d'eosinòfils, neutròfils i basòfils.

- La Hiperreactivitat Bronquial es troba associada a pèrdua de l'epiteli. Les cèl·lules epitelials presenten descamació coincidint amb el procés inflamatori. La observació de les mostres al microscopi mostra un predominant dany epitelial especialment clar durant les primeres hores.
- La producció de PG, TX i PG $F_{2\alpha}$ i D_2 pertany en part al paper dels neutròfils, mitjançant el bloqueig ciclooxygenàsic els nivells d'aquests productes presenten una devallada, mentre que la producció de LT no es troba tant directament afectada.
- Els TX B_2 i PG $F_{2\alpha}$ i D_2 tenen una important funció protectora en la primera fase de la inflamació, donat que la caiguda en els valors que es produeix pel tractament indometacínic en aquesta fase, presenta clars efectes negatius en l'índex de Supervivència. Per tant a priori queda contraindicat l'ús del tractament amb antiinflamatoris via bloqueig ciclooxygenàsic pel tractament de la HRB induïda per l'ozó, ja que el percentatge de mortalitat és elevat.
- A priori no es troba explicació per la caiguda en els valors de LT B_4 provocada pel tractament, ja que actua per la via ciclooxygenàsica i no lipooxygenàsica, la única explicació possible es veuria relacionada amb una desestabilització pel trencament dels balanços d'equilibri dels mediadors inflamatoris. El que sí sembla clar és que els Leucotriens tenen més importància durant les fases primàries que durant les tardanes.
- Mentre que les PG $F_{2\alpha}$ presenten una corba de pendent creixent fins les 18 h posteriors a la ozonització, les PG D_2 a les 18h ja presenten un valor

més baix que a les 6 h.

- El tractament per via del bloqueig ciclooxigenàsic és negatiu a curt termini durant les primeres 6 h posteriors a l'ozonització, podent provocar un broncospasme sever a dosis baixes de broncoconstrictor, però a les 18 h, quan la inflamació ja s'ha establert resulta beneficiós ja que augmenta els valors de supervivència.
- En conclusió als resultats obtinguts de l'anàlisi morfològic s'observa coincidència entre la HRB, l'edema peribronquial i la inflamació. Però la existència del desacoblament mecànic per sí mateixa no permet explicar la magnitud de la resposta hiperreactiva observada, si no és per que actua de manera combinada amb l'alliberament de cèl·lules i productes inflamatoris. Això indica que en la HRB induïda per ozó el mecanisme primordial és la estimulació directa dels receptors amb agonistes de la contracció del múscle llis bronquial, per sobre del desacoblament mecànic.
- Observant aquests resultats és difícil predir en quina mesura els Neutròfils tenen una participació activa en l'asma. S'ha constatat alta eosinofília en sang o esput de malats asmàtics, així com també en talls histològics d'individus morts a causa de processos asmàtics.

IV. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- De Vries K., Gökemeyer JDM, Koeter GH et al. Cholinergic and Adrenergic Mechanisms in bronchial hyperreactivity. In: Morley J, ed. *Perspectives in asthma. I Bronchial Hyperreactivity*. New York: Academic Press 1982:107-21.
- 2.- Seltzer J, Bigby BG, Stulbarg M et al. O₃ change in bronchial reactivity to methacholine and airway inflammation in humans. *J. Appl. Physiol* 1986; 60:1321-6.
- 3.- Becket WS, Freed AN, Turner C, Menkes HA. Prolonged increased responsiveness of canine peripheral airways after exposure to ozone. *J Appl. Physiol*. 1988;64:605-10.
- 4.- Nadel JA. Role of inflammation in asthma. *Chest* 1985;87:171s.
- 5.- Murlas CG, Roum JH, Sequence of pathological changes in the airway mucosa of guinea pigs during ozone-induced bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1985;131:314-20.
- 6.- O'Byrne PM, Walters EH, Aizawa H, Fabbri LM, Holtzman MJ, Nadel JA. Indometacin inhibits the airways hyperresponsiveness but not the neutrophil influx induced by ozone in dogs. *Am Rev Respir Dis* 1984;130:220-4.
- 7.- Drazen JM, Austen KF. Leucotrienes and airway responses. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:985-98.
- 8.- Bergstrand H. Phosphodiesterase inhibition and theophylline. *Eur. J Respir Dis* 1980;61 (Suppl 109): 37-44.

- 9.- Golden JA, Nadel JA, Boushey HA: Bronchial hyperirritability in healthy subjects after exposure to ozone. *J. Appl. Physiol.* 1978 243:626-631.
- 10.- Holtzmann MJ, Fabri LM, O'Byrne PM, Gold BD, Aizawa H, Walters EH, Alpert SE, Nadel JA: Importance of airway inflammation for hyperresponsiveness induced by ozone. *Amer.Rev.Respir.Dis.* 1983 127:686-690
- 11.- Kleeberger SR, Kolbe J, Adkinson NF, Peters SP, Spanhake EWN: The role of mediators in the response of the canine peripheral lung to 1 ppm ozone. *Am.Rev.Respir.Dis* 1988; 137:3321-325.
- 12.- Mcklem PT, Mechanical factors determining maximum broncoconstriction. *Eur.Resp.J.* 2 (suppl 6) 1989; 516-519
- 13.- Esandi N, Rodríguez Sanchón B, Romero PV: Estudio histopatológico y funcional de la inhalación aguda de ozono en el conejo. *Actas de la Xa Reunión Nacional del FIS*, 1989.
- 14.- Ludwig M, Romero PV, Sly PD, Fredberg JJ, Bates HT: Interpretation of interrupter resistance after histamine-induced constriction in the dog. *J.Appl.Physiol.* 1990; 68(4):1651-1656.
- 15.- Ludwig M, Romero PV, Bates JHT: A comparison of the dose-response behaviour of canine airways and parenchyma. *J.Appl.Physiol.* 1989;67:1220-1225.
- 16.- Romero PV, Ludwig M: Maximal Methacholine induced constriction in rabbit lungs: Interactions between airways and tissues. *J.Appl. Physiol.*
- 17.- Bel EH, Timmers MC, Zwindermann AH, Dijkmann JH, Sterk PJ: The effect of inhaled corticosteroids on the maximal degree of airway narrowing to methacholine in asthmatic subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; 143:109-113.