

# TESI DOCTORAL

## Efecte de la inhibició del PAF sobre la resposta al.lèrgica: model *in vivo* i *in vitro*

---

AUTORA: Rosa M Muñoz Cano

DIRECTORS: Antonio Valero Santiago i Joaquim Mullol i Miret

TUTOR: Miquel Vilardell i Tarres

Departament de Medicina, Facultat de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona, 2012

# Sumari

---

<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>7</b>
1. PAPER DEL FACTOR D'ACTIVACIÓ DE PLAQUETES A LA RESPOSTA ALLÈRGICA.....	7
2. EL FACTOR D'ACTIVACIÓ DE PLAQUETES A L'AL·LÈRGIA RESPIRATÒRIA.....	13
3. EL FACTOR D'ACTIVACIÓ DE PLAQUETES A L'ANAFILAXI .....	14
4. CARACTERÍSTIQUES DELS INHIBIDORS DE LA RESPOSTA ALLÈRGICA: ANTIHIISTAMÍNICS I ANTAGONISTES DEL PAF .....	17
<b>HIPÒTESI</b> .....	<b>29</b>
<b>OBJECTIUS I PREGUNTES</b> .....	<b>30</b>
1. Projecte I: Valoració de l'efecte d'un antihistamínic amb activitat antagonista del PAF sobre els símptomes induïts per PAF en un model de provocació nasal <i>in vivo</i> .....	30
2. Projecte II: Valoració de l'efecte d'un antihistamínic amb activitat antagonista del PAF sobre l'alliberament de mediadors de la inflamació induïda per PAF en mastòcits humans	31
<b>MATERIALS I MÈTODES</b> .....	<b>32</b>
1. Projecte I: Valoració de l'efecte d'un antihistamínic amb activitat antagonista del PAF sobre els símptomes induïts per PAF en un model de provocació nasal <i>in vivo</i> .....	32
<i>Població de l'estudi</i> .....	32
<i>Disseny de l'estudi</i> .....	33
<i>Variables avaluades</i> .....	34
<i>Rinometria Acústica</i> .....	34
<i>Provocació nasal</i> .....	35
<i>Anàlisi estadístic</i> .....	35
2. Projecte II: Valoració de l'efecte d'un antihistamínic amb activitat antagonista del PAF sobre l'alliberament de mediadors de la inflamació induïda per PAF en mastòcits humans	36
<i>Cultius de mastòcits</i> .....	36
<i>Disseny experimental</i> .....	37
<i>Tècniques emprades</i> .....	37
<i>Anàlisi estadística</i> .....	39
<b>RESULTATS</b> .....	<b>40</b>
1. Projecte I: Valoració de l'efecte d'un antihistamínic amb activitat antagonista del PAF sobre els símptomes induïts per PAF en un model de provocació nasal <i>in vivo</i> .....	40
1.1. <i>Població estudiada</i> .....	40
1.2. <i>Provocació nasal amb PAF: avaluació dels símptomes i dels volums nasals</i> .....	41
1.3. <i>Efecte de rupatadina i levocetirizina sobre els símptomes i volums nasals</i> .....	48
2. Projecte II: Valoració de l'efecte d'un antihistamínic amb activitat antagonista del PAF sobre l'alliberament de mediadors de la inflamació induïda per PAF en mastòcits humans	57
2.1. <i>Avaluació de la toxicitat del PAF, la rupatadina, la desloratadina, la levocetirizina, el WEB2086, el CV6209, el BN52021 a la línia cel·lular LAD-2</i> .....	57
2.2. <i>Avaluació de l'efecte induït per PAF sobre l'activació</i> .....	58
2.2.1 <i>A mastòcits de la línia cel·lular LAD-2</i> .....	58
2.2.2. <i>A cultius primaris de mastòcits pulmonars</i> .....	60
2.3. <i>Avaluació de l'efecte dels antagonistes del PAF (WEB2086, BN52021 i CV6209) sobre l'activació de mastòcits induïda per PAF a la línia cel·lular LAD-2</i> .....	61

<i>2.4. Avaluació l'efecte del CV6209 sobre l'activació induïda per PAF en cultius primaris de mastòcits pulmonars.....</i>	<i>65</i>
<i>2.5. Avaluació de l'efecte de la desloratadina, la rupatadina i la levocetirizina sobre l'activació induïda per PAF.....</i>	<i>66</i>
<i>2.5.1. A la línia cel·lular LAD-2.....</i>	<i>66</i>
<i>2.5.2. A un cultiu primari de mastòcits pulmonars.....</i>	<i>73</i>
<i>2.6. Avaluació de l'expressió del receptor de PAF en mastòcits de la línia cel·lular LAD-2 i a un cultiu primari de mastòcits pulmonars.....</i>	<i>74</i>
<i>2.7. Comparació de l'efecte inhibitori dels diferents antagonistes sobre l'alliberament d'histamina i <math>\beta</math>-hexosaminidasa induïda per PAF a línia cel·lular LAD-2.....</i>	<i>75</i>
<b>DISCUSSIÓ .....</b>	<b>76</b>
1. Projecte I: Valoració de l'efecte d'un antihistamínic amb activitat antagonista del PAF sobre els símptomes induïts per PAF en un model de provocació nasal in vivo .....	76
2. Projecte II: Valoració de l'efecte d'un antihistamínic amb activitat antagonista del PAF sobre l'alliberament de mediadors de la inflamació induïda per PAF en mastòcits humans	79
<b>APLICABILITAT PRÀCTICA.....</b>	<b>84</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>86</b>
1. Projecte I: Valoració de l'efecte d'un antihistamínic amb activitat antagonista del PAF sobre els símptomes induïts per PAF en un model de provocació nasal in vivo .....	86
2. Projecte II: Valoració de l'efecte d'un antihistamínic amb activitat antagonista del PAF sobre l'alliberament de mediadors de la inflamació induïda per PAF en mastòcits humans	86
<i>CONCLUSIO FINAL .....</i>	<i>87</i>
<b>Annex .....</b>	<b>88</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>89</b>

---

### **Abreviacions (ordre alfabètic)**

Ca<sup>++</sup>: calci

Cys-LT: leucotriens cisteinilats

DAG: diacilglicerol

ECP: Proteïna catiònica eosinòfila (eosinophilic cationic protein).

ELISA: Assaig per immunoabsorció lligat a enzims (enzyme-linked immunosorbent assay).

EVA: escala visual anàloga

FLC: fosfolipasa C

G1 i G2: proteïna G

GM-CSF: Factor estimulador de colònies (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor).

HCM-1: . Línia cel·lular de mastòcits humans 1 (human mast cells-1).

IgE: immunoglobulina E

IL- : interleucina

I3P: inositol trifosfat

LTB<sub>4</sub>: leucotriens B4

MAP: proteïnes activades per mitògens (mitogen-activated proteins)

MCP-1: Proteïna quimiotàctica de monòcits (monocyte chemotactic protein-1).

NF-κB: Factor nuclear κB (nuclear factor κB).

nM: nanomolar

μM: micromolar

PAF: Factor d'activació de plaquetes (platelet activating factor).

PAF-AH: PAF-acetil hidrolasa

PAF-r: receptor del PAF

PB-MC: Mastòcits de sang perifèrica (peripheral blood-mast cells)

PGD<sub>2</sub>: prostaglandina D<sub>2</sub>

PI-3K: fosfatidil inositol 3 quinasa (phosphatidylinositol 3 kinase)

PKC: proteïna quinasa C (protein-kinase C)

RAC: rinometria acústica

RANTES: Citocina expressada i secretada pel limfòcit T normal en funció del seu grau d'activació (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted).

RFU: Unitats relatives de fluorescència (relative fluorescence units).

RH<sub>1</sub>: receptor de la histamina H<sub>1</sub>

SDS-PAGE: Electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis).

TNF-α: Factor de necrosi tumoral alfa (tumor necrosis factor alfa).

VCAM-1: Molècula d'adhesió de l'endoteli vascular (vascular cell adhesion molecule)

## *Índex de taules i figures*

Figura 1. Fases de la resposta al·lèrgica i mediadors alliberats

Figura 2. Estructura química de la histamina

Figura 3. Mediadors i cèl·lules implicades a la resposta al·lèrgica

Figura 4. Metabolisme del PAF

Figura 5. Representació de les formes actives (monomèrica i dimèrica) del receptor del PAF, de la via de transducció de senyals i de l'efecte associat a la unió del seu lligand

Figura 6 . Nomenclatura de l'anafilaxi

Figura 7. Esquema del mecanisme d'acció dels antihistamínics.

Figura 8. Disseny de l'estudi

Figura 9. Efecte del PAF administrat en dosis creixents sobre l'evolució dels símptomes, mesurat mitjançant l'escala de Likert (A) i l'escala visual analògica (B).

Figura 10. Efecte del PAF sobre els símptomes nasals individuals, obstrucció nasal (A), rinorrea (B), prurija nasal (C) i esternuts (D) avaluats mitjançant l'escala de Likert en voluntaris sans i pacients amb rinitis al·lèrgica.

Figura 11. Efecte del PAF administrat en dosis creixent sobre la reducció del volum nasal ( $Vol_{2-5}$ ).

Figura 12. Efecte de la provocació nasal amb PAF sobre els valors de VEMs a l'inici de la provocació i als 240 minuts, en individus sans i pacients amb rinitis al·lèrgica.

Figura 13. Efecte del PAF sobre els símptomes nasals avaluats mitjançant l'escala de Likert en individus sans (A) i amb rinitis al·lèrgica (B) en tractament amb placebo, levocetirizina o rupatadina.

Figura 14. Efecte del PAF sobre els símptomes nasals mesurats mitjançant l'escala visual analògica (EVA) en voluntaris sans (A) i pacients amb rinitis al·lèrgica (B) en tractament amb placebo, levocetirizina o rupatadina.

Figura 15. Efecte del PAF sobre els símptomes evaluats amb l'escala de Likert. Comparació de l'àrea sota la corva (AUC) en individus sans (A) i pacients amb rinitis al·lèrgica (B) en tractament amb la levocetirizina i la rupatadina, i el placebo.

Figura 16. Efecte del PAF sobre els símptomes nasals individuals (obstrucció nasal, rinorrea, esternuts i prurija nasal) mesurats mitjançant l'escala de Likert en voluntaris sans i pacients amb rinitis al·lèrgica en tractament amb levocetirizina.

Figura 17. Efecte del PAF sobre els símptomes nasals individuals (obstrucció nasal, rinorrea, esternuts i prurija nasal) mesurats mitjançant l'escala de Likert en voluntaris sans i pacients amb rinitis al·lèrgica en tractament amb rupatadina.

Figura 18. Efecte de levocetirizina i rupatadina sobre la disminució del volum nasal induït per PAF i mesurat mitjançant rinometria acústica en voluntaris sans (A) i en pacients amb rinitis al·lèrgica (B).

Figura 19. Resum dels resultats de l'efecte del PAF sobre l'alliberament de  $\beta$ -hexosaminidasa a la línia cel·lular LAD-2 (n=9). Assaigs de dosi-resposta i temps-resposta.

Figura 20. Resum dels resultats de l'efecte del PAF sobre l'activació de la línia cel·lular LAD-2 (flux de calci). Assaigs de dosi-resposta (n=3)

Figura 21. Resum dels resultats de l'alliberament d'histamina en resposta a l'estimulació amb PAF en mostres de mastòcits humans aïllats a partir de teixit pulmonar: 5 dies versus 15 dies (n=1).

Figura 22. Resum de l'efecte de l'antagonista del PAF WEB2086 (n=6) (A), BN52012 (n=5) (B) i CV6209 (n=7) (C) sobre l'alliberament de  $\beta$ -hexosaminidasa induïda per PAF a la línia cel·lular LAD-2.

Figura 23. Resum dels resultats de l'efecte de l'antagonista del PAF CV6209 sobre l'alliberament d'histamina induït per PAF a la línia cel·lular LAD-2 (n=6)

Figura 24. Resum dels resultats de l'efecte de l'antagonista del PAF CV6209 sobre l'alliberament d'histamina induït per PAF als cultius primaris de mastòcits pulmonars (n=2)

Figura 25. Efecte de la desloratadina (1-100  $\mu$ M) (A), la levocetirizina (1 nM-1  $\mu$ M) (B) i (1-100  $\mu$ M)(C) i la rupatadina (5-100  $\mu$ M) (D) sobre l'alliberament de  $\beta$ -hexosaminidasa a la línia cel·lular LAD-2 (n=6)

Figura 26. Resum de la desloratadina (A), la levocetirizina (B) i la rupatadina (C) sobre l'alliberament d'histamina induït per PAF a la línia cel·lular LAD-2 (n=6).

Figura 27. Resum dels resultats de l'efecte de la desloratadina, la levocetirizina i la rupatadina sobre l'alliberament d'histamina induït per PAF en cultius primaris de mastòcits pulmonars (n=4)

Figura 28. Resum dels resultats de l'expressió proteica (Western Blot) del receptor de PAF a la línia cel·lular LAD-2 i als cultius primaris de mastòcits pulmonars.

Figura 29. Resum simplificat de l'hipotètic efecte de la levocetirizina, la rupatadina i el CV6209 sobre l'alliberació de mediadors induïda per PAF en el cas de que levocetirizina presentés (A) o no (B) un efecte anti-PAF.

Taula 1. Efecte antiinflamatori in vivo i in vitro d'alguns antihistamítics de segona generació .

Taula 2. Comparació de les característiques dels diferents estudis realitzats amb antihistamítics i antagonistes del PAF

Taula 3. Característiques basals demogràfiques i clíniques dels individus estudiats

Taula 4. Perfil de sensibilització dels pacients amb rinitis al·lèrgica estacional

Taula 5. Efecte de levocetirizina i rupatadina sobre els símptomes nasals avaluats mitjançant l'escala de Likert i sobre la disminució del volum nasal induït per PAF als voluntaris sans i a pacients amb rinitis al·lèrgica.

Taula 6. Resultats de l'avaluació de la toxicitat del PAF, la rupatadina, la levocetirizina, la desloratadina, el WEB2086, el CV6209 i el BN52021 a la línia cel·lular LAD-2.

Taula 7. Resum de l'efecte inhibitori que presenten els diferents antagonistes sobre l'alliberament d'histamina i  $\beta$ -hexosaminidasa induïdes per PAF a la línia cel·lular LAD-2.

: Taula 1. Símptomes nasals induïts per PAF avaluats mitjançant l'escala de Likert (0-3).

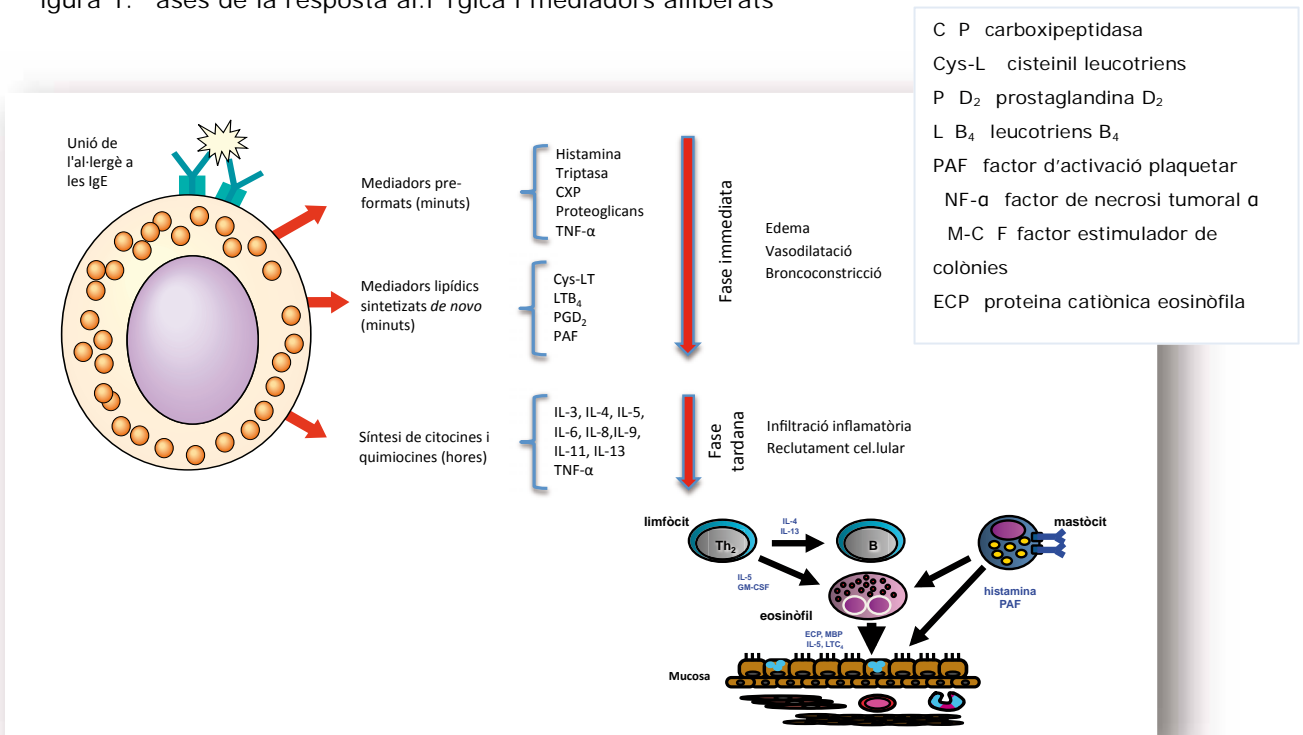
# INTRODUCCIÓ

## 1.PAPER DEL FACTOR D'ACTIVACIÓ DE PLAQUETES A LA RESPOSTA AL·LÈRGICA

### Fases de la resposta al·lèrgica

La resposta al·lèrgica clàssicament es divideix en dues fases, una d'immediata on es produeix l'alliberament de múltiples mediadors pre-formats o sintetitzats ràpidament (histamina, triptasa, prostaglandina D<sub>2</sub>, leucotriens o factor d'activació de plaquetes-PAF-) que desencadenen una resposta clínica d'un latència curta en relació al contacte amb l'estímul al·lèrgic. una segona fase, 8-12 hores després, on mastòcits i d'altres tipus cel·lular alliberen mediadors pro-inflamatoris sintetitzats de novo, com ara el PAF, leucotriens, quimiocines o citocines. Aquesta fase tardana implica el reclutament d'altres cèl·lules efectores (basòfils, eosinòfils, neutròfils i limfòcits ) responsables de la infiltració persistent i o de la remodelació pròpia de malalties al·lèrgiques cròniques com la rinitis o l'asma (1, 2) (figura 1).

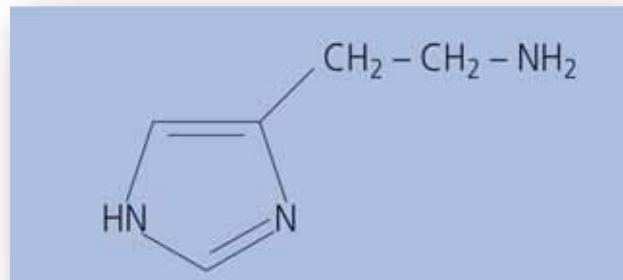
figura 1. Fases de la resposta al·lèrgica i mediadors alliberats



## Mediadors de la resposta al·lèrgica

Una gran varietat de mediadors estan implicats a la resposta al·lèrgica però només alguns d'ells són utilitzats com a diana terapèutica o com a biomarcador. El cas més paradigmàtic és el de la histamina, que va ser el primer mediador vasoactiu descrit (1908) i el que s'ha convertit en l'objectiu terapèutic per excel·lència a les malalties al·lèrgiques (3) (figura 2 i 3).

Figura 2. Estructura química de la histamina ( $\beta$ -imidazolil-etilamina)



## Histamina i triptasa

La histamina és una amina endògena que participa a diversos processos fisiològics com ara la inflamació tissular, la secreció gàstrica o la neurotransmissió. Aquestes funcions les realitza a través dels quatre receptors que s'han descrit fins l'actualitat (1, 2, 3 i 4). La histamina té un potent efecte vasoactiu, així com un important efecte broncoconstrictor gràcies a la seva acció sobre el múscul llis bronquial i exerceix un efecte estimulants sobre els terminals nociceptius, de manera que té un paper rellevant a la patogènesi de la pruriga. Així mateix és un destacat mediador que s'allibera en gran quantitat durant les primeres fases de les reaccions d'hipersensibilitat, i tradicionalment el seu bloqueig o inhibició ha estat l'estratègia farmacològica més utilitzada en el tractament de les reaccions al·lèrgiques (3).

La histamina s'emmagatzema pre-formada als grànuls citoplasmàtics dels mastòcits, basòfils i plaquetes, preparada per actuar de forma immediata després de la desgranulació cel·lular. Presenta un metabolisme molt ràpid, de manera que als 15-60 minuts és pràcticament indetectable a nivell plasmàtic. Per aquest motiu, tot i ser un marcador útil de desgranulació, la valoració dels nivells plasmàtics no s'utilitza per al diagnòstic de les anafilaxi en fase aguda a la pràctica clínica habitual (3). En



canvi els seus metabòlits poden ser detectats a l'orina fins a 24 hores després de la reacció, fet que els converteix en una mesura útil tant en el diagnòstic de l'anafilaxi com en d'altres patologies com la mastocitosi sistèmica (4).

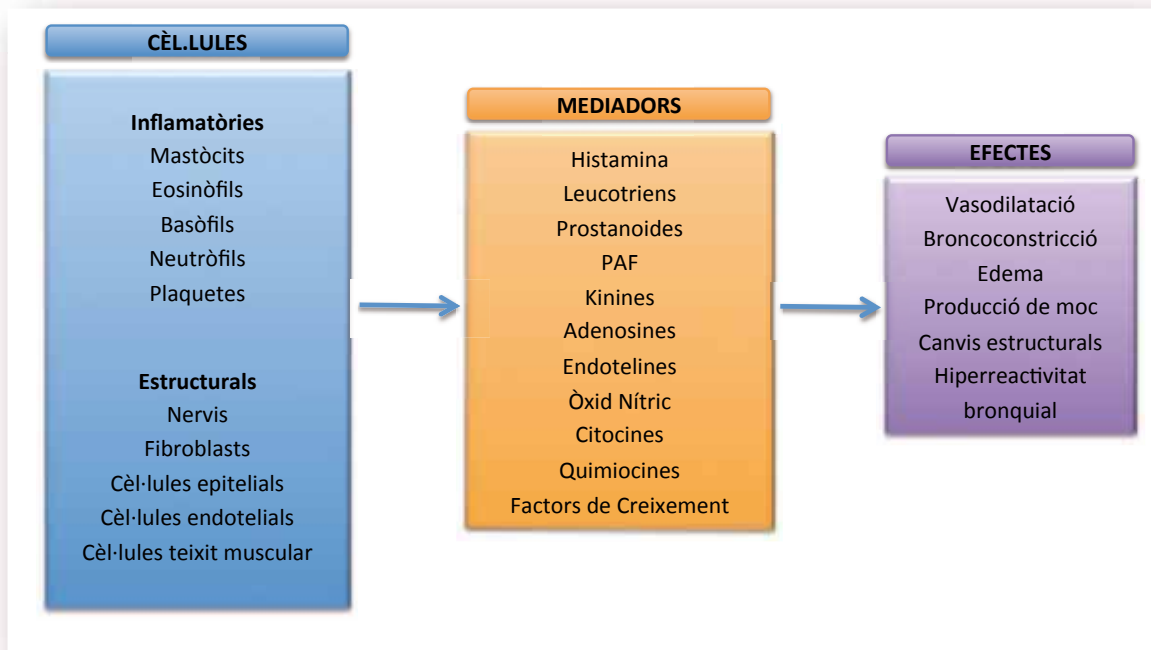
Els receptors de la histamina ( $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$ ,  $H_4$ ) pertanyen a la família dels receptors amb set dominis transmembrana lligats a proteïna G, i com d'altres receptors de la mateixa família s'expressen equilibradament en conformació activa i inactiva (5). El receptor  $H_1$  està present al sistema nerviós central i al múscul llis vascular, bronquial i gastrointestinal, i juntament amb el receptor  $H_2$  és el que s'expressa amb més quantitat. És el responsable de la broncoconstricció, participa al reflex de la tos, així com a l'augment de la permeabilitat vascular, la caiguda de les resistències perifèriques i la prurija. A través del receptor  $H_1$  la histamina incideix sobre la resposta immunològica induïda pels antigens, participant a la maduració de cèl·lules dendrítiques, la modulació del balanç de limfòcits  $Th1$  i  $Th2$  així com en l'alliberament de citocines pro-inflamatòries (6). El receptor  $H_2$  està present a la mucosa gàstrica, úter i múscul llis vascular. De fet els efectes de la histamina sobre el cor, com l'increment de la freqüència cardíaca o el vasoespasme coronari, estan mediatos per aquest receptor. El receptor  $H_3$  es localitza principalment als terminals nerviosos i té un efecte inhibidor, regulant la síntesi i l'alliberament de la histamina. Finalment el receptor  $H_4$ , l'últim en ser descrit i amb accions menys ben definides, s'expressa a medulla òssia i cèl·lules hematopoètiques a sang perifèrica i sembla tenir un paper en el reclutament d'eosinòfils (7).

La triptasa és una serin esterasa que s'acumula únicament als grànuls citoplasmàtics dels mastòcits i basòfils, preparada per actuar un vegada s'ha produït la desgranulació. Els mastòcits són la principal font de triptasa ja que aquest mediador és el principal component dels seus grànuls, i tot i que també és present als basòfils, les quantitats detectades són molt menors (8). La triptasa es secreta de forma constitutiva i en petites quantitats en els individus sans i és un biomarcador de l'activitat i de la massa mastocitària present. Per una banda s'utilitza en el diagnòstic de l'anafilaxi en fase aguda gràcies a la seva lenta metabolització, ja que es pot observar un pic en els nivells plasmàtics als 60-90 minuts i pot detectar-se en sang fins a 5 hores després de la reacció. Per una altra, l'elevació de la triptasa és un criteri diagnòstic de mastocitosi sistèmica (8, 9).

Altres mediadors característics de la resposta al·lèrgica són la quimasa o la menys

coneguda carboxipeptidasa A3. La quimasa és un altre mediador emmagatzemat als grànuls citoplasmàtics juntament amb la triptasa i la histamina. És la responsable d'activar el sistema renina-angiotensina, facilitant el pas de angiotensina I a angiotensina II i compensant la disminució de les resistències vasculars perifèriques i l'augment de la permeabilitat vascular induïdes per d'altres mediadors de la resposta al·lèrgica. La carboxipeptidasa A3 també sembla implicada en el metabolisme de l'angiotensina (8, 9) .

Figura 3. Mediadors i cèl·lules implicades a la resposta al·lèrgica

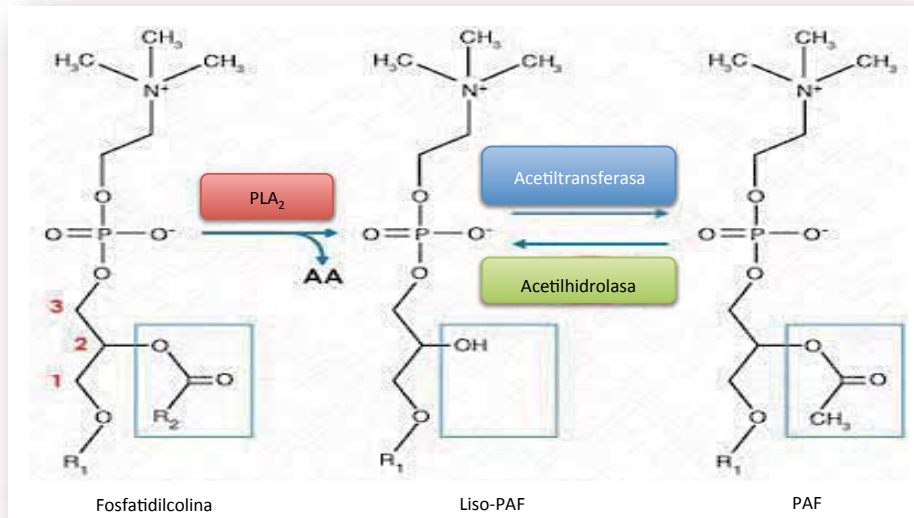


### Factor d'activació de plaquetes

El PAF és un mediador lipídic amb un destacat paper a les malalties al·lèrgiques però també a patologies tan diverses com el càncer o el rebuig de transplantaments (10, 11). Es tracta d'un fosfolípid sintetitzat en dues fases, una primera depenent de fosfolipasa A<sub>2</sub> i que és comuna al metabolisme dels eicosanoids, i una segona depenent de l'enzim AcetilCoA lisoPAF acetiltransferasa (figura 4). Té una vida mitjana molt curta, entre 3 i 13 minuts, i el seu pas de forma activa PAF a forma inactiva liso-PAF és catalitzat per la PAF acetilhidrolasa. Al igual que d'altres mediadors lípids com els eicosanoids el PAF no està emmagatzemat als grànuls intracel·lulars sinó que es

produeix de novo en resposta a un estímul. Tot i així la seva síntesi pot donar-se molt ràpidament i alliberar-se durant la primera fase de la resposta al·lèrgica. Moltes són les cèl·lules que tenen capacitat de sintetitzar PAF (plaquetes, neutròfils, monòcits, mastòcits, eosinòfils, basòfils, cèl·lules epitelials i endotelials) i la majoria d'elles també presenten receptors específics (PAF-r) (1, 12, 13). El receptor del PAF pertany a la superfamília de receptors acoblats a proteïna i fins a l'actualitat només se n'ha descrit un tipus, tot i que s'ha definit una variant en una mostra poblacional del apó que s'ha relacionat amb una menor sensibilitat pel PAF (14). El PAF-r, al igual que molts d'altres receptor acoblats a proteïna, existeix en forma monomèrica i dimèrica, fet que s'associa a una transducció de senyals intracel·lulars diferencial i per tant a un diferent efecte resultant després de la unió del seu lligand. De manera que l'estimulació de formes monomèriques en eosinòfils, s'associa a un procés de quimiotaxis i la unió del lligand a les formes dimèriques, desencadena la desgranulació cel·lular(15) (figura 5).

figura 5. Metabolisme del PAF

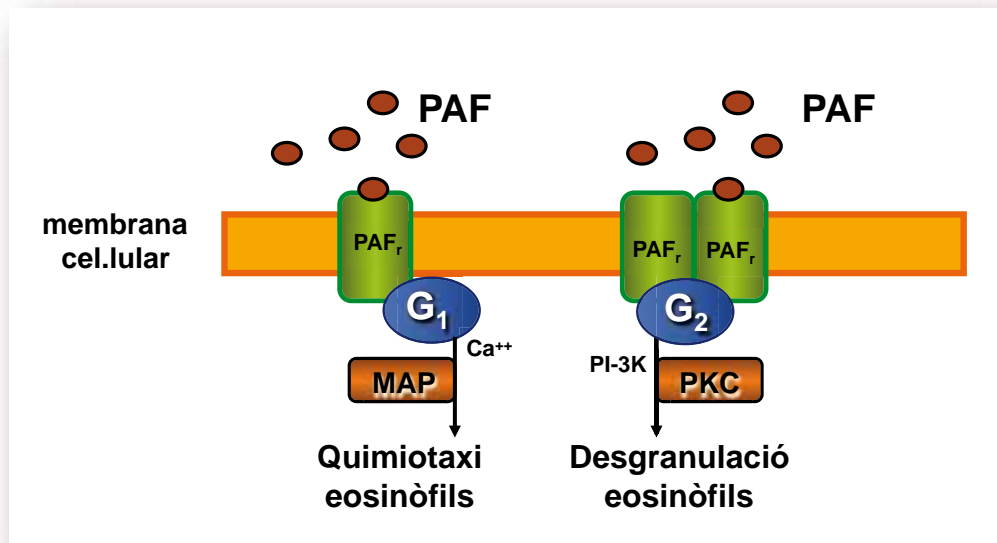


PLA<sub>2</sub> fosfolipasa A<sub>2</sub>  
AA àcid araquidònic

s'ha demostrat el paper del PAF a l'agregació de plaquetes, estimulació de neutròfils, activació de macròfags o augment de la permeabilitat vascular. Té un paper destacat a la quimiotaxi i l'activació als eosinòfils, augmentant l'afinitat per la gE, la supervivència i la secreció de proteïnes granulars (proteïna catiónica eosinofílica, ECP),

radicals lliure, leucotriens, metaloproteïna-9 i neutrotrofina-3 (1, 2, 15, 16). Però malgrat tota la bibliografia al respecte no ha estat fins fa pocs anys que s'ha pogut demostrar que el PAF també presenta un efecte sobre els mastòcits (humans i animals), cèl·lules encarregades per excel·lència de pivotar les respostes al·lèrgiques (17-19).

Figura 1. Representació de les formes actives (monomèrica i dimèrica) del receptor del PAF, de la via de transducció de senyals i de l'efecte associat a la unió del seu lligand.



- Ca<sup>++</sup> calci
- G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub> proteïna
- MAP proteïnes activades per mitògens (mitogen-activated proteins)
- PAF<sub>r</sub> receptor del PAF
- PI-3K fosfatidil inositol 3 quinasa (phosphatidylinositol 3 kinase)
- PKC proteïna quinasa C (protein-kinase C)

Diversos autors han demostrat que el PAF té un efecte diferencial segons l'origen dels mastòcits. De manera que és capaç d'induir l'alliberament d'histamina en mastòcits humans de pulmó i derivats de progenitors de sang perifèrica (PB-MC), però no en mastòcits cutanis, fet que s'explica per l'absència de receptors específics als mastòcits de la pell. Un altre aspecte rellevant és que tot i compartir la mateixa via de transducció de senyals (fosfolipasa C) amb la IgE, el temps que necessita el PAF per posar en marxa la maquinària cel·lular és molt menor. Mentre que el PAF només necessita 5 segons, el receptor de la IgE en necessita 40. Així la capacitat del PAF per activar molt ràpidament i de forma paracrina d'altres cèl·lules implicades als fenòmens

inflamatoris, juntament amb la seva capacitat d'induir l'alliberament de mediadors pre-formats, de neuropèptids i citocines, i de productes del metabolisme de l'àcid araquidònic, el converteixen en un potent amplificador de la resposta al·lèrgica (17, 18). Podríem estar davant de la clau que explicaria el fet que un estímul al·lèrgic local indueixi una resposta sistèmica com l'anafilaxi . Algunes evidències comencen a apuntar en aquest sentit tot i que encara queda molt recorregut per demostrar aquesta hipòtesi.

## 2. EL FACTOR D'ACTIVACIÓ DE PLAQUETES A L'AL·LÈRGIA RESPIRATÒRIA

La rinitis al·lèrgica s una malaltia amb una alta prevalença, tot i que aquesta pot variar en funció de la zona geogràfica, i que en termes generals es considera que es situa entre el 12-25 (20). L'asma s una malaltia que pot afectar fins al 4-7 de la població i que, al igual que la rinitis, presenta una gran variabilitat geogràfica. L'aparició de rinitis i asma de forma conjunta s un fet molt freq ent independentment del seu origen al·lèrgic o no . Així entre el 50-80 dels pacients amb asma presenten rinitis de forma concomitant i entre el 20-50 dels pacients amb rinitis presenten asma (20-22). Ambdós malalties es caracteritzen pel seu component inflamatori en el que estan implicats diferent tipus cel·lulars i mediadors, entre els quals podem destacar el PAF (1, 22-24).

### El paper del PAF a l'asma

La implicació del PAF a l'asma s'ha demostrat àmpliament. L'administració de PAF per via inhalatòria indueix broncoconstricció, increment de la hiperreactivitat bronquial i alteracions a l'intercanvi de gasos tant en individus sans com en pacients amb asma (25, 26). Els nivells de PAF detectats a l'esput o al rentat broncoalveolar dels individus amb asma són m s elevats que els trobats als controls sans (27, 28). s'ha correlacionat el dèficit de PAF acetilhidrolasa (PAF-A ), que s'encarrega de catabolitzar el PAF, amb la gravetat de l'asma. Però les evidències respecte al seu potencial com a objectiu terapèutic són discrepants. Alguns models murins han demostrat que l'administració de PAF-A inhibeix la hiperreactivitat bronquial, la eosinofília i l'increment en la producció de moc induïda per al·lèrgens (29) . Però d'altres no han estat capaços de demostrar una atenuació de la resposta bronquial a la provocació amb al·lèrgens en pacients amb asma lleu (30). els estudis realitzats

amb antagonistes del PAF també resulten contradictoris. Mentre alguns estudis havien demostrat que els individus asmàtics en tractament amb un antagonista del PAF presentaven una menor infiltració eosinofílica pulmonar (30, 31), una menor hiperreactivitat bronquial o una menor broncoconstricció induïda per PAF (32), molts d'altres estudis no han pogut corroborar una millora de la funció pulmonar, de l'ús de medicació broncodilatadora de rescat o de corticoides, de les puntuacions de símptomes o de la hiperreactivitat bronquial (26, 33, 34). De manera que tot i les evidències de que el PAF exerceix algun tipus de paper en la fisiopatologia de l'asma, no es pot assegurar amb contundència que la seva inhibició pugui ser considerada un objectiu terapèutic.

### El paper del PAF a la rinitis

El paper del PAF a la rinitis encara està per establir-se, però sembla que de tots els mediadors inflamatoris relacionats amb la rinitis al·lèrgica és potser el més potent inductor de la extravasació vascular, i així el principal contribuent a la rinorrea i la congestió nasal (35). Tant el PAF com el seu precursor i metabòlit liso-PAF han estat detectats a les secrecions nasals i al plasma dels individus amb rinitis. Els estudis realitzats amb provocacions nasals amb al·lèrgens han demostrat un increment dels nivells de liso-PAF i PAF-A als rentats nasals, amb un pic als 10 minuts i un retorn als valors basals als 60 (36). La instil·lació de PAF a nivell nasal induïx, de forma similar a com succeeix a l'asma, l'aparició dels símptomes de rinitis, la disminució de la permeabilitat nasal, l'augment de l'infiltrat eosinofílic i neutrofílic local, així com l'increment de la hiperreactivitat i l'augment de les resistències nasals (37-41). Però al contrari del que succeeix a l'asma, els antagonistes del PAF només han estat provats en models animals (42, 43). Malgrat i els resultats esperançadors i l'evidència del possible paper del PAF en el desenvolupament de la inflamació nasal, es fa necessària la realització de estudis en éssers humans per tal de demostrar l'eficàcia de la seva inhibició a la rinitis.

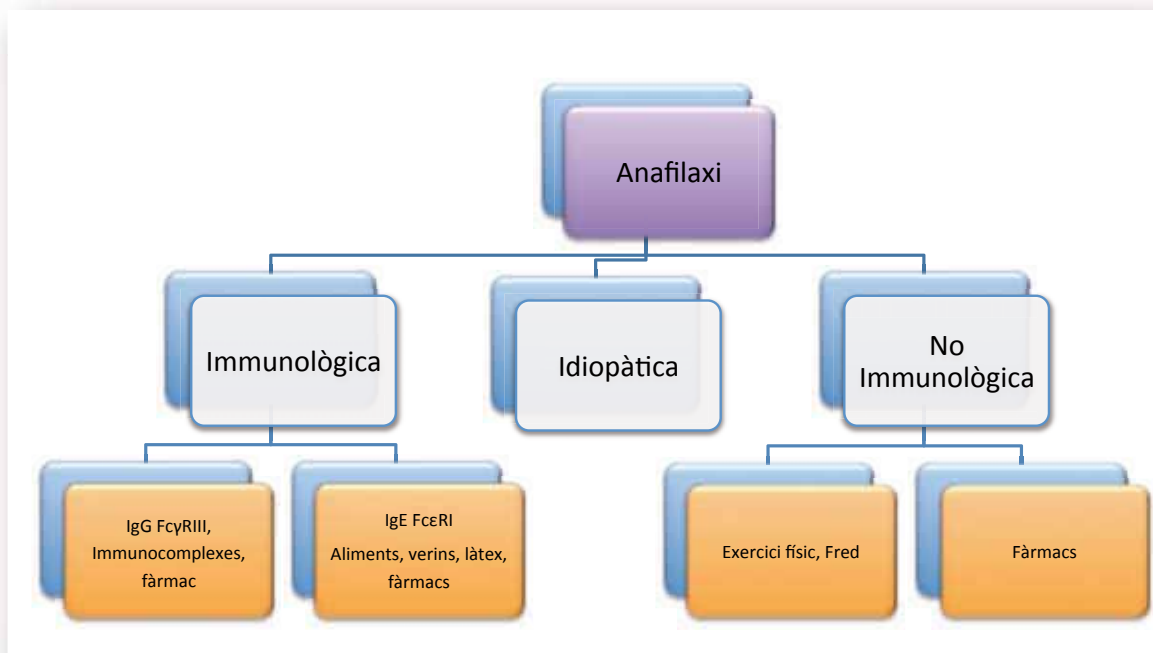
## 3.EL FACTOR D'ACTIVACIÓ DE PLAQUETES A L'ANAFILAXI

L'anafilaxi és una patologia que, malgrat ser coneguda des de fa més de 100 anys, encara suposa un repte pel que respecta al diagnòstic, tractament i sobretot profilaxis. La seva naturalesa la converteixen en una emergència mèdica i en un problema de salut, tant per la seva potencial letalitat com per la repercussió a la

qualitat de vida dels pacients (44). L'anafilaxi es definia clàssicament com una reacció d'hipersensibilitat induïda per gE, però la rganització Mundial de l'Al·lèrgia ( A ) així com d'altres experts en la matèria, ha suggerit canvis a la terminologia amb l'objectiu de tenir sota la mateixa nomenclatura reaccions clínicament similars tot que potser fisiopatològicament diferents (45, 46). Una d'aquestes propostes terminològiques la podem veure a la figura 6. La incidència exacta de les reaccions anafilàctiques s desconeguda, però s'estima que es produeixen aproximadament entre 50 i 2000 reaccions per cada 100.000 persones-any. Malgrat aquestes dades aproximatives, els experts creuen que l'anafilaxi està en augment i que les dades disponibles infra-estimen clarament el problema (47). Els agents etiològics principalment implicats a les reaccions són els aliments, els medicaments o els verins d'insectes, tot i que la proporció pot variar en funció de l'àrea geogràfica i l'edat del pacient (48, 49).

Els mediadors que s'alliberen durant les reaccions anafilàctiques s'han convertit en objecte d'estudi donat el seu paper potencial com a biomarcadors o com a objectius terapèutics. Aquest s el cas de la triptasa, la histamina (8, 44) o podria ser el cas del PAF.

figura . Nomenclatura de l anafilaxi



## Evidències obtingudes a partir de models animals

Gràcies als models animals d'anafilaxi, disposem d'informació valuosa sobre els mecanismes fisiopatològics sense tenir que sotmetre als nostres pacients a provocacions (amb al·lèrgens) potencialment perilloses. S'ha demostrat l'existència de dos mecanismes d'anafilaxi, el denominat clàssic on la IgE està unida al receptor d'alta afinitat (FcεR ) i el mediador principalment alliberat és la histamina. El mecanisme denominat alternatiu, on la immunoglobulina determinant és la IgG que s'uneix al receptor de baixa afinitat (FcγR ), i on el mediador principal és el PAF (50-52). Els motius pels quals es desencadena la reacció per un mecanisme o per l'altre estan encara per dilucidar, tot i que sembla que la naturalesa i la concentració de l'antígen hi poden estar implicades (53). Però malgrat que el PAF no sigui el principal mediador de les anafilaxi induïdes per IgE, sí que sembla tenir-hi un paper rellevant (54). Així es demostra en un model murí d'anafilaxi per cacauet, on la inhibició del PAF va reduir la gravetat dels símptomes i accelerar la recuperació dels animals, en contraposició a la falta d'eficàcia dels antihistamínics (55). Aquest fet i l'absència d'evidència que suporti l'efecte beneficiós dels antihistamínics en el tractament de l'anafilaxi (56) fan pensar als autors que, si bé la histamina pot ser un biomarcador de fase aguda no sembla ser un mediador imprescindible pel desenvolupament de les reaccions. Ans al contrari, el PAF podria ocupar aquesta posició dual de biomarcador i objectiu terapèutic.

## Evidències obtingudes a partir de models humans

Malgrat les evidències del paper del PAF a les anafilaxi en models murins no és fins el 2008 que es publiquen dades que confirmen la seva rellevància a l'anafilaxi en humans. En un estudi publicat al *New England Journal of Medicine* (11) es posa de manifest que els individus que pateixen una anafilaxi presenten nivells de PAF (a la fase aguda) superiors als controls, valors que s'incrementen proporcionalment amb la gravetat de la reacció. No només els nivells de PAF són diferents, sinó que l'enzim encarregat d'inactivar el PAF, la PAF-A , també presenta un comportament diferencial. De manera que tot i que l'activitat global de l'enzim no era diferent entre els grups avaluats, els pacients amb anafilaxi més greus presentaven més freqüentment una disminució de l'activitat de la PAF-A . De fet els nivells i l'activitat de la PAF-A dels individus morts per anafilaxi era inferior en comparació amb un grup heterogeni de controls (adults i nens sans, nens amb al·lèrgia al cacauet, individus amb anafilaxi per cacauet i adults morts per causes diferents a l'anafilaxi)



(11). D'aquesta manera, tot i que nom s'es tracta d'un estudi amb una mostra relativament reduïda de pacients (41 individus), sembla reforçar l'evidència de que el PAF és un mediador important també a les reaccions anafilàctiques.

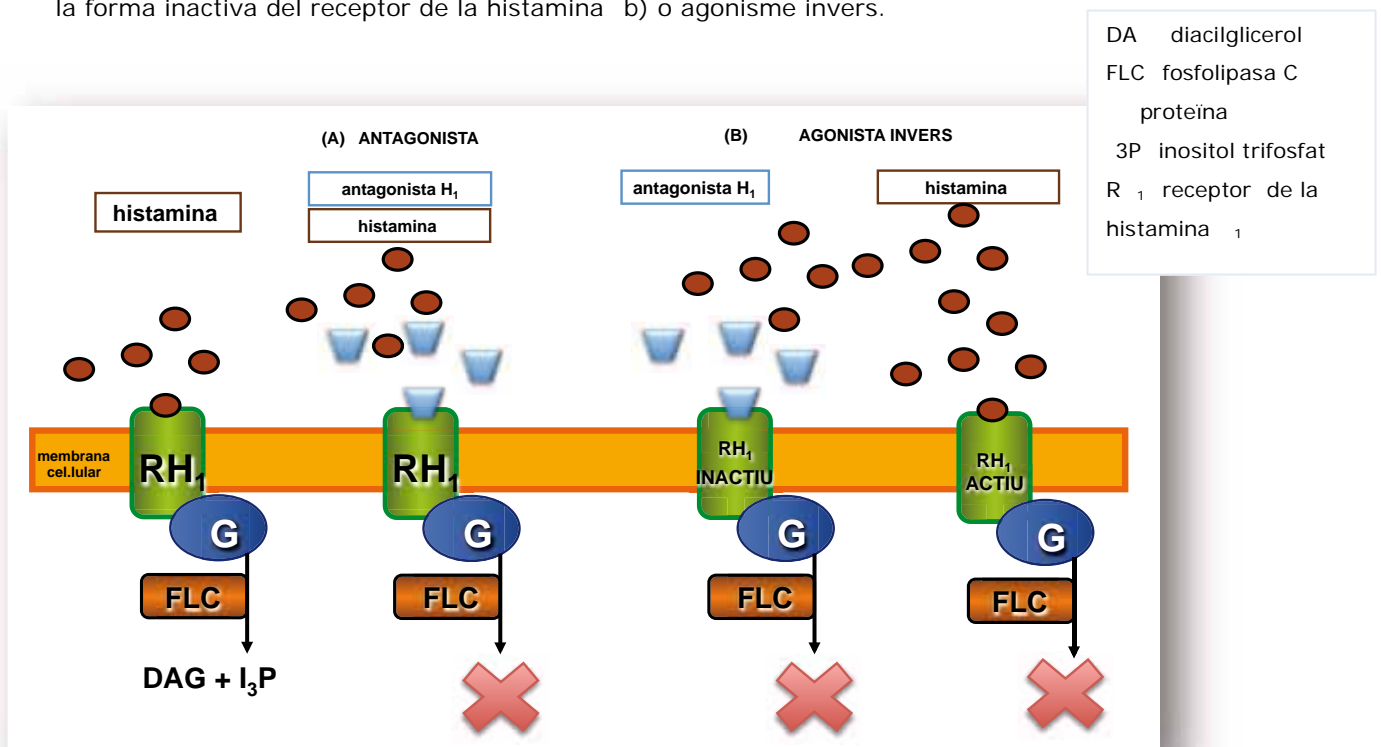
## 4. CARACTERÍSTIQUES DELS INHIBIDORS DE LA RESPOSTA AL·LÈRGICA: ANTIHISTAMÍNICS I ANTAGONISTES DEL PAF

### 4.1. Antihistamínics

Els antihistamínics són els fàrmacs més freqüentment emprats en el tractament de les malalties al·lèrgiques i són un dels grups farmacològics més habitualment prescrits a la població general (57). Quan fem el terme antihistamínic ens estem referint als inhibidors del receptor  $H_1$  d'histamina, i no als inhibidors del receptor  $H_2$  com la cimetidina o ranitidina, o els nous antagonistes del receptor  $H_3$ .

Els antihistamínics actuen habitualment com a agonistes inversos, és a dir, estabilitzant la conformació inactiva del receptor  $H_1$ , tot i que en ocasions es poden comportar com a antagonistes neutres, interferint en la unió de la histamina al seu receptor (5) (figura 7)

Figura 7. Es veu el mecanisme d'acció dels antihistamínics. El bloqueig de l'alliberament d'histamina es produeix o bé pel bloqueig del receptor d'histamina a) o per l'estabilització de la forma inactiva del receptor de la histamina b) o agonisme invers.



Els antihistamínics es divideixen des del punt de vista farmacològic en dos grups. Els denominats de primera generació tenen una baixa especificitat pel receptor i per tant més efectes secundaris relacionats amb la seva unió als receptors colinèrgics, serotoninèrgics i dopaminèrgics. En contraposició, els de segona generació tenen un efecte més selectiu sobre els receptors  $H_1$  i per tant menys efectes secundaris. Molts d'aquests antihistamínics de nova generació també presenten propietats antiinflamatòries, també denominades anti-al·lèrgiques, com és la capacitat per inhibir l'alliberament de leucotriens o prostaglandina  $D_2$ , la infiltració eosinofílica, la síntesi de citocines o inclús la hiperreactivitat bronquial (58) i per aquest motiu alguns autors els han denominat de tercera generació (20, 59). Però malgrat l'evidència d'aquest efecte afegit sobre la inhibició de l'histamina encara existeix certa polèmica sobre la rellevància real d'aquestes propietats antiinflamatòries sobre els símptomes dels pacients, que sembla ser molt menor que l'efecte antiinflamatori demostrat pels corticoides (aula 1).

Taula 1. Efecte antiinflamatori in vivo i in vitro d'alguns antihistamínics de segona generació

Fàrmac	Efecte INHIBITORI in vitro	Efecte INHIBITORI in vivo
Cetirizina Levocetirizina	Adhesió i supervivència d'eosinòfils Quimiotaxi d'eosinòfils, neutròfils, limfòcits i monòcits Alliberament L-8, MCP-1 RAN E, NF-κB	Reclutament d'eosinòfils a pells i bronqui Producció de CAM-1 a secrecions nasals i conjuntivals
Desloratadina	Quimiotaxi d'eosinòfils Generació de superòxids Producció de NF-α, L-1, L-6, L-8, L-13, P-selectina, CAM-1	
Rupatadina	Alliberament de PAF i NF-α	
Azelastina	Quimiotaxi d'eosinòfils i neutròfils Generació de superòxid Producció de L-4, L-5, NF-κB	Reclutament d'eosinòfils a mucosa nasal Producció de CAM-1 a secrecions nasals i conjuntivals
Cetirfenadina Fexofenadina	Quimiotaxi i adherència d'eosinòfils Generació de superòxids Producció de L-6, L-8, NF-α, M-C F	Producció de CAM-1 a les secrecions nasals
Mizolastina		Reclutament de neutròfils Producció de 5-lipoxigenasa

Adaptat de Antihistamínicos y descongestivos (C. Jureguiresa, J. J. Martínez Antón, J. J. Amboaboa Setién, J. Antón para Ercoreca) a Tratado de Alergología

M-C F factor estimulador de colònies  
CAM-1 molècula d'adhesió intracel·lular  
MCP-1 proteïna quimiotàctica de monòcits  
NF-κβ factor nuclear κβ  
PAF factor d'activació plaquetari  
RAN E Regulated upon Activation, Normal -cell Expressed, and secreted  
NF-α factor de necrosi tumoral α

#### 4.1.1. Els antihistamínics a la rinitis i a l'asma bronquial

Els antihistamínics són els fàrmacs de primera elecció al tractament de la rinitis al·lèrgica en qualsevol dels esglaons de gravetat o durada dels símptomes (intermitent Vs persistent i lleu Vs moderada-greu) (20), i el seu efecte és més important sobre la rinorrea, la pruija o els esternuts, mostrant en general una escassa eficàcia sobre la congestió nasal. Els antihistamínics han demostrat millorar la qualitat de vida dels pacients amb rinitis al·lèrgica al disminuir la freqüència i intensitat dels símptomes (20, 60, 61), així com la somnolència diürna gràcies al seu efecte beneficiós sobre la qualitat del son (62).

Està demostrat que l'histamina és capaç de produir diferents efectes sobre l'arbre bronquial de pacients amb asma, com és ara la broncoconstricció o l'edema. Així mateix també s'ha evidenciat que als rentats broncoalveolars dels asmàtics els nivells d'histamina són superiors als dels individus sans (63, 64). Però malgrat el suposat paper de la histamina en la fisiopatogènia de l'asma i que existeixen alguns estudis a favor, els antihistamínics no han demostrat de forma concloent la seva utilitat. Una revisió sistèmica realitzada al 2008 va demostrar que el ketotifè podria ser eficaç en el tractament de l'asma lleu o moderat, sol o en combinació amb d'altres fàrmacs, a la població infantil (65). L'estudi EAC, també realitzat a l'àmbit pediàtric, va demostrar que en un grup nens amb dermatitis atòpica i sensibilitzats a aeroal·lèrgens, el tractament amb cetirizina durant 18 mesos reduïa en un 50% el risc de desenvolupar asma en comparació amb el placebo (66). En canvi els estudis realitzats en adults no han demostrat resultats tan evidents. Per una banda, alguns antihistamínics com la terfenadina (240 mg) (67), la cetirizina (20 mg) (68) o l'astemizol (30 mg) (69) han demostrat tenir un cert efecte inhibidor sobre el broncoespasme induït per diferents estímuls, tot i que aquest sempre han estat amb dosis molt superiors a les contemplades a la fitxa tècnica. Tot i que les diferències respecte al placebo han estat estadísticament significatives, la magnitud de la resposta (caiguda del VEMs del grup placebo 28,7 Vs grup antihistamínic 21,6) (70) no ha estat suficient en cap dels casos com per considerar-los fàrmacs d'elecció a l'asma. Ara bé, això no significa que els pacients asmàtics no es puguin beneficiar del tractament amb antihistamínics. Donada l'evident relació entre la via respiratòria superior e inferior, tant des del punt de vista epidemiològic com fisiopatològic (20, 70, 71), podem entendre que l'ús d'antihistamínics de forma concomitant al tractament antiasmàtic pugui disminuir el número de visites a urgències per exacerbacions asmàtiques o inclús l'ús de medicació de rescat (72, 73). Aquest

efecte no és degut a l'acció de l'antihistamínic sobre la via respiratòria inferior, com ja han descartat alguns estudis, sinó que es produeix de forma secundària al control de la inflamació de la via superior.

En definitiva, l'ús antihistamínic suposa un benefici pels pacients amb rinitis al·lèrgica pels seus efectes obvis sobre la mucosa nasal, però també pels pacients amb asma per la repercussió que el tractament de la rinitis té sobre el control de l'asma. En el cas dels pacients en edat pediàtrica podríem suposar, a la vista dels estudis existents, que poguessin tenir algun tipus d'efecte directe sobre la via respiratòria o cert efecte profilàctic en pacients de risc.

#### 4.1.2. Els antihistamínics a l'anafilaxi

Les reaccions anafilàctiques són encara avui dia una entitat clínica infradiagnosticada i infratractada, tant entre els individus que sobreviuen a elles com entre els que no ho fan (44, 74, 75). Tot i que l'adrenalina es considera el tractament d'elecció, els antihistamínics i els corticoides encara són els fàrmacs que s'utilitzen més freqüentment (74, 75). Una revisió sistemàtica publicada el 2007 (56) no va ser capaç de trobar una evidència prou sòlida que recolzés l'ús d'antihistamínics durant la fase aguda de l'anafilaxi, però tampoc va trobar arguments en contra. Sembla clar que els antihistamínics poden tenir cert efecte beneficiós sobre alguns dels símptomes més lleus que presenten els pacients, com la urticària o la rinorrea, però són del tot insuficients en el tractament d'un edema laringi, un broncoespasme o els símptomes gastrointestinals. Algun estudi, o fins i tot la pròpia experiència, poden conferir als antihistamínics un potencial que realment no tenen. La milloria observada en un anafilaxi tractada únicament amb antihistamínics és més fàcilment atribuïble a una milloria espontània, gràcies als mecanismes endògens de compensació (alliberament de adrenalina i angiotensina endògena), que no pas a l'efecte d'aquests fàrmacs (46, 76). De fet, donat la gran quantitat de mediadors que s'alliberen durant una reacció anafilàctica és difícil creure que només el bloqueig d'un d'ells pugui tenir la clau del tractament (55, 76). És aquest concepte el que ha estat confirmat per alguns estudis amb animals, on el bloqueig únicament de la histamina va demostrar ser incapaç d'inhibir la reacció anafilàctica, fet que sí s'aconseguia amb la inhibició combinada de la histamina i altres mediadors (serotonina (77) i PAF (55)).

## 4.2. Antagonistes del PAF

’ha demostrat que una gran varietat de molècules estructuralment diferents poden actuar com a antagonistes del PAF, tot i que solen compartir la seva capacitat per estabilitzar la forma inactiva del receptor, s a dir, solen actuar com a antagonistes inversos.

Actualment no disposem de fàrmacs antagonistes del PAF aprovats per a la seva utilització en sers humans, de manera que gran part de l’evidència sobre la seva eficàcia ens la donen els estudis realitzats en models in vitro i amb animals. Malgrat això en alguns estudis en asmàtics s’han utilitzat alguns antagonistes de forma experimental i al mercat existeix un fàrmac antihistamínic, la rupatadina, que tamb ha demostrat tenir un efecte inhibitori de l’acció del PAF (78).

### 4.2.1. Paper dels antagonistes del PAF a l’asma i la rinitis

Els estudis realitzats amb antagonistes del PAF en pacients asmàtics resulten contradictoris. Alguns treballs han demostrat que els individus asmàtics que rebien tractament amb un antagonista del PAF ( -24180) presentaven una menor infiltració eosinofílica pulmonar (31) i hiperreactivitat bronquial, així com una menor broncoconstricció en resposta a l’estimulació amb PAF (25, 32). En canvi, molts d’altres estudis no han pogut demostrar que l’antagonisme del receptor del PAF pugui millorar la funció pulmonar, l’ús de medicació broncodilatadora de rescat o de corticoides, les puntuacions de símptomes o la hiperreactivitat bronquial (26, 33, 34). De manera que tot i les evidències de que el PAF exerceix algun tipus de paper en la fisiopatologia de l’asma, no sembla que la seva inhibició pugui ser considerada un objectiu terapèutic.

Al contrari del que succeeix a l’asma, els antagonistes del PAF nom s han estat provats en models animals de rinitis però amb resultats esperançadors. L’antagonista AB -491 ha demostrat la seva capacitat per inhibir, en rata i conill porquí, l’augment de la permeabilitat vascular i de les resistències perifèriques induïdes per PAF o per un al·lèrgic (42). L’antagonista U -74505 ha demostrat que s capaç d’inhibir l’increment de resistències nasals induïdes per PAF (79). Però tot i aquests bons resultats en els models animals s del tot imprescindible realitzar estudis in vivo en sers humans.

#### 4.2.2. Paper dels antagonistes del PAF a l'anafilaxi

Al igual que en els models de rinitis, l'evidència que suporta l'efecte dels antagonistes del PAF a l'anafilaxi prové bàsicament dels models animals. Alguns treballs han demostrat que alguns antagonistes del PAF (CV6209) tenen un efecte superior als antihistamínics (difenidramina) pel que respecte al control de la hipotensió induïda per PAF en ratolins (52). En aquesta línia apunten alguns treballs realitzats en ratolins al·lèrgics a cacauet, on l'administració de l'antagonista del PAF (AB -491) demostrava una eficàcia superior a la de l'antihistamínic, millorant la supervivència i reduint el temps de recuperació. De fet la utilització d'ambdós antagonistes (antihistamínic i anti-PAF) era encara més eficaç, demostrant una vegada més que en la fisiopatogènia de les malalties al·lèrgiques intervenen diversos mediadors i que la inhibició múltiple és probablement el millor dels abordatges (55). Malgrat que la majoria dels treballs recolzen aquesta idea existeixen alguns treballs que no han aconseguit demostrar aquest supòsit (80), però s'ha de tenir en compte que l'eficàcia dels antagonistes del PAF podria dependre del fàrmac utilitzat, els símptomes o efectes que s'avaluen, el model animal o l'estímul desencadenant de l'anafilaxi.

#### 4.3. Fàrmacs utilitzats als estudis

##### 4.3.1. Antagonistes del receptor del PAF

###### WEB2086 o Apafant

El WEB2086 (apafant) és una benzodiazepina que s'ha utilitzat exitosament en diversos estudis sobre l'asma (81) o la dermatitis (82). Es tracta d'un agonista invers (83) i al igual que el PAF té capacitat per activar la via de la protein quinasa C (PKC) i de regular a la baixa l'expressió del receptor del PAF (PAF-r). Diversos estudis han demostrat que WEB2086 és capaç d'inhibir l'activació (flux de calci i producció d'inositol fosfat) induït pel PAF (84, 85) i l'alliberament de leucotriens induïda per endotoxines (86). Respecte als escassos estudis in vivo, en un model animal de conill no s'ha pogut demostrar que el seu efecte sigui superior al de la clorfeniramina en la inhibició de l'anafilaxi induïda per IgE (80).

###### BN52021 o Ginkgolide B

Un altre antagonista del PAF, el BN52021 o ginkgolide B, ha demostrat ser un efectiu inhibidor de la desgranulació (87) i de l'increment de la permeabilitat vascular (88) induïdes per PAF en mastòcits de rates. És capaç d'augmentar la supervivència

cel·lular, com s'ha demostrat en un model murí, i d'inhibir la unió del PAF al seu receptor a eosinòfils i neutròfils (89). Malgrat tot això també existeixen dades en contra, i alguns estudis han evidenciat la seva ineficàcia a l'hora d'inhibir el flux de calci induït per PAF en un model de mastòcits humans derivats de sang perifèrica (17).

#### CV6209

Una altra molècula amb efecte anti-PAF demostrat és el CV6209, capaç d'augmentar la supervivència cel·lular en un model d'apoptosi induïda per PAF (90) i de disminuir el flux de calci relacionat amb l'estimulació amb PAF en mastòcits humans derivats de sang perifèrica (17). També s'ha utilitzat en models murins, on ha demostrat tenir un efecte superior a la difenidramina a l'hora d'inhibir la hipotensió induïda per PAF (91).

### 4.3.2. Antagonistes del receptor de la histamina

#### Rupatadina

El fumarat de rupatadina és un derivat de l'azatadina comercialitzat com a inhibidor dual de la histamina i el PAF. Presenta una ràpida absorció oral i un metabolisme hepàtic, fruit del qual es generen diferents metabòlits que poden romandre actius fins a 24 hores, entre els quals es troba la desloratadina (92). La rupatadina ha demostrat tenir un efecte antagonista del receptor del PAF, tot i que aquest és 42 vegades menor respecte al de l'apafant (EB2086) i 2 vegades menor al del ginkgolide B (78).

#### Estudis in vivo

Els estudis in vivo realitzats en models animals ha demostrat la capacitat de la rupatadina per inhibir la contracció intestinal, la hipotensió i el broncospasme (78, 93) induïts per la histamina. En un model humà d'exposició a al·lèrgens (Cambra de Viena) ha demostrat ser més efectiu que el placebo controlant els símptomes (94). Des d'un punt de vista clínic els estudis realitzats en adults i adolescents han demostrat la seva eficàcia en el tractament de la rinitis al·lèrgica i la urticària crònica. Diversos autors corroboren que la seva eficàcia és superior al placebo i similar a d'altres antihistamínics com la loratadina, la cetirizina o l'ebastina (92, 95-97).

respecte al seu efecte anti-PAF, s'ha evidenciat que disminueix la mortalitat induïda per PAF en ratolins i que aquest efecte és similar en intensitat al de l'antagonista del PAF EB2086 (apafant) (51).

### Estudis in vitro

Els estudis realitzats en diversos tipus cel·lulars han demostrat l'efecte antial·lèrgic de la rupatadina, és a dir, aquell que va més enllà de la inhibició de la histamina. Coma exemples tenim la seva capacitat per bloquejar l'alliberament de NF- $\alpha$  i diferents interleucines (L-6, L-8, L-10, L-13) als mastòcits humans (MC-1 i LAD-2), de leucotriens C<sub>4</sub> als mastòcits de rata, de interleucina-5 a limfòcits humans i el reclutament dels eosinòfils (98-102). La seva capacitat per inhibir l'alliberament d'histamina induïda per diferents estímuls tant dependent de gE com independent, en mastòcits de gossos i de rata, també ha estat estudiada, demostrant que té un efecte inhibidor superior a la loratadina i similar a la cetirizina (78, 99, 100). La rupatadina també ha evidenciat la seva capacitat per inhibir l'agregació de les plaquetes induïda per PAF de forma similar a com ho fan els antagonistes del PAF (EB2086 y BN52021) efecte que no demostren altres antihistamínics com la loratadina i que permeten atribuir aquesta acció a la capacitat de la rupatadina per actuar sobre el receptor del PAF (78).

### Desloratadina

La descarboetoxiloratadina o desloratadina és el metabòlit actiu de la loratadina i de la rupatadina amb major potència antihistamínica que la loratadina. Presenta una gran afinitat i selectivitat pels receptors  $H_1$ , una baixa lipofília motiu pel que difícilment travessa la barrera hematoencefàlica i un metabolisme mínim, de manera que no presenta interaccions amb d'altres fàrmacs (103).

### Estudis in vivo

Un meta-anàlisi publicat al 2007 va corroborar que la desloratadina disminuïa de forma significativa els símptomes propis de la rinitis al·lèrgica, i en comparació presentava un efecte superior al placebo sobre la congestió nasal. De la mateixa manera es va demostrar que la desloratadina era capaç de disminuir l'eosinofília nasal. En canvi els estudis comparatius amb la levocetirizina no van evidenciar diferències entre els dos fàrmacs en aquests efectes (103).

### Estudis in vitro

Molts són els estudis realitzats amb desloratadina utilitzant tipus cel·lulars, dosis i estímuls diversos, fet que dificulta considerablement la comparació. En el cas dels models amb cèl·lules animals podem destacar com la desloratadina és capaç d'inhibir l'alliberament d'histamina en mastòcits de rata, de gos o humans (93, 104, 105). En



el cas dels mastòcits humans ha demostrat ser capaç d'inhibir l'alliberament de citocines, histamina, NF- $\alpha$ , L-6 i L-8 (106, 107) efecte similar a l'observat sobre l'alliberament de d' L-4 i L-13 en basòfils o de triptasa i ECP en una barreja de cèl·lules originaries de pòlips nasals (107, 108).

### Levocetirizina

La cetirizina s la barreja dels enantiòmers levo i dextro, i la seva activitat antihistamínica depen del seu L-enantiòmer (levocetirizina). L'afinitat de la levocetirizina pel receptor  $H_1$  s dos vegades superior a la de cetirizina, així 10 mg de cetirizina equivalen a 5 mg de levocetirizina. El 85 de l'excreció de levocetirizina s a traves de l'orina, de manera que s'han d'ajustar les dosis i els intervals posològics en cas d'insuficiència renal (109).

### Estudis *in vivo*

La quantitat d'estudis clínics que s'han portat a terme amb la levocetirizina és molt destacable. Respecte als estudis farmacodinàmics, la levocetirizina va demostrar ser més ràpida i més potent en inhibir la fava induïda per la histamina o pel verí de mosquit que els seus comparadors, loratadina, ebastina, mizolastina i fexofenadina (110-112). Des del punt de vista clínic la levocetirizina és superior al placebo, millorant tots els símptomes de rinitis, fins i tot la congestió nasal, tot i que aquest efecte triga tres setmanes en aconseguir-se en comparació amb els set dies que triguen en millorar la resta de símptomes (113, 114). El treballs comparatius amb d'altres antihistamínics, bàsicament en desloratadina, no demostren que tingui un efecte superior (115). Tot i que alguns autors havien demostrat que la levocetirizina podria tenir cert efecte sobre la congestió nasal tant administrada a demanda com de forma continua (116, 117), no sembla que la seva administració de forma concomitant amb corticoides tòpics nasals (fluticasona) o montelukast n'incrementi l'eficàcia (118). En canvi aquest efecte si que s'observa amb alguns models *in vitro* amb desloratadina(119). Aquest fet fa considerar que si levocetirizina presenta algun efecte sobre la congestió nasal aquest no és ni de bon tros tan important com el dels corticoides o antagonistes dels leucotriens.

### Estudis *in vitro*

Al contrari dels altres antihistamínics revisats, la levocetirizina no disposa de massa estudis *in vitro* que evidenciïn la seva eficàcia. Alguns dels realitzats en eosinòfils humans han demostrat que la levocetirizina (1  $\mu$ M) és capaç d'inhibir l'alliberament

de metaloproteïnases 1,4 i 9 i de IL-1 $\beta$  i IL-17, així com de controlar la migració transendotelial induïda per l'eotaxina (120-122). En un rang de dosi que va del 0,1 nM a l'1  $\mu$ M també inhibeix l'expressió de VCAM-1 (molècula d'adhesió de l'endoteli vascular) a fibroblasts de pòlips nasals (122-124).

A la taula 2 es descriuen les característiques generals dels estudis realitzats amb antagonistes del PAF i antihistamínics, des del punt de vista de les dosis i els tipus cel·lulars utilitzats.

Taula . Comparaci de les caracter sti ues dels diferents estudis realitzats amb antihistam nics i antagonistes del A

Ca: calci  
ECP: proteïna catiònica eosinòfila  
IL: interleucina  
IP: inositol fosfat  
MC: mastòcits  
MP: metaloproteasa  
N/A: no aplicable  
PAF: factor d'activació plaquetari  
RBA: rentat broncoalveolar  
TNF- $\alpha$ : factor de transcripció tumoral  $\alpha$   
VCAM: molècula d'adhesió de l'endoteli vascular

	Models Animals	Dosi	Models humans	Dosi
WEB2086	upre 3) Inhibició Ca/IP Inhibició del receptor de PAF Activació PKC COS-7	10-100 µM	N/A	
	Ste art ) Inhibició cèl·lules endotelials i leucòcits bovins	10-100 µM	N/A	
	Centemeri (141) Inhibició Ca MC de rata	0,1-10 µM	N/A	
CV6209			a i ara 1 ) Inhibició histamina i flux de Ca MC humans	0.2-200 µM
BN52021	Northover(87) Inhibició de la desgranulació MC de rates	10 µM	a i ara 1 ) Inhibició alliberament histamina i flux de Ca MC	5-50 µM
	ei ) Inhibició de l'increment de la permeabilitat vascular MC rates	5 µg	N/A	
Rupatadina	erlos ) Inhibició de la contracció intestinal Conill porquí	3-30 nM	Barron 1 1) Inhibició de l'alliberament de IL-5 Limfòcits	
	erlos ) Inhibició de la hipotensió i el broncospasme induïts per PAF Ratolins	ID <sub>50</sub> 0,44 mg/kg i 0,0096 mg/kg respectivam ent	erlos 1 ) Inhibició del reclutament d'eosinòfils al RBA	
	erlos ) Inhibició alliberació de LTC <sub>4</sub> MC de rata		asiadi ) Inhibició de l'alliberament de TNF-α, IL(6,8,10,13) MC (HMC-1 i LAD-2)	1,5,10,25,50 µM
	ueralt ) Inhibició de l'alliberació d'histamina MC gos	0,1-30 µM	N/A	
	erlos ) Inhibició de l'agregació plaquetària induïda per PAF Conills	0,3-30 µM	N/A	

Levo-cetirizina	N/A		Thomson et al 11 1 ) Inhibició de MP-1, MP-4,MP-9, IL-1 $\beta$ , IL-17, eotaxina Eosinòfils	1 $\mu$ M
	N/A		ettecchia 1 ) Inhibició de l'expressió VCAM-1 Fibroblasts de pòlips	0,1-100 $\mu$ M
Des-loratadina	ueralt ) Inhibició de l'alliberament d'histamina MC de gos	0,1-30 $\mu$ M	hao 1 ) Inhibició d'alliberament de citocines MC humans	0,0001-1 $\mu$ M
	ang 1 3) Inhibició de l'alliberament d'histamina MC rata	0,01-100 $\mu$ M	o alski 1 ) Inhibició de l'alliberament d'ECP/triptasa Pòlips nasals	1-100 $\mu$ M
	N/A		eller 1 ) Inhibició de l'alliberament d'histamina MC humans pell	0,01-100 $\mu$ M
	N/A		Schroeder 1 ) Inhibició de l'alliberament d'histamina, IL-4, IL-13 Basòfils	0,1-10 $\mu$ M

# HIPÒTESI

---

## HIPÒTESI PRINCIPAL

El PAF juga un paper destacat en la resposta al·lèrgica nasal i, per tant, la inhibició de la unió del PAF al seu receptor es tradueix en una inhibició de la resposta al·lèrgica.

## HIPÒTESIS SECUNDÀRIES

- El PAF té un efecte inflamatori sobre la mucosa nasal i condiona principalment el símptomes de congestió nasal i rinorrea.
- L'efecte del PAF sobre la mucosa nasal és més important al subjectes al·lèrgics en comparació amb els individus sans.
- La inhibició del PAF inhibeix la desgranulació mastocitària de forma més efectiva que la inhibició de la histamina.

# OBJECTIUS I PREGUNTES

---

## **1. Projecte I: Valoració de l'efecte d'un antihistamínic amb activitat antagonista del PAF sobre els símptomes induïts per PAF en un model de provocació nasal *in vivo***

### ***Objectiu General***

Avaluar la resposta clínica de la mucosa nasal després de l'estimulació amb el PAF i l'efecte inhibitori que exerceixen sobre aquesta dos fàrmacs antihistamínics.

### ***Objectius concrets***

1. Comparar la clínica induïda per PAF en individus amb rinitis al·lèrgica en comparació amb individus sans.
2. Comparar l'efecte inhibitori de rupatadina (antihistamínic amb activitat anti-PAF) i levocetirizina (antihistamínic sense activitat anti-PAF) sobre la clínica de rinitis induïda per PAF en individus sans i amb rinitis al·lèrgica.

### ***PREGUNTES QUE INTENTA CONTESTAR L'ESTUDI***

1. És capaç el PAF d'induir símptomes de rinitis després de la seva aplicació a la mucosa nasal
2. Quins són els símptomes nasals més importants associats a l'efecte del PAF sobre la mucosa nasal
3. És diferent l'efecte del PAF sobre la mucosa nasals en els pacients amb rinitis al·lèrgica en comparació amb individus sans
4. Quina és la latència d'aparició i desaparició dels símptomes induïts per PAF administrat en una pauta acumulativa
5. Són capaces la levocetirizina i la rupatadina d'inhibir els símptomes nasals induïts per PAF
6. Són iguals els efectes de levocetirizina i rupatadina als individus sans i als pacients amb rinitis al·lèrgica
6. Té la rupatadina un efecte inhibitori superior a la levocetirizina sobre els símptomes nasals induïts per PAF

## 2. Projecte II: Valoració de l'efecte d'un antihistamínic amb activitat antagonista del PAF sobre l'alliberament de mediadors de la inflamació induïda per PAF en mastòcits humans

### Objectiu general

Comparar l'efecte dels antagonistes del receptor de la histamina  $H_1$  (desloratadina, rupatadina i levocetirizina) i dels antagonistes del receptor del PAF ( EB2086, BN52021, CV6209) sobre la desgranulació mastocitària induïda pel PAF.

### Objectius concrets

1. Estudiar l'efecte induït per PAF sobre l'activació de cultius de mastòcits pulmonars primaris i de la línia cel·lular LAD-2.
2. Estudiar l'efecte de la desloratadina, rupatadina i levocetirizina sobre l'activació induïda per PAF als cultius de mastòcits pulmonars primaris i a la línia cel·lular LAD-2.
3. Estudiar l'efecte del EB2086, BN52021 i CV6209 sobre l'activació induïda per PAF als cultius de mastòcits pulmonars primaris i a la línia LAD-2.
4. Investigar l'expressió del receptor de PAF als cultius de mastòcits pulmonars primaris i a la línia LAD-2.

### **PREGUNTES QUE INTENTA CONTESTAR L'ESTUDI**

1. enen els antihistamínics rupatadina, levocetirizina, desloratadina, i els inhibidors del PAF EB2086, BN52021 o CV6209 capacitat per inhibir l'alliberament de mediadors de la inflamació induït per PAF en mastòcits .
2. Existeixen diferències entre l'efecte de la rupatadina, la levocetirizina i la desloratadina sobre l'alliberament de mediadors induït per PAF .
3. s similar l'efecte de la rupatadina sobre l'alliberament de mediadors induït per PAF a la dels antagonistes del PAF ( EB2086, BN52021 o CV6209) .
4. enen la rupatadina, la levocetirizina, la desloratadina o els inhibidors dels PAF ( EB2086, BN52021 o CV6209) un efecte diferencial sobre la línia cel·lular LAD-2 o els cultius de mastòcits pulmonars primaris .

# MATERIALS I MÈTODES

---

Aquest treball es basa en dos models humans d'exposició al PAF i s'ha dividit en dos projectes.

El Projecte I és un model in vivo de provocació nasal amb PAF que avalua la capacitat de PAF per induir símptomes de rinitis en individus sans i amb rinitis al·lèrgica, així com l'efecte inhibitori sobre aquests símptomes d'un antihistamínic simple i d'un antihistamínic amb efecte dual, antihistamínic i anti-PAF.

El Projecte II és un model in vitro en mastòcits humans on s'avalua l'efecte del PAF sobre l'alliberament de mediadors, així com l'efecte inhibitori de diversos fàrmacs antagonistes del receptor del PAF, antihistamínics simples i un antihistamínic dual, amb efecte antihistamínic i anti-PAF.

## **1. Projecte I: Valoració de l'efecte d'un antihistamínic amb activitat antagonista del PAF sobre els símptomes induïts per PAF en un model de provocació nasal in vivo**

Es van avaluar 20 individus, 10 voluntaris sans i 10 pacients diagnosticats de rinitis al·lèrgica estacional. El diagnòstic de rinitis al·lèrgica estacional es va realitzar mitjançant criteris clínics, i l'existència d'un prick test i unes IgE específiques clínicament compatibles.

L'estudi es va dur a terme fora de l'estació pol·línica amb l'objectiu de poder valorar clarament l'efecte del PAF sobre la clínica nasal i evitar la interferència dels símptomes propis de la pol·linosi dels pacients.

Tots els individus estudiats van evitar l'ús de qualsevol medicament (sobretot antihistamínics i corticoides) 4 setmanes abans de l'estudi. Es van excloure aquells subjectes que haguessin patit un quadre de rinitis (de qualsevol etiologia) en els dos mesos previs a l'estudi.

Tots els individus estudiats van ser informats sobre les característiques de l'estudi i van signar el consentiment informat. El Comitè Ètic i d'Investigació Clínica de l'Hospital Clínic de Barcelona va aprovar la realització d'aquest estudi.

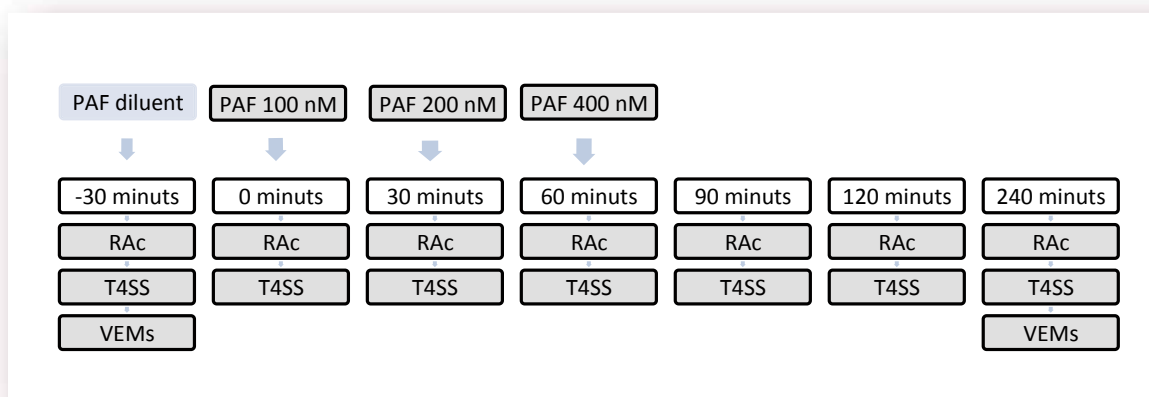


Els individus estudiats van ser sotmesos a una prova de provocació nasal amb el diluent del PAF (etanol 4 ) 30 minuts abans (temps -30) d'iniciar l'administració de la primera dosi de PAF, amb l'objectiu de descartar l'existència d'una resposta nasal inespecífica. Posteriorment es van administrar tres dosis creixents i consecutives de PAF (100 nM, 200 nM i 400 nM) cada 30 minuts (temps 0, 30 i 60 respectivament).

A la figura 8 es pot observar el disseny de l'estudi.

Es tracta d'un estudi a doble cec realitzat en tres fases. tots els pacients van rebre, 4 dies abans de sotmesos a les provocacions nasals amb PAF, una dosi diària de levocetirizina, rupatadina o placebo. tots els fàrmacs van ser subministrats pels laboratoris Uriach Pharma (Barcelona).

figura . disseny de l'estudi



RAc, Rinometria Acústica

4 , puntuació total (l'escala visual analògica i l'escala de Likert)

VEMs volum expirat màxim al primer segon

### *Subjectives*

Les variables subjectives avaluades van ser els símptomes característics de la rinitis, com són la rinorrea, la congestió nasal, la pruija nasal i els esternuts.

Cada símptoma es va avaluar als temps 0, 30, 60, 90, 120 i 240 minuts utilitzant dues escales, la escala visual anàloga (EVA) i l'escala de Likert. L'EVA és una línia de 10 cm on un extrem (0) marca l'absència de símptomes i l'altre extrem (10) la simptomatologia màxima. En canvi l'escala de Likert ofereix una mesura qualitativa de 0 a 3, on 0 es l'absència de símptomes, 1 correspon a símptomes lleus, 2 a símptomes moderats i 3 a símptomes greus. Així amb l'EVA es va valorar cada símptoma de 0 a 10, i amb l'escala de Likert de 0 a 3, i els símptomes totals de 0 a 12.

### *Objectives*

La resposta nasal a l'administració del PAF es va avaluar de forma objectiva mitjançant rinometria acústica (RAc) als temps 0, 30, 60, 90, 120 i 240 respectivament.

Així mateix es van fer controls espiromètrics al temps -30 i 240 per descartar un efecte del PAF sobre la via respiratòria inferior.

Els volums nasal es van avaluar mitjançant rinometria acústica (RAc) (Acoustic rhinometer ER 2000 RhinoMetrics, Lyngø, Dinamarca) és una tècnica que permet una acurada avaluació de la geometria de la cavitat nasal mitjançant la utilització de la reflexió d'impulsos acústics. Es tracta d'una tècnica no invasiva, ràpida i fiable que permet fer les mesures d'una manera fàcil amb una mínima col·laboració per part del pacient (125). La RAc ha demostrat la seva utilitat en el diagnòstic de diverses patologies que cursen amb obstrucció nasal, com la poliposi nasal, gràcies a l'elevada correlació que s'ha evidenciat entre la mesura dels volums per RAc i la simptomatologia existent (126, 127). D'igual manera la RAc s'utilitza amb èxit per monitoritzar la resposta a la provocació nasal amb aspirina que és una de les eines utilitzades en el diagnòstic de la intolerància als antiinflamatoris no esteroidals (AINEs) (128).

otes les mesures es van realitzar bilateralment a la fossa nasal dreta i a l'esquerra, i es van repetir tres vegades amb l'objectiu d'assegurar la seva reproduïbilitat. Donat

que els principals canvis a la geometria nasal en resposta a un estímul es donen al segment més vascularitzat, es va avaluar el volum nasal comprès entre el centímetres 2 i 5 ( $Vol_{2-5}$ ).

El PAF (Sigma Aldrich, Madrid, Spain) es va dissoldre en etanol 100  $\mu$ l i en una solució de NaCl al 0.9  $\mu$ g/ml, 0.25  $\mu$ g/ml de albúmina sèrica (Sigma Aldrich, Madrid, Spain), per aconseguir una concentració final de  $10^{-2}$ M de PAF en una solució final d'etanol al 4%. La selecció de les dosis utilitzades al projecte es va realitzar en funció de l'experiència prèvia publicada a la literatura científica (37, 38, 129).

Es van instil·lar 100  $\mu$ l de PAF al cap del cornet inferior de cada fossa nasal mitjançant una pipeta d'Eppendorf segons s'ha publicat prèviament (128).

Els resultats obtinguts a partir de l'EVA i l'escala de Likert es van expressar com a mitjana i desviació estàndard (DE). Els volums nasals (ml) es van expressar com la reducció de volum respecte al volum existent després de la provocació nasal amb el diluent del PAF.

Les dades s'han comparat emprant els tests ANOVA i t-Student per a dades aparellades i no aparellades. Els valors de la p per sota de 0.05 es van considerar significatives.

## **2. Projecte II: Valoració de l'efecte d'un antihistamínic amb activitat antagonista del PAF sobre l'alliberament de mediadors de la inflamació induïda per PAF en mastòcits humans**

Es van utilitzar dos tipus de mastòcits humans de la línia cel·lular LAD-2 i mastòcits primaris de pulmó.

### ***1.Línia cel·lular LAD-2***

Els mastòcits de la línia cel·lular LAD-2 (Laboratory of Allergic Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, EEUU) van ser incubats amb el medi StemPro-34 Serum Free Media (SFM), complementat amb StemPro-34 Nutrient Supplement, 100 U/ml de penicil·lina, 100 µg/ml d'estreptomicina, 2 mM de L-glutamina i 100 µg/ml de stem cell factor (SCF). Els cultius es van mantenir a l'incubador a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> fins a l'inici del protocol experimental.

Les característiques dels mastòcits de la línia cel·lular LAD-2 són similars a la dels mastòcits humans cutanis, tant en l'expressió del receptor d'alta afinitat per a la IgE o del receptor kit, como en el contingut d'histamina (130). Aquest fet les fa adients per a la realització d'assaigs d'activació i alliberament, permetent una bona extrapolació als fenòmens que succeeixen als mastòcits humans.

### ***2.Cultiu de mastòcits primaris de pulmó***

Els cultius primaris de mastòcits pulmonars es van obtenir a partir de mostres de pacients sotmesos a cirurgia pulmonar electiva. Es van incloure tots els pacients dels que es va poder obtenir un fragment de teixit pulmonar no patològic (confirmat mitjançant un estudi anatomo-patològic).

Els mastòcits es van aïllar mitjançant un sistema de purificació magnètica (selecció positiva amb l'anticòs anti-CD117 (Milteny Biotec, Madrid, Spain)) a partir de mostres de pulmó sa digerides per un mètode enzimàtic (131). La puresa de les mostres (>98%) es va valorar mitjançant tinció metacromàtica.

1. Per l'estudi de l'efecte del PAF sobre l'activació dels mastòcits, els cultius de mastòcits van ser estimulats amb diferents concentracions de PAF a diferents temps, valorant la desgranulació mitjançant dos assaigs:

- Alliberament de  $\beta$ -hexosaminidasa
- Flux de calci per fluorimetria

Donat que el PAF és inactivat ràpidament per l'enzim PAF-acetilhidrolasa (132), l'efecte del PAF no ha pogut ser estudiat detalladament, especialment als dissenys experimentals de corbes de temps. Per aquest motiu, als estudis in vitro s'utilitza un anàleg no metabolitzable del PAF (C-PAF), de manera que els efectes observats seran causats pel PAF i no per cap dels metabòlits resultants de la seva inactivació.

2. Per l'estudi de l'efecte de la desloratadina, rupatadina i levocetirizina, així com per l'efecte del WEB2086, BN52021 i CV6209 sobre l'activació de mastòcits induïda per PAF, els cultius es van pre-incubar (30 minuts) amb diferents concentracions dels diferents fàrmacs (segons publicacions prèvies revisades). Amb línia cel·lular LAD-2 es van realitzar assaigs d'alliberament d'histamina i de  $\beta$ -hexosaminidasa. En el cas dels cultius primaris de mastòcits de pulmó es van realitzar únicament assaigs d'alliberament d'histamina donat les limitacions en el nombre de mastòcits disponibles.

3. L'estudi de l'expressió del receptor de PAF a la línia cel·lular LAD-2 es va realitzar mitjançant Western Blot. De la mateixa manera es va corroborar la presència del receptor de PAF als cultius primaris de mastòcits pulmonars (17).

#### Assaig d'alliberament de $\beta$ -hexosaminidasa

L'anàlisi de la secreció de  $\beta$ -Hexosaminidasa, mediador contingut als lisosomes cel·lulars dels mastòcits, s'utilitza com a mesura de la desgranulació mastocitària. Es tracta d'una anàlisi colorimètrica amb resultats comparables amb els assaigs d'alliberament d'histamina (133).

Inicialment es van realitzar corbes de temps (5, 15 i 30 minuts) i dosi resposta (1 i 10  $\mu$ M). Després de la incubació amb els diferents estímuls, es va realitzar una nova incubació amb P-nitrofenil N-acetil-beta-D-glucosaminida a una concentració de 1,3

mg/ml en un tampó de citrat de sodi 0,1 M (pH 4,5). La reacció es va aturar afegint un tampó de carbonat de sodi 0,2 M (pH 10,7). Finalment es va determinar l'absorbància de 4-P-nitrophenol. L'activitat resultant s'expressa com el percentatge de la resposta màxima (mostres tractades amb Tritó (lisats cel·lulars) x 100). Alliberament de  $\beta$ -exosaminidasa (alliberament de les mostres - alliberament espontània) / (alliberament màxim - alliberament espontàni) x 100.

#### Assaig d'avaluació del flux de calci

Els canvis a la concentració del calci intracel·lular són responsables de l'activació de múltiples processos cel·lulars i s'utilitza com a mesura indirecta d'activació cel·lular. Per a l'estudi de l'efecte del PAF sobre el flux de calci intracel·lular es van realitzar corbes de dosi resposta amb 1, 10 i 50  $\mu$ M. Les mostres amb les diferents condicions experimentals es van incubar amb una sonda fluorimètrica (Fluo4/AM) i la fluorescència es va monitoritzar mitjançant un fluorímetre (Modulus<sup>TM</sup> II Microplate Multimode Reader, Turner Biosystems, EEUU). La concentració de calci s'expressa com a RFU (unitats relatives de fluorescència).

#### Assaig d'alliberament d'histamina

Els assaigs d'alliberament d'histamina es van realitzar mitjançant tècniques de ELISA (Assaig per immunoabsorció lligat a enzims) amb un kit comercial per histamina (Immunotech, Beckman Coulter Co., Alemanya). Els resultats s'expressen com el percentatge d'histamina alliberada, una vegada que s'ha restat la histamina alliberada de forma espontània. Els límits de la corba estàndard van de 0 nM a 104 nM.

#### S SDS-AE i Western-Blot

Per determinar l'expressió del receptor de PAF a la línia cel·lular LAD-2 va ser necessari realitzar inicialment una electroforesis de proteïnes (SDS-PAGE 10%) i posteriorment un Western-Blot. La transferència a una membrana de nitrocelulosa (PVDF) es va realitzar mitjançant un sistema semi-sec. Una vegada finalitzada la transferència es va incubar la membrana amb l'anticòs d'interès, en el nostre cas: anti-receptor del PAF (Cayman Chemical, Michigan, EEUU). El revelat es va realitzar amb el Supersignal Chemiluminescence Substrate, utilitzant pel·lícules Curix RP2 Plus pel revelador CURIX AGFA 60. El pes molecular del receptor del PAF s'expressa en kilodaltons (kDa).

#### Avaluació de la toxicitat de A i els fàrmacs antagonistes del A

La tinció de trypan Blue es va utilitzar per a determinar el número de cèl·lules viables en una suspensió cel·lular. Es basa en el principi de que les cèl·lules viues posseeixen una membrana cel·lular intacta que evita l'entrada de determinats tints a nivell intracel·lular, com el trypan Blue, fet que no succeeix a les que estan mortes al estar la seva membrana malmesa. Es va realitzar una suspensió cel·lular amb tint i es va avaluar la viabilitat, comptant les cèl·lules tenyides de blau (mortes) i les no tenyides (vives) (134).

Les dades es mostren com a mitjana i desviació estàndard (DE). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant proves t de Student o anàlisi de la variància (ANOVA) en funció de les variables. Una  $p < 0.05$  s'ha considerat estadísticament significativa.

# RESULTATS

## 1. Projecte I: Valoració de l'efecte d'un antihistamínic amb activitat antagonista del PAF sobre els símptomes induïts per PAF en un model de provocació nasal in vivo

Les característiques demogràfiques d'ambdós grups i el perfil de sensibilització al·lèrgica del grup de pacients amb rinitis al·lèrgica es poden veure a la taula 3 i a la taula 4. Tots els pacients estudiats van resultar ser monosensibles a pol·len de gramínies o plataner d'ombra.

No es van observar diferències significatives entre els individus amb rinitis al·lèrgica estacional i els voluntaris sans en cap de les variables avaluades.

Taula 3. Característiques basals demogràfiques i clíniques dels individus estudiats

	Individus sans	Pacients amb rinitis al·lèrgica estacional
Edat, mitjana (DE)	30,4 (2,5)	30 (6)
Dones, n (%)	5 (50)	6 (60)
Vol <sub>2-5</sub> RAc, mitjana (DE)	6,3 (1,7)	6,1 (0,9)
T4SS, mitjana (DE)	0,1 (0,3)	0,3 (0,4)
VEMs, mitjana % (DE)	102,9 (7,7)	94,1 (10,1)

DE desviació estàndard

RAc Rinometria Acústica

<sup>4</sup> puntuació total de símptomes que inclou els valors corresponents a l'escala de Likert i l'escala analògica visual

VEMs Volum expirat màxim en el primer segon

Taula 4. Perfil de sensibilització dels pacients amb rinitis al·lèrgica estacional

Pacient	Pol·linosi	IgE específica
1	Gramínies	Classe 4
2	Plataner d'ombra	17.7 KU/L (classe 4)
3	Plataner d'ombra	1.78 KU/L (classe 2)
4	Gramínies	82.5 KU/L (classe 5)
5	Gramínies	8.7 KU/L (classe 3)
6	Gramínies	25.7 KU/L (classe 4)
7	Plataner	3.2 KU/L (classe 2)
8	Plataner	1.35 KU/L (classe 1)
9	Plataner	2.23 KU/L (classe 2)
10	Gramínies	41.8 KU/L (classe 4)



La provocació nasal amb el diluent del PAF (etanol 4%) no va provocar un increment en els símptomes nasals o un canvi en el volum nasal ni en els individus sans ni amb els pacients amb rinitis al·lèrgica.

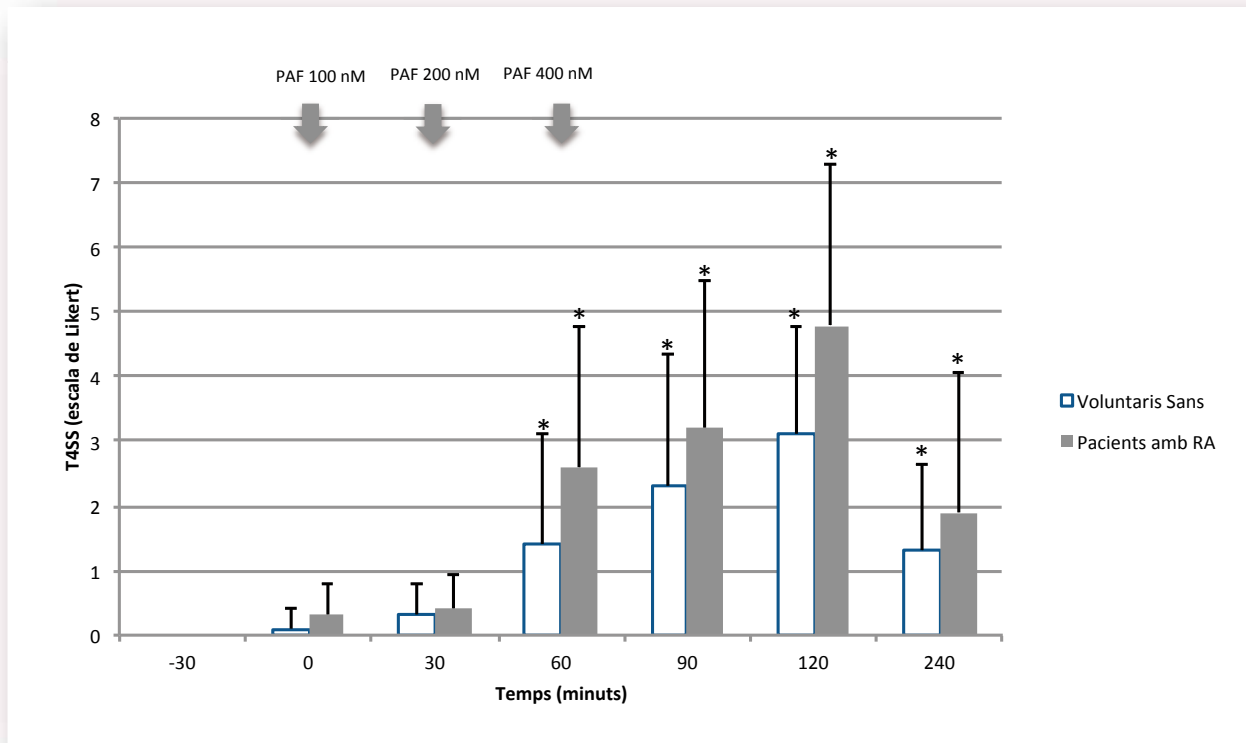
### ***Símptomes respiratoris nasals***

L'administració de PAF de forma progressiva i incremental (100, 200 i 400 nM) (figura 8) va produir un augment dels símptomes (valorat amb la escala de Likert i l'EVA) de manera dosi-depenent en tots els dos grups estudiats (individus sans i pacients amb rinitis al·lèrgica). L'increment de símptomes, valorats de forma conjunta (4%), començà a ser significatiu ja als 60 minuts i les puntuacions màximes, tant mesurats amb l'escala de Likert com amb l'EVA, es van observar als 120 minuts. No es va observar una milloria clínica significativa fins als 240 minuts (figures 9A i 9B). L'obstrucció nasal va ser el símptoma més important, tant en intensitat com en durada i d'altres símptomes com la rinorrea, els esternuts o la prujia nasal van ser menys rellevants (taula 1 de l'annex i figura 10 (A, B, C, D)).

tot i que els símptomes van ser en general superiors al grup de pacients amb rinitis al·lèrgica, aquestes diferències no van ser estadísticament significatives.

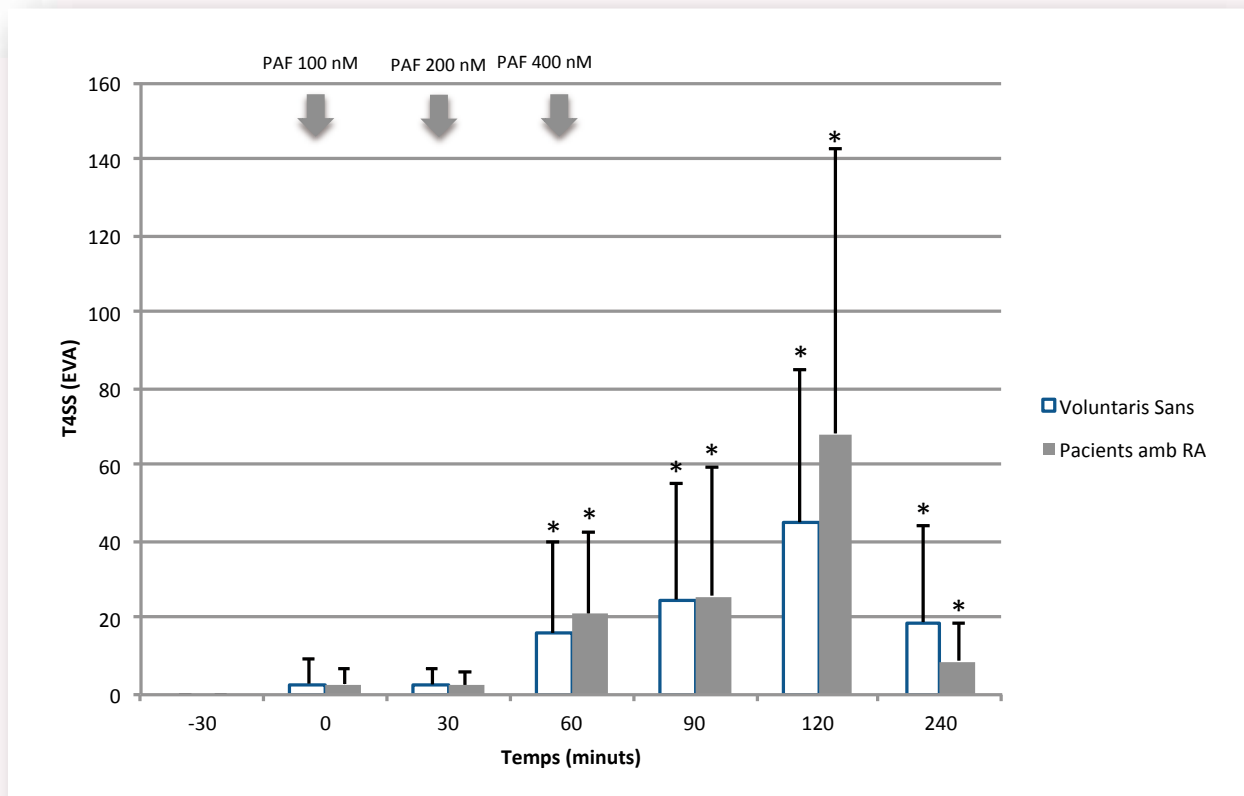
Figura . Efecte del A administrat en dosis creixents sobre l'evolució dels símptomes, mesurat mitjançant l'escala de Likert (A) i l'escala visual analògica (B). Al temps 0, 30, 60 i 90 minuts l'increment dels símptomes respecte al minut 0 després de la provocació amb diluent) era estadísticament significativa ( $p < 0.05$ ), tant mesurat amb l'escala de Likert com amb l'EVA.

A)



\* $p < 0.05$

(B)

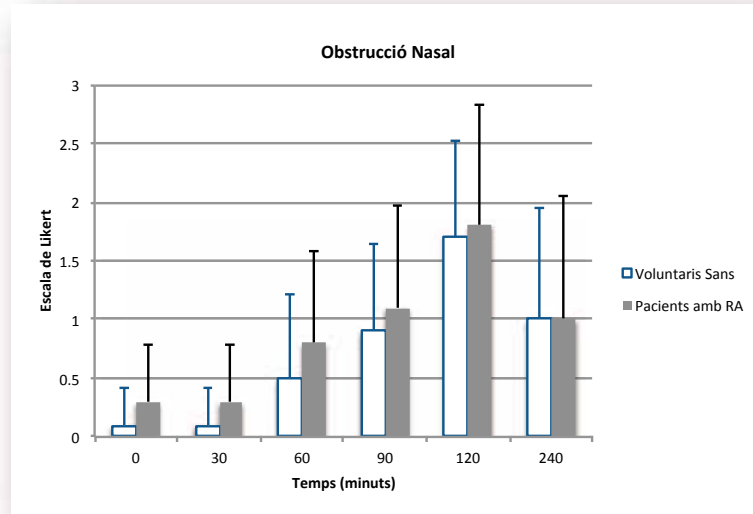


\*p<0.05

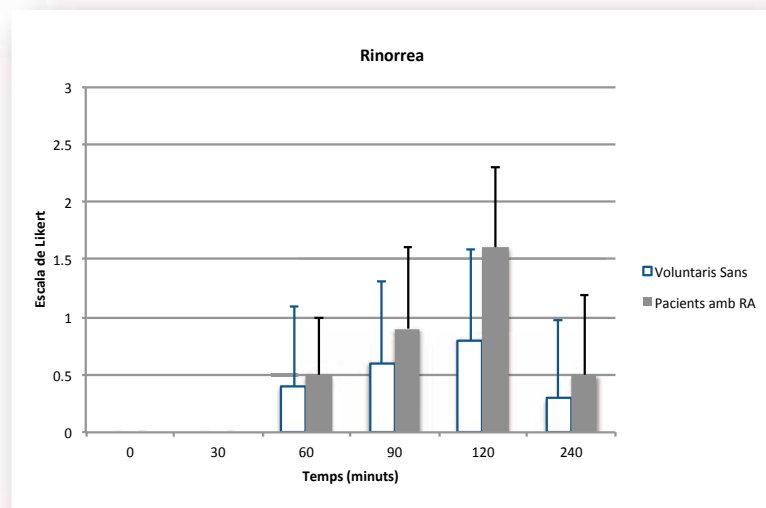
4 puntuació total de símptomes  
EVA escala visual analògica

Figura 1. Efecte del A sobre els símptomes nasals individuals (obstrucció nasal A), rinorrea B), prurita nasal C) i esternuts D) avaluats mitjançant l'escala de Likert en voluntaris sans i pacients amb rinitis al·lèrgica. Les diferències entre els valors als 0, 30, 60, 90, 120 o 240 minuts i els valors basals (-30 i -60 minuts) no van resultar estadísticament significatives. Tampoc es van observar diferències estadísticament significatives entre els voluntaris sans i els pacients amb RAE en cap dels símptomes individuals ni en cap dels temps avaluats.

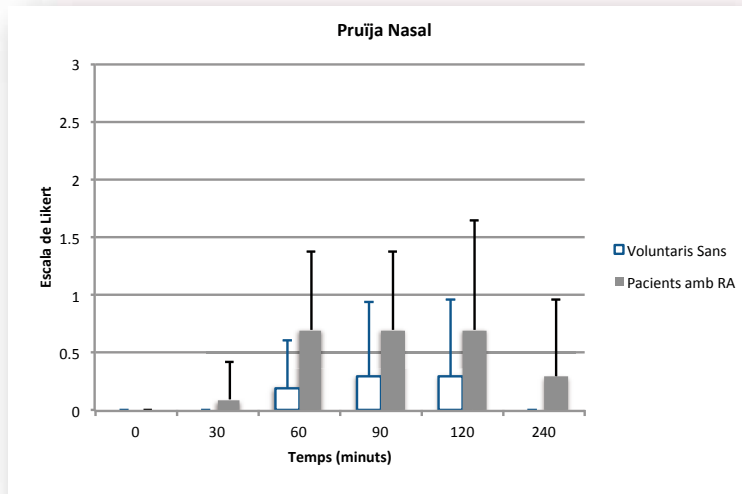
(A)



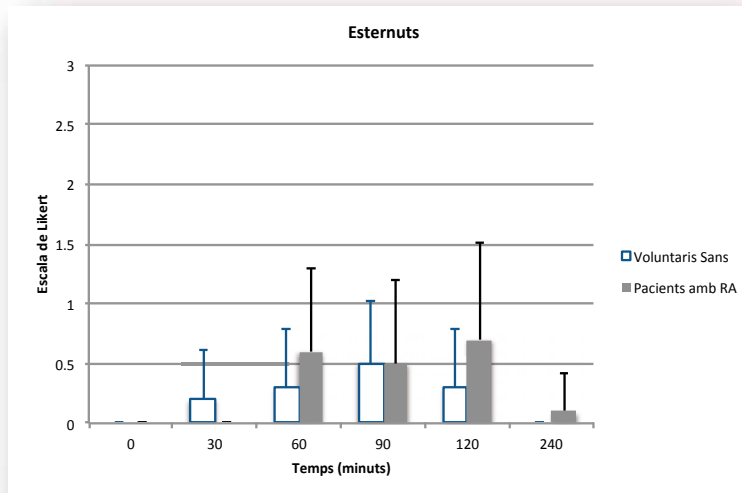
(B)



(C)



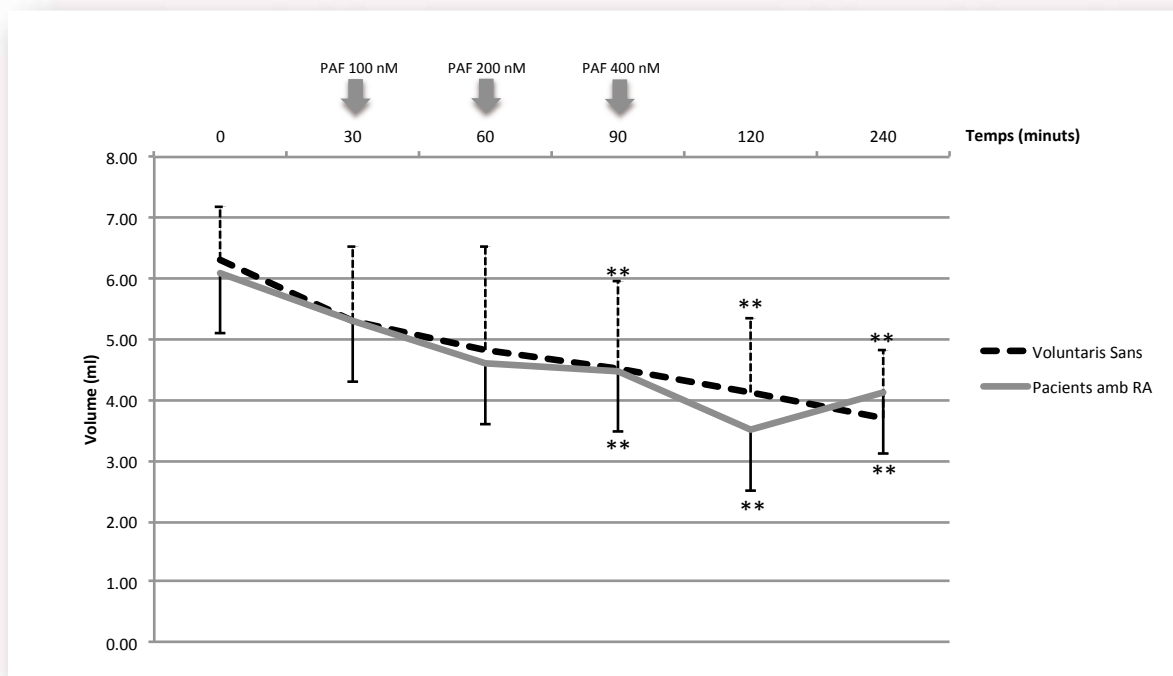
(D)



### Volums nasals

El PAF va provocar una reducció del volum nasal ( $Vol_{2-5}$ ) que al minut 90 era superior al 25 respecte al basal. Al igual que els símptomes, la reducció màxima de volum es va observar als 120 minuts. Tot i que els pacients van referir una milloria clínica dels símptomes evident als 240 minuts, l'obstrucció nasal mesurada de forma objectiva mitjançant RAc era encara important (figura 11).

Figura 11. Efecte del A administrat en dosis creixent sobre la reducció del volum nasal (vol. 2-5). Al minut 90, 120 i 240 la reducció del volum nasal respecte al minut 0 (després de la provocació amb diluent) era estadísticament significativa ( $p < 0.01$ ).



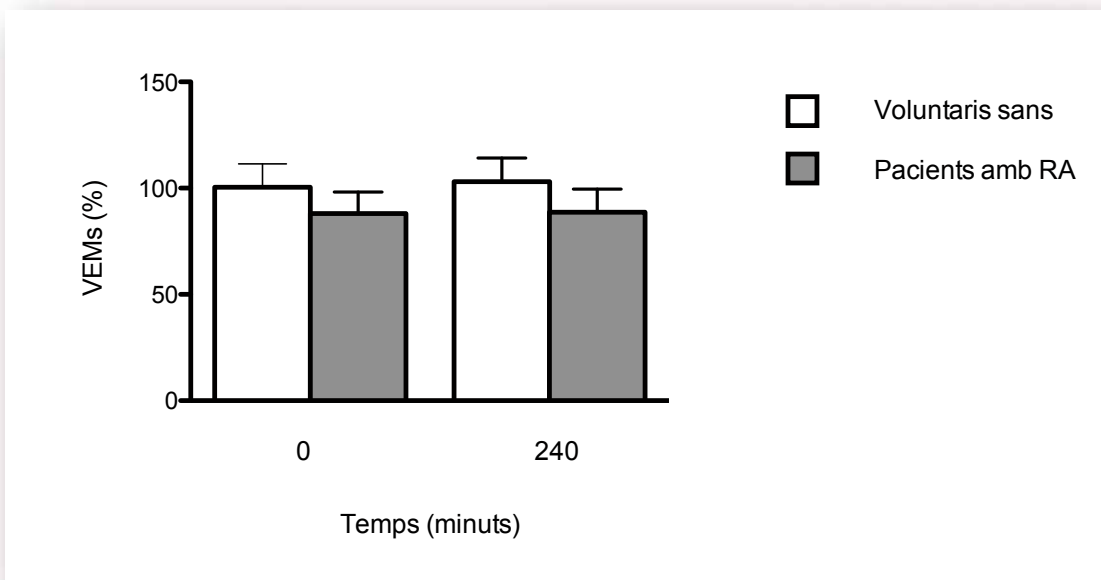
p < 0.01

### *Síntomes respiratoris pulmonars*

L'administració nasal de PAF no va induir símptomes respiratoris pulmonars i la funció pulmonar (VEMs) no es va modificar respecte al valor mesurat al inici de la provocació (figura 12).

Figura 12. Efecte de la provocació nasal amb A sobre els valors de VEMs a l'inici de la provocació i als 240 minuts, en individus sans i pacients amb rinitis al·lèrgica.

No es van observar diferències estadísticament significatives ni entre els valors basals i els mesurats als 240 minuts, ni entre els voluntaris sans i els pacients amb rinitis al·lèrgica.



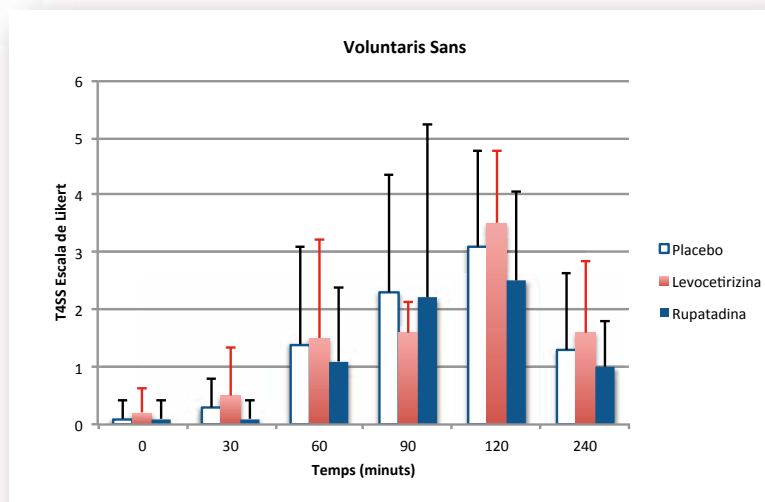
### Símtomes nasals

La levocetirizina i la rupatadina no van demostrar cap efecte significatiu sobre els símptomes ni en els individus sans ni en els pacients amb rinitis al·lèrgica. No es varen observar diferències en les puntuacions respecte al placebo ni amb l'escala de Likert (figura 13A i 13B) ni amb l'EVA (figura 14A i 14B). Al valorar l'àrea sota la corba (AUC) de les puntuacions obtingudes del 4 mitjançant Likert en el grup de pacients amb rinitis al·lèrgica, varem observar que la rupatadina disminueix de forma significativa els símptomes en comparació amb placebo, efecte que no s'observa amb la levocetirizina (figura 15A i 15B) (taula 5).

L'avaluació dels símptomes de forma individual (obstrucció nasal, rinorrea, esternuts i prurija nasal) va corroborar que ni la levocetirizina ni la rupatadina eren capaces de millorar cap dels símptomes induïts per PAF en comparació amb el placebo, ni en el cas dels pacients amb rinitis al·lèrgica ni en els voluntaris sans (Figura 16 (A,B,C,D) i 17 (A,B,C,D)).

Figura 13 Efecte del A sobre els símptomes nasals avaluats mitjançant l'escala de Likert en individus sans (A) i amb rinitis al·lèrgica (B) en tractament amb placebo, levocetirizina o rupatadina. Tot i que l'increment de símptomes respecte al basal (minut 0) és estadísticament significatiu (figura A), no existeixen diferències estadísticament significatives entre els símptomes induïts per A en els tres grups evaluats (placebo, levocetirizina, rupatadina) ni entre individus sans i amb rinitis al·lèrgica.

(A)





(B)

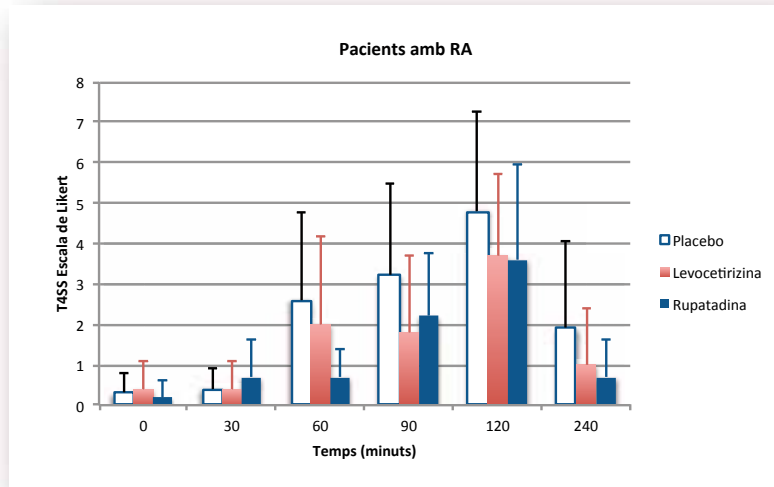
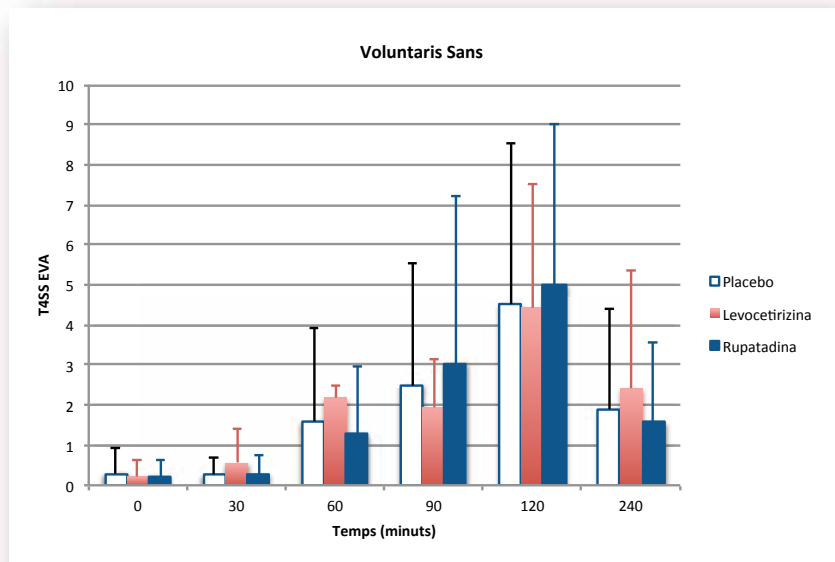


Figura 1. Efecte del A sobre els símptomes nasals mesurats mitjançant l'escala visual analògica (EVA) en voluntaris sans (A) i pacients amb rinitis al·lèrgica (B) en tractament amb placebo, levocetirizina o rupatadina. Tot i que l'increment de símptomes respecte al basal (minut 0) és estadísticament significatiu (Figura B), no existeixen diferències estadísticament significatives entre els símptomes induïts per A en els tres grups evaluats (placebo, levocetirizina, rupatadina) ni entre individus sans i amb rinitis al·lèrgica.

(A)



(B)

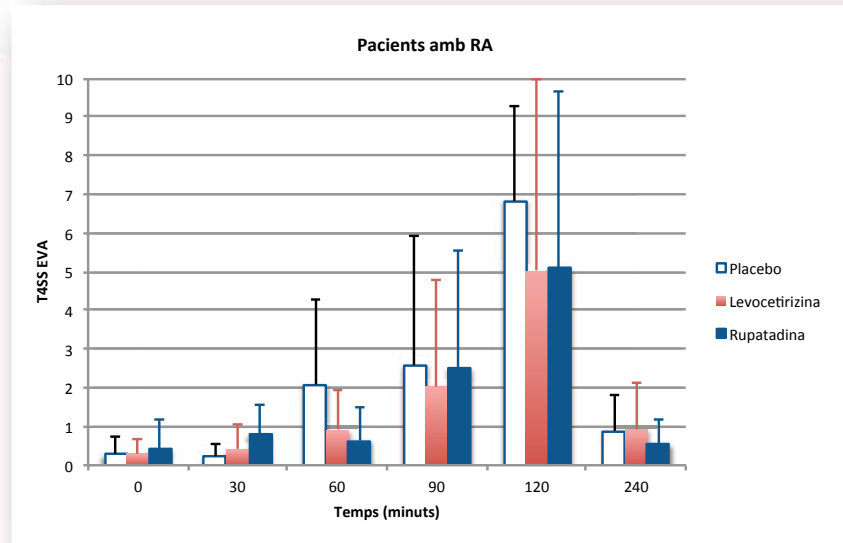
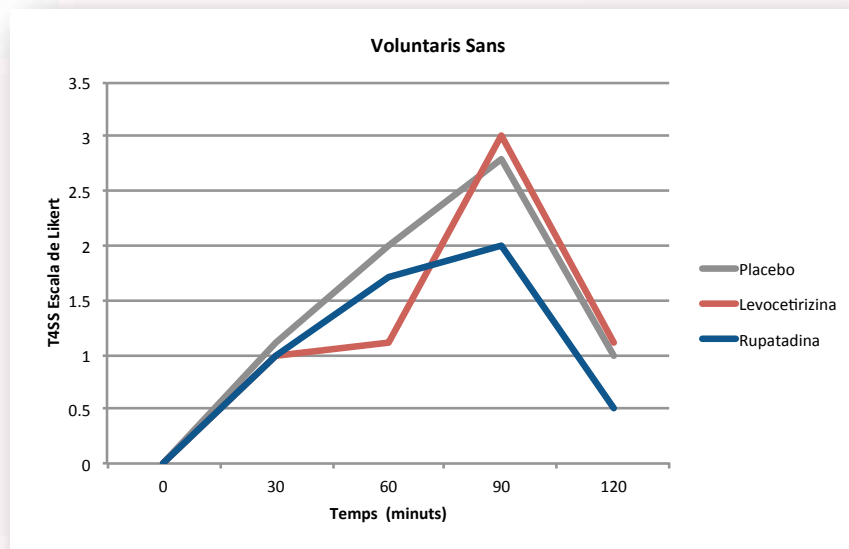
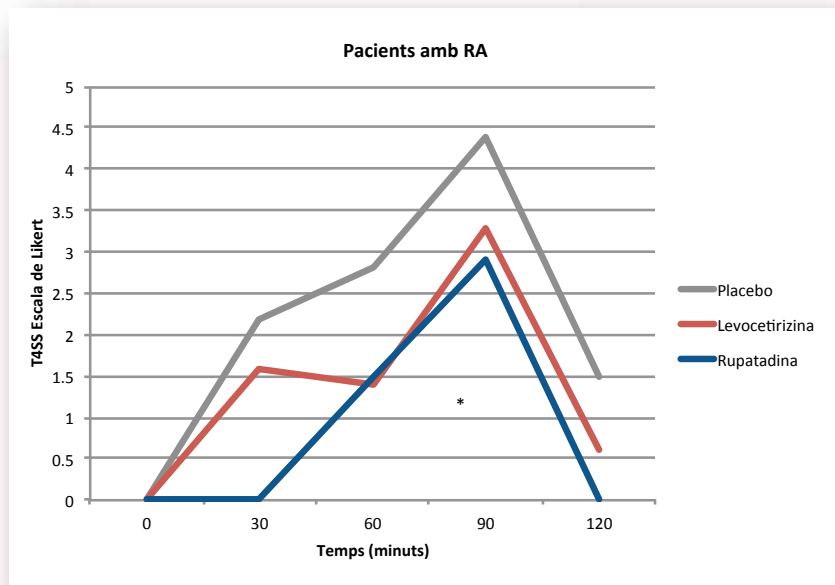


Figura 1. Efecte del A sobre els símptomes evaluats amb l'escala de Likert. Comparació de l'evolució sota la corba A C) en individus sans (A) i pacients amb rinitis al·lèrgica (B) en tractament amb levocetirizina o rupatadina i el placebo. No s'observen diferències entre les A C) dels individus sans tractats amb levocetirizina o rupatadina respecte al placebo. En canvi, els pacients amb rinitis al·lèrgica tractats amb rupatadina presenten una disminució del T4SS estadísticament significativa en comparació amb placebo ( $p < 0.05$ ), fet que no s'observa amb la levocetirizina.

(A)



(B)



p=0.05

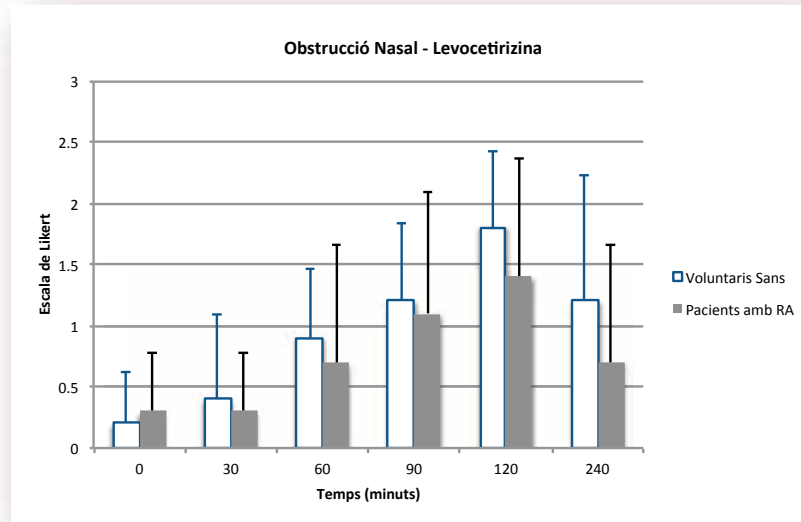
Taula . Efecte de levocetirizina i rupatadina sobre els s mptomes nasals avaluats mit an ant l'escala de Likert i sobre la disminuci del volum nasal indu t per A als voluntaris sans i a pacients amb rinitis al.l rgica. a rupatadina va disminuir els s mptomes T SS) mesurats mit an ant l'escala de Likert en pacients amb rinitis al.l rgica en comparaci amb placebo. Efecte ue no es va observar amb la levocetirizina.

Placebo	363	195	570	285
Levocetirizina	354	238	373	235
Rupatadina	327	263	262	256
Placebo	440	253	432	191
Levocetirizina	462	261	370	239
Rupatadina	332	242	350	227

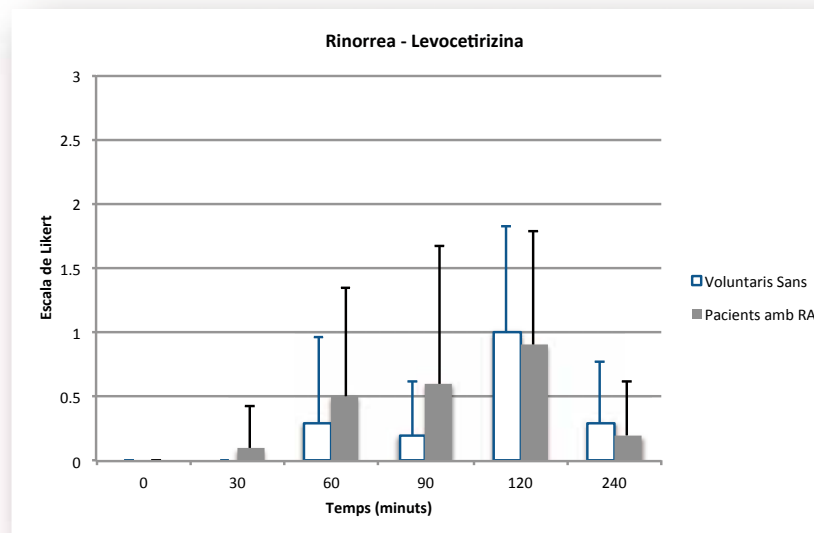
p 0.05

Figura 1. Efecte del A sobre els símptomes nasals individuals (obstrucció nasal, rinorrea, esternuts i prur a nasal) mesurats mitjançant l'escala de Likert en voluntaris sans i pacients amb rinitis al·lèrgica en tractament amb levocetirizina. No es van observar diferències estadísticament significatives entre els temps 0, 30, 60 i 90 minuts amb els temps 120 i 240 minuts. Tampoc es van observar diferències respecte al placebo.

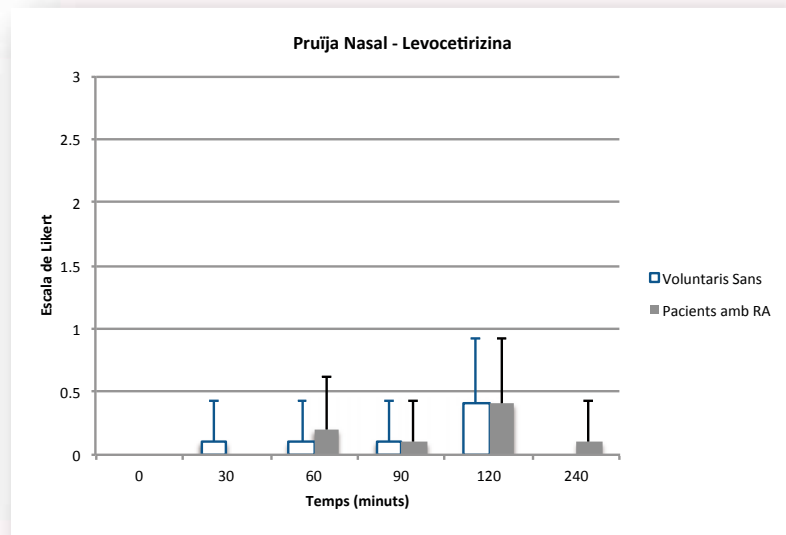
(A)



(B)



(C)



(D)

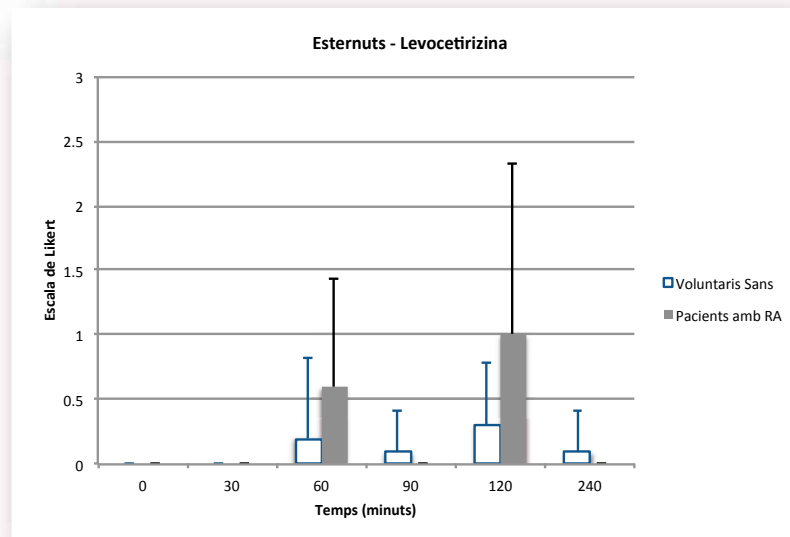
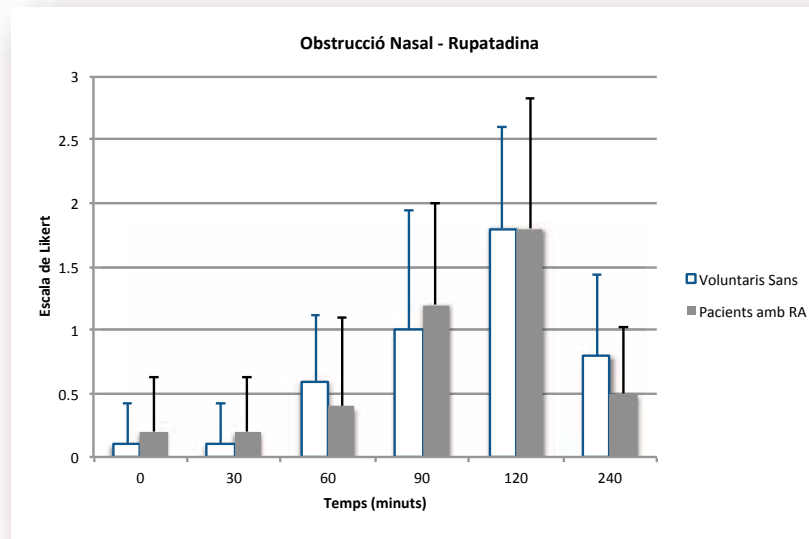
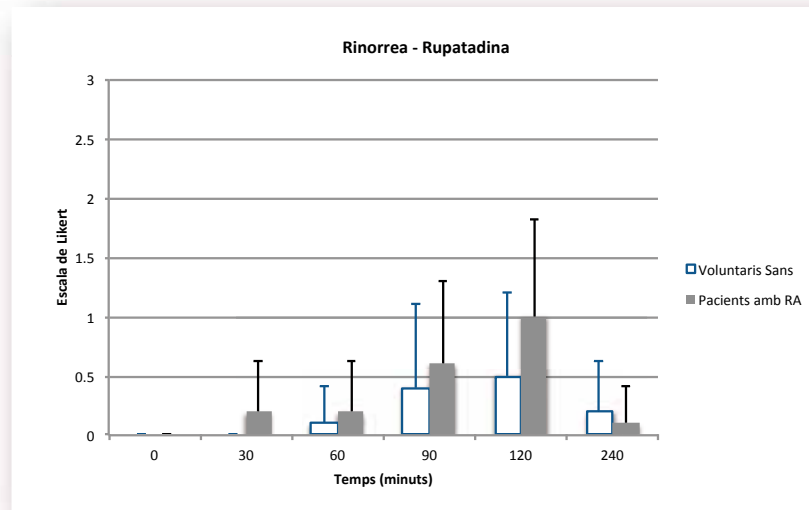


Figura 1. Efecte del A sobre els símptomes nasals individuals (obstrucció nasal, rinorrea, esternuts i prur a nasal) mesurats mitjançant l'escala de Likert en voluntaris sans i pacients amb rinitis al·lèrgica en tractament amb rupatadina. No es van observar diferències estadísticament significatives entre els temps 0, 30, 60 i 90 minuts amb els temps 120 i 240 minuts. Tampoc es van observar diferències respecte al placebo.

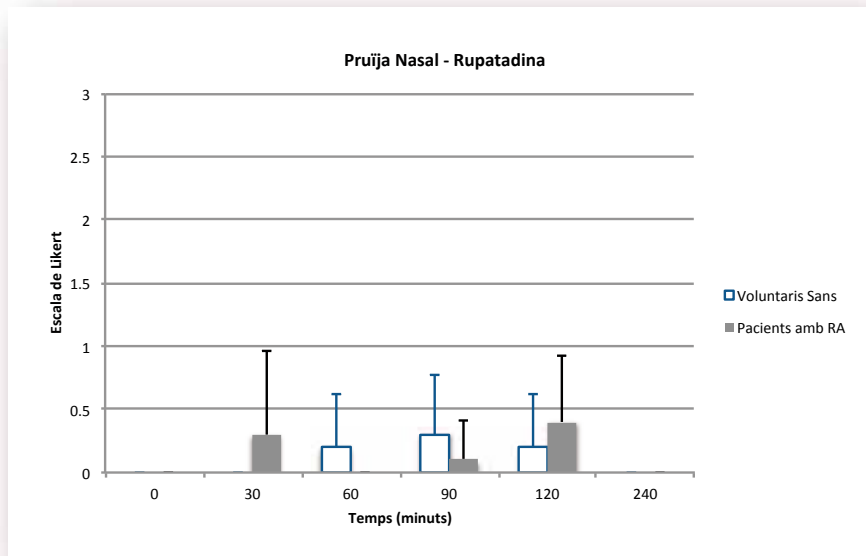
(A)



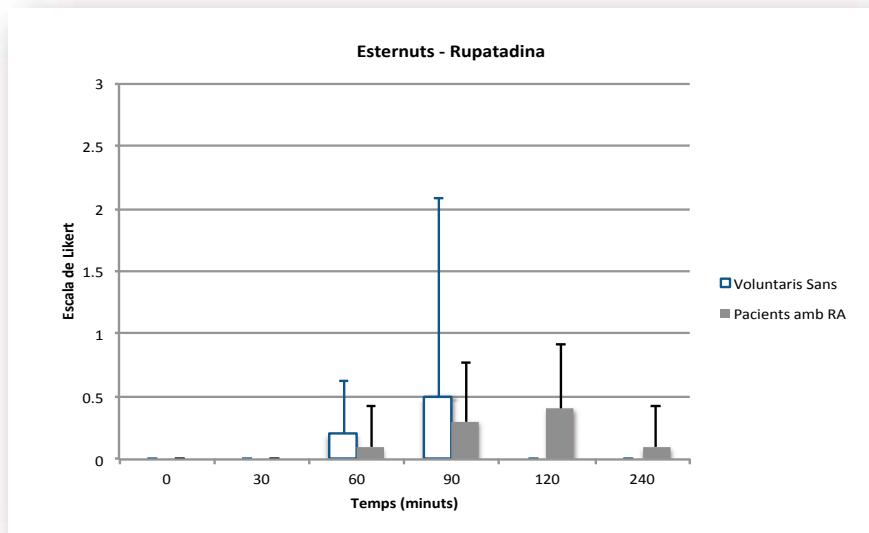
(B)



(C)



(D)

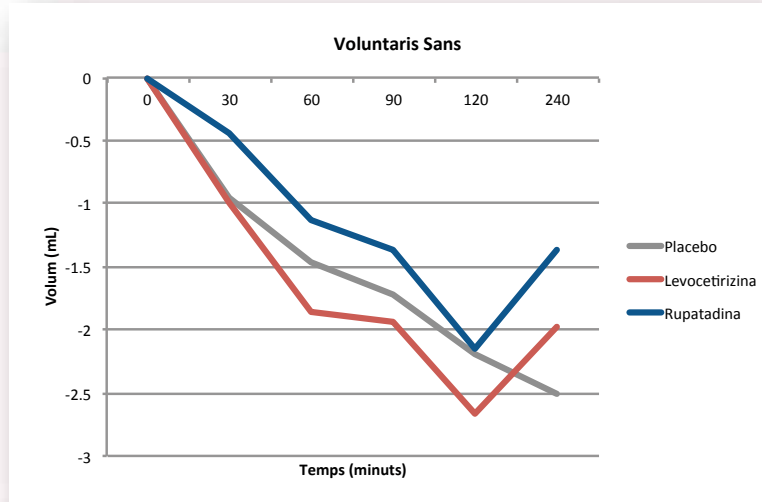


## Volums nasals

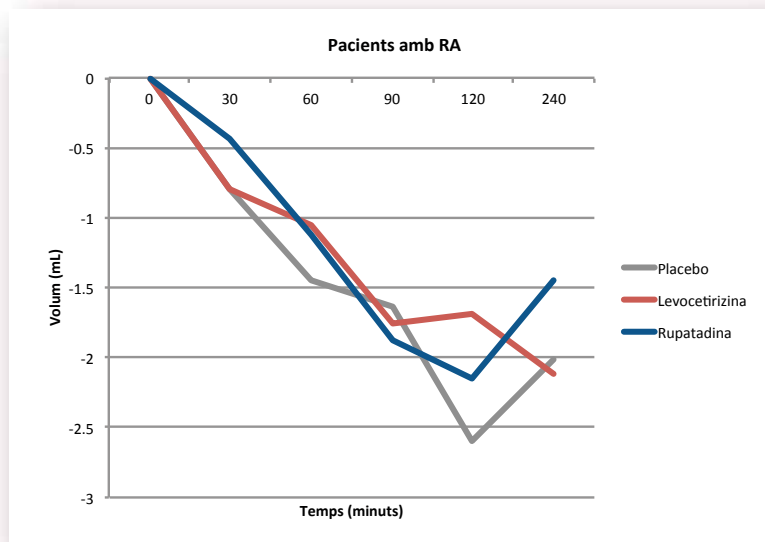
Ni la rupatadina ni la levocetirizina van demostrar cap efecte sobre la reducció dels volums nasal després de la provocació amb PAF. Tot i que en el grup d'individus sans la rupatadina semblava reduir l'obstrucció nasal, aquest efecte no va ser estadísticament significatiu (figura 18A i 18B)(taula 5).

Figura 18. Efecte de levocetirizina i rupatadina sobre la disminució del volum nasal induït per PAF i mesurat mitjançant antirinetria acústica en voluntaris sans (A) i en pacients amb rinitis al·lèrgica (B). Tot i que la disminució del volum en els voluntaris sans i els pacients amb rinitis al·lèrgica tractats amb la rupatadina és menor que l'observat amb el placebo o la levocetirizina, aquestes diferències no foren estadísticament significatives.

(A)



(B)





## 2. Projecte II: Valoració de l'efecte d'un antihistamínic amb activitat antagonista del PAF sobre l'alliberament de mediadors de la inflamació induïda per PAF en mastòcits humans

Es va avaluar la supervivència dels mastòcits (tinció amb trypan Blue) després de l'estimulació amb el PAF a dosis de 1, 10 i 50  $\mu\text{M}$ , així com amb la rupatadina 1, 5, 10, 25 i 100  $\mu\text{M}$ , la desloratadina a dosis de 1,5,10,100  $\mu\text{M}$ , la levocetirizina a dosis de 1,10,100 nM i 1, 5, 10, 25, 100  $\mu\text{M}$ , el EB2086 a dosis de 1,10,100  $\mu\text{M}$ , el BN52021 a dosis de 1,10,100  $\mu\text{M}$  i el CV6209 a dosis de 0.2 y 2  $\mu\text{M}$ .

La desloratadina i la rupatadina a dosis de 100  $\mu\text{M}$  van ser les úniques dosis testades que van induir un mortalitat del 7%, lleugerament superior al 6% induït pel control (DM 1%) o al 6% corresponent a la mortalitat espontània (aula 6).

Taula 1. Resultats de l'avaluació de la toxicitat del PAF, la rupatadina, la levocetirizina, la desloratadina, el EB2086, el CV6209 i el BN52021 a la línia cel·lular HMC-1. Els resultats s'expressen com el percentatge de mastòcits morts.

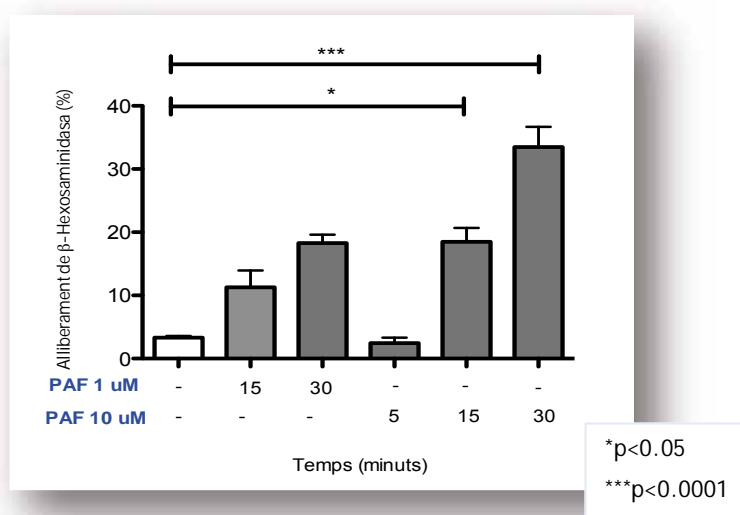
	1 nM	10 nM	100 nM	0.2 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b>PAF</b>					5			5		6	
<b>WEB2086</b>					4			6			5
<b>BN52021</b>					4			5			5
<b>CV6209</b>				5		4					
<b>Desloratadina</b>					4		5	5			7
<b>Levocetirizina</b>	5	5	4		5		5	6	6		5
<b>Rupatadina</b>					5		6	4	5		7
<b>DMSO 1%</b>	6										
<b>Mortalitat espontània</b>	6										

## 2.2.1 A mastòcits de la línia cel·lular LAD-2

### Assaig d'alliberament de $\beta$ -hexosaminidasa

Els assaigs de dosi-resposta amb dues dosis de PAF (1 i 10  $\mu$ M) i els assaigs de temps-resposta amb tres temps (5, 15 i 30 minuts) a la línia cel·lular LAD-2 van demostrar que la resposta de LAD-2 a l'estimulació amb el PAF és dependent de la dosi i el temps d'incubació. Tal i com es pot veure a la figura 19, la dosi i el temps òptims pels assaigs d'activació mastocitària van ser 10  $\mu$ M i 30 minuts respectivament. Tots els experiments que es descriuen a continuació, es van realitzar amb un estímul de PAF de 10  $\mu$ M incubat durant 30 minuts.

Figura 19. Resum dels resultats de l'efecte del PAF sobre l'alliberament de  $\beta$ -hexosaminidasa a la línia cel·lular LAD-2. Assaigs de dosi-resposta i temps-resposta.

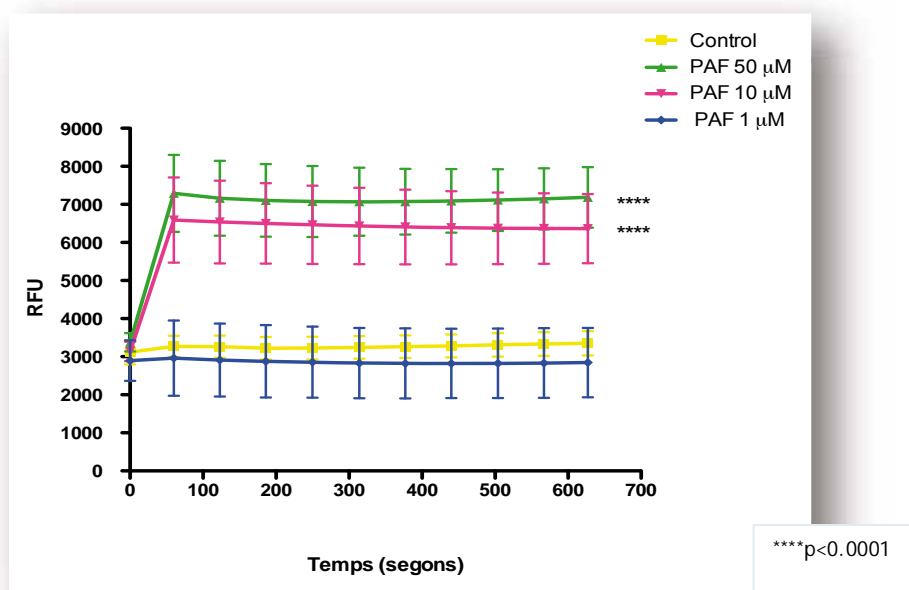


Estadística	CONTROL	PAF 1 $\mu$ M 15 min	PAF 1 $\mu$ M 30 min	PAF 10 $\mu$ M 5 min	PAF 10 $\mu$ M 15 min	PAF 10 $\mu$ M 30 min
<b>Mínim</b>	2,90	8,64	16,95	1,62	9,54	29,76
<b>25% Percentil</b>	2,92	8,64	16,95	1,62	11,50	29,94
<b>Mediana</b>	3,20	11,30	18,28	2,46	18,30	30,53
<b>75% Percentil</b>	3,85	13,95	19,6	3,31	23,88	39,94
<b>Màxim</b>	4,00	13,95	19,6	3,31	27,98	43,06
<b>Mitjana</b>	3,32	11,30	18,28	2,46	18,49	33,47
<b>Desviació Estàndard</b>	0,49	3,75	1,87	1,19	6,54	6,40
<b>Error Estàndard</b>	0,24	2,65	1,32	0,84	2,18	3,20

### Assaigs de flux de calci

El PAF (1,10 i 50  $\mu$ M) van induir un increment en el flux de calci dependent de la dosis. De manera que PAF a 1  $\mu$ M no va mobilitzar calci (similar al control negatiu) i les dosis de 10 i 50  $\mu$ M van induir el màxim flux (figura 20). Les diferències observades entre la dosis de 10  $\mu$ M i 50  $\mu$ M no van ser estadísticament significatives.

figura 20. Resum dels resultats de l'efecte del PAF sobre l'activació de la línia cel·lular A-23187 (flux de calci). Assaigs de dosi-resposta (n=3). A 1 i 10  $\mu$ M indueixen un flux de calci estadísticament significatiu (p < 0,0001) respecte al placebo.



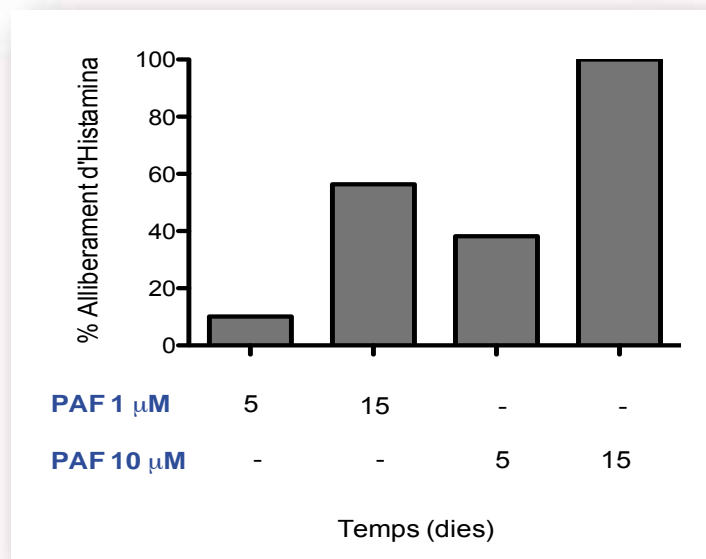
Estadística	Control	PAF 50 $\mu$ M	PAF 10 $\mu$ M	PAF 1 $\mu$ M
<b>Mínim</b>	3116	3378	3138	2824
<b>25% Percentil</b>	3226	7072	6367	2825
<b>Mediana</b>	3263	7105	6407	2846
<b>75% Percentil</b>	3313	7161	6501	2898
<b>Màxim</b>	3352	7290	6591	2961
<b>Mitjana</b>	3263	6790	6142	2863
<b>Desviació Estàndard</b>	64,07	1134	999,20	44,88
<b>Error Estàndard</b>	19,32	341,80	301,30	13,53

## 2.2.2. A cultius primaris de mastòcits pulmonars

### Assaigs d'alliberament d'histamina

Es van realitzar assaigs dosi-resposta amb dues dosis de PAF 1 i 10  $\mu\text{M}$  en mastòcits humans als 5 i als 15 dies després del seu aïllament. Es va observar una resposta depenent de la dosi, que va ser més important als mastòcits amb 15 dies d'aïllament. Els resultats s'expressen com el percentatge relatiu d'alliberament respecte a la dosi que induïx l'alliberament màxim (figura 21).

Figura 1. Resum dels resultats de l'alliberament d'histamina en resposta a l'estimulació amb PAF en mostres de mastòcits humans aïllats a partir de teixit pulmonar: 5 dies versus 15 dies (n = 1). Els resultats s'expressen com el percentatge relatiu d'alliberament d'histamina respecte a la dosi que induïx l'alliberament màxim.

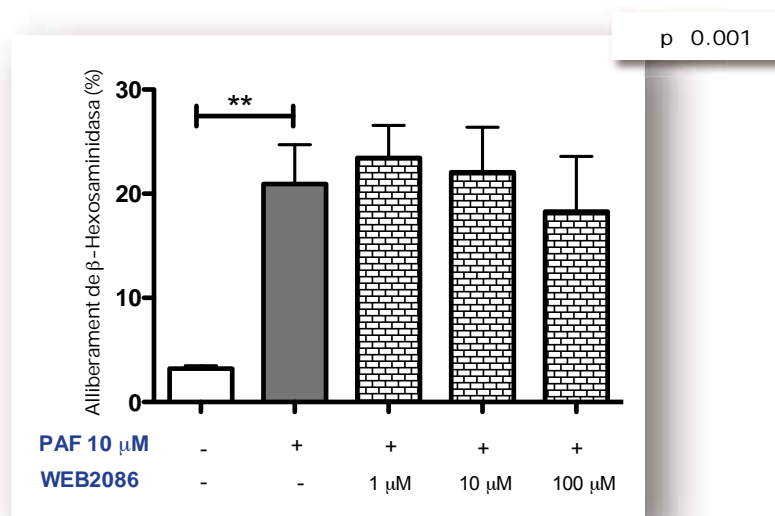


$\mu\text{M}$		PAF 10 $\mu\text{M}$	
5 dies	15 dies	5 dies	15 dies
10.10	56.40	38.24	100.00

### Assaigs d'alliberament de $\beta$ -hexosaminidasa

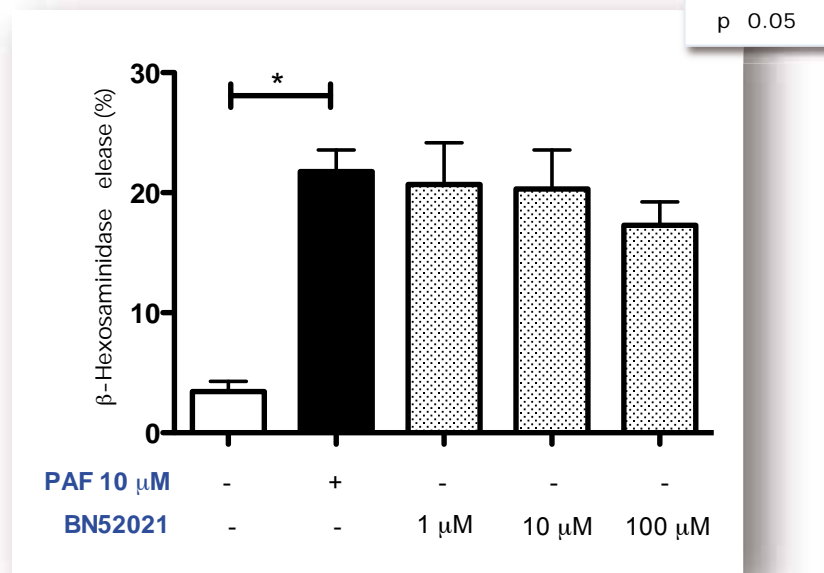
Els antagonistes del PAF EB2086 i BN52021 no van ser capaços d'inhibir significativament l'alliberament de  $\beta$ -hexosaminidasa amb cap de la tres dosis testades (1,10 i 100  $\mu$ M) (figura 22A i 22B). En canvi l'antagonista del PAF CV6209 va inhibir de forma estadísticament significativa l'alliberament de  $\beta$ -hexosaminidasa induïda per PAF a las dues dosis testades (0.2 i 2  $\mu$ M) (figura 22C).

Figura 22. Resum de l'efecte de l'antagonista del PAF EB2086 (n = 3) A), BN52021 (n = 3) B) i CV6209 (n = 3) C) sobre l'alliberament de  $\beta$ -hexosaminidasa induïda per PAF a la línia cel·lular A-172.



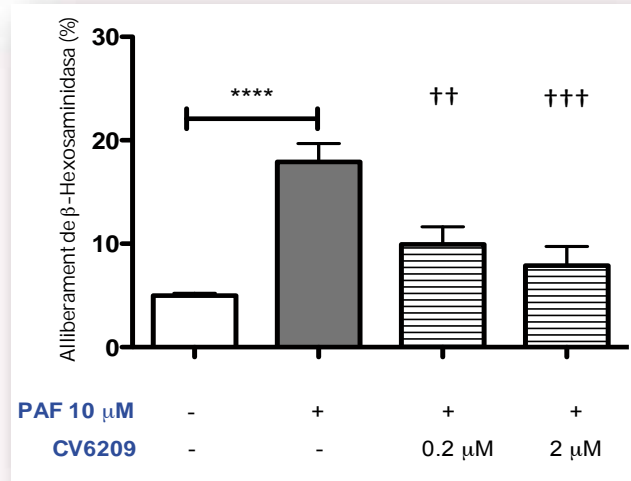
Estadística	Control	PAF	PAF+WEB2086 1 $\mu$ M	PAF + WEB2086 10 $\mu$ M	PAF + WEB2086 100 $\mu$ M
<b>Mínim</b>	2,56	11,59	13,24	12,32	12,97
<b>25% Percentil</b>	2,78	13,23	17,02	13,62	12,97
<b>Mediana</b>	3,05	20,04	25,25	22,39	18,28
<b>75% Percentil</b>	3,55	29,12	28,94	30,18	23,59
<b>Màxim</b>	4,50	32,53	32,29	31,15	23,59
<b>Mitjana</b>	3,21	20,95	23,43	22,06	18,28
<b>Desviació Estàndard</b>	0,68	8,40	7,02	8,66	7,51
<b>Error Estàndard</b>	0,28	3,76	3,14	4,33	5,31

(B)



Estadística	Control	PAF	PAF + BN52021 1 μM	PAF + BN52021 10 μM	PAF + BN52021 100 μM
<b>Mínim</b>	2,10	18,14	15,14	15,20	14,97
<b>25% Percentil</b>	2,10	18,14	15,14	15,20	14,97
<b>Mediana</b>	3,20	23,49	19,78	19,43	15,78
<b>75% Percentil</b>	5,00	23,64	27,11	26,31	21,13
<b>Màxim</b>	5,00	23,64	27,11	26,31	21,13
<b>Mitjana</b>	3,43	21,76	20,68	20,31	17,29
<b>Desviació Estàndard</b>	1,46	3,13	6,03	5,61	3,35
<b>Error Estàndard</b>	0,84	1,81	3,48	3,24	1,93

(C)



(4)

(5)

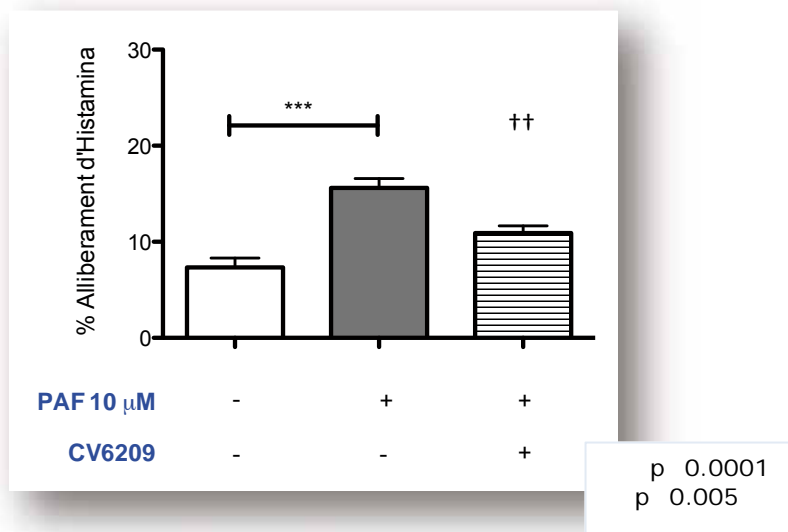
Estadística	Control	PAF	PAF + CV6209 0,2 $\mu$ M	PAF + CV6209 2 $\mu$ M
Mínim	3,40	11,14	1,34	0
25% Percentil	4,40	12,44	6,52	3,41
Mediana	4,90	16,74	8,69	8,20
75% Percentil	5,50	22,07	14,50	10,77
Màxim	6,70	31,38	17,52	19,43
Mitjana	4,99	17,92	9,91	7,88
Desviació Estàndard	0,87	6,11	5,63	6,20
Error Estàndard	0,22	1,76	1,70	1,87

p 0.0001  
p 0.005  
p 0.0005

### Assaigs d'alliberament d'histamina

Donat que únicament l'antagonista del PAF CV6209 va demostrar capacitat inhibidora sobre l'alliberament de  $\beta$ -hexosaminidasa, la inhibició de l'alliberament d'histamina es va provar únicament amb aquest antagonista del PAF (figura 23).

Figura 3. Resum dels resultats de l'efecte de l'antagonista del PAF CV6209 sobre l'alliberament d'histamina induït per l'afectació de la línia cel·lular A-178 (n = 3).



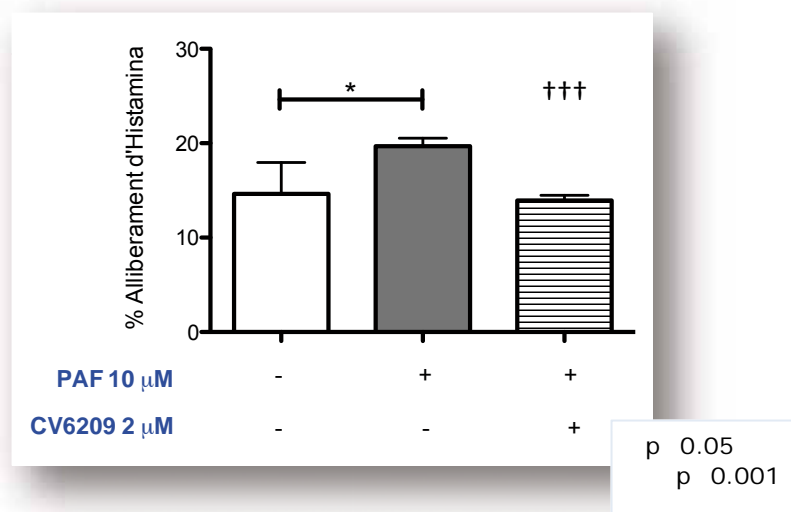
Estadística	CONTROL	PAF	PAF + CV6209 2 $\mu$ M
<b>Mínim</b>	4,44	12,02	8,23
<b>25% Percentil</b>	4,66	14,20	9,05
<b>Mediana</b>	7,64	15,28	11,28
<b>75% Percentil</b>	9,72	17,75	12,47
<b>Màxim</b>	9,95	18,87	13,11
<b>Mitjana</b>	7,34	15,62	10,91
<b>Desviació Estàndard</b>	2,35	2,35	1,84
<b>Error Estàndard</b>	0,96	0,96	0,75



### Assaigs d'alliberament d'histamina

Donat que ni el EB2086 ni el BN52021 havien demostrat capacitat inhibidora a la línia cel·lular LAD-2, es va decidir testar únicament el CV6209 als mastòcits humans aïllats a partir de teixit pulmonar (figura 24).

Figura 24. Resum dels resultats de l'efecte de l'antagonista del A<sub>2</sub>C<sub>1</sub> sobre l'alliberament d'histamina induït per A<sub>23187</sub> a cultius primaris de mastòcits de pulmó (n = 3).



Estadística	Control	PAF	CV6209 2 μM
<b>Mínim</b>	9,79	18,58	13,15
<b>25% Percentil</b>	11,16	18,79	13,36
<b>Mediana</b>	15,99	19,81	14,14
<b>75% Percentil</b>	16,79	20,44	14,33
<b>Màxim</b>	16,81	20,53	14,35
<b>Mitjana</b>	14,65	19,68	13,95
<b>Desviació Estàndard</b>	3,31	0,86	0,55
<b>Error Estàndard</b>	1,65	0,43	0,27

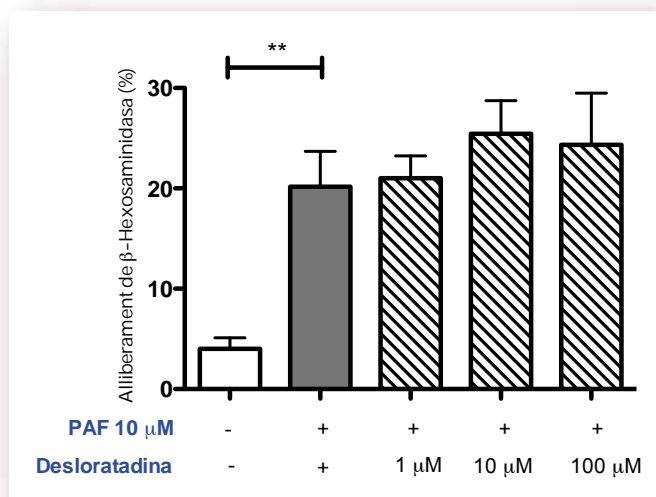
### 2.5.1. A la línia cel·lular LAD-2.

#### Assaigs d'alliberament de $\beta$ -hexosaminidasa

Cap de les dosis testades de la desloratadina (1,10,100  $\mu$ M) van inhibir l'alliberament de  $\beta$ -hexosaminidasa induïda per PAF (figura 25A). En canvi, la levocetirizina (1,10,100 nM i 1  $\mu$ M) va demostrar inhibir amb la m s gran de les dosis (1  $\mu$ M) (figura 25B i 25C). Per aquest motiu, malgrat i que es tractes de dosis molt superiors a les referides a la literatura, es van realitzar assaigs a dosis de 1, 5, 10, 25 i 100  $\mu$ M. D'aquesta manera es van observar una inhibició estadísticament significativa de l'alliberament induïda per PAF a la dosi de 5  $\mu$ M. La rupatadina va demostrar la seva capacitat per inhibir l'alliberament de  $\beta$ -hexosaminidasa induïda per PAF a les dosis de 5, 10 i 25  $\mu$ M, tot i que nom s va ser estadísticament significatiu a les dosis de 5 i 10  $\mu$ M (figura 25D). La desloratadina 1, 10 i 100  $\mu$ M i la rupatadina 100  $\mu$ M van induir l'alliberament de  $\beta$ -hexosaminidasa però no de forma estadísticament significativa.

Figura 25. Efecte de la desloratadina (1-100  $\mu$ M) (A), la levocetirizina (1 nM-1  $\mu$ M) (B) i (1-100  $\mu$ M) (C) i la rupatadina (5-100  $\mu$ M) (D) sobre l'alliberament de  $\beta$ -hexosaminidasa a la línia cel·lular LAD-2 (n=6)

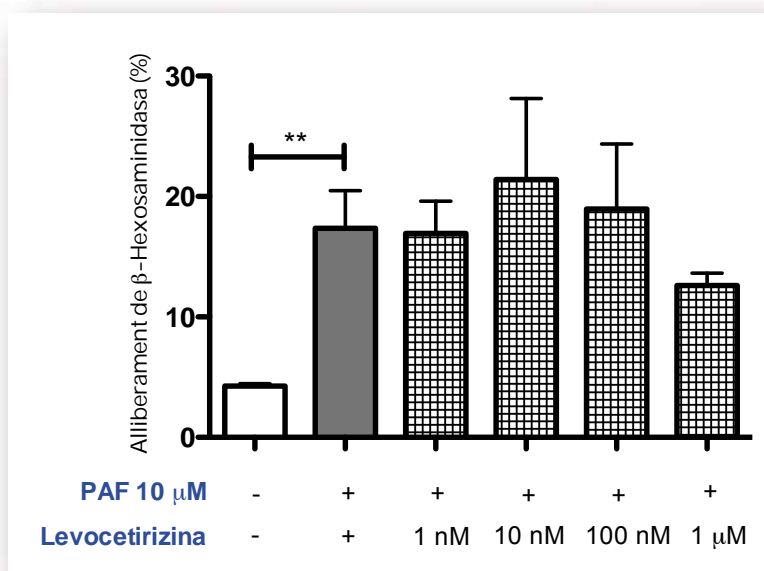
(A)



p 0.001

Estadística	Control	PAF	PAF + DL 1 $\mu$ M	PAF + DL 10 $\mu$ M	PAF + DL 100 $\mu$ M
<b>Mínim</b>	2,30	9,60	15,22	19,58	19,20
<b>25% Percentil</b>	3,12	11,63	15,30	19,70	19,20
<b>Mediana</b>	4,05	20,94	20,55	24,99	24,34
<b>75% Percentil</b>	5,12	23,69	26,87	31,64	29,48
<b>Màxim</b>	5,20	37,31	27,60	32,21	29,48
<b>Mitjana</b>	4,02	20,17	20,98	25,44	24,34
<b>Desviació Estàndard</b>	1,09	9,30	5,49	6,57	7,27
<b>Error Estàndard</b>	0,44	3,51	2,24	3,29	5,14

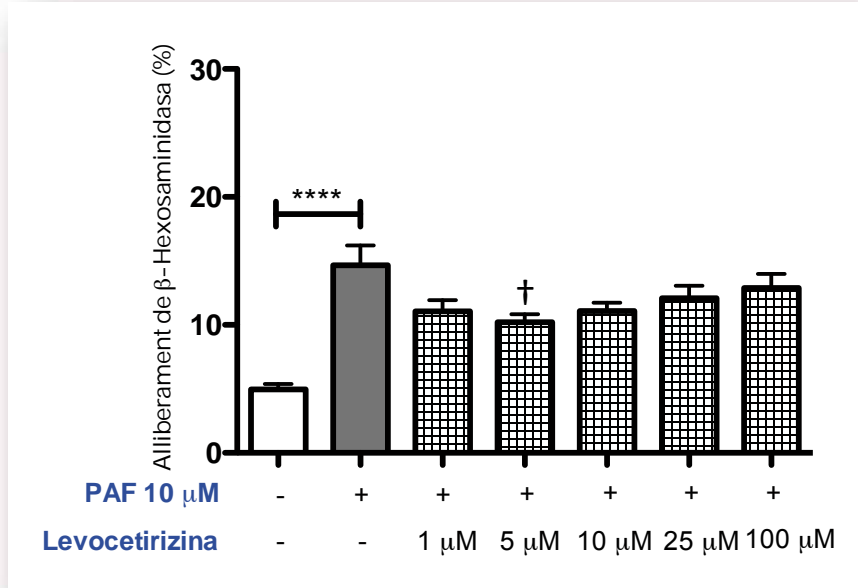
(B)



p 0.005

Estadística	Control	PAF	PAF + LEV 1 nM	PAF + LEV 10 nM	PAF + LEV 100 nM	PAF + LEV 1 $\mu$ M
<b>Mínim</b>	3,30	11,60	11,19	5,35	11,57	9,20
<b>25% Percentil</b>	4,13	12,10	11,81	7,85	12,19	9,35
<b>Mediana</b>	4,63	16,00	17,34	23,35	14,66	10,20
<b>75% Percentil</b>	6,01	23,90	21,69	33,06	30,05	12,59
<b>Màxim</b>	6,95	25,70	21,92	33,63	34,98	15,49
<b>Mitjana</b>	4,96	17,30	16,95	21,42	18,97	11,07
<b>Desviació Estàndard</b>	1,12	6,30	5,32	13,45	10,79	2,29
<b>Error Estàndard</b>	0,42	3,10	2,66	6,72	5,39	0,86

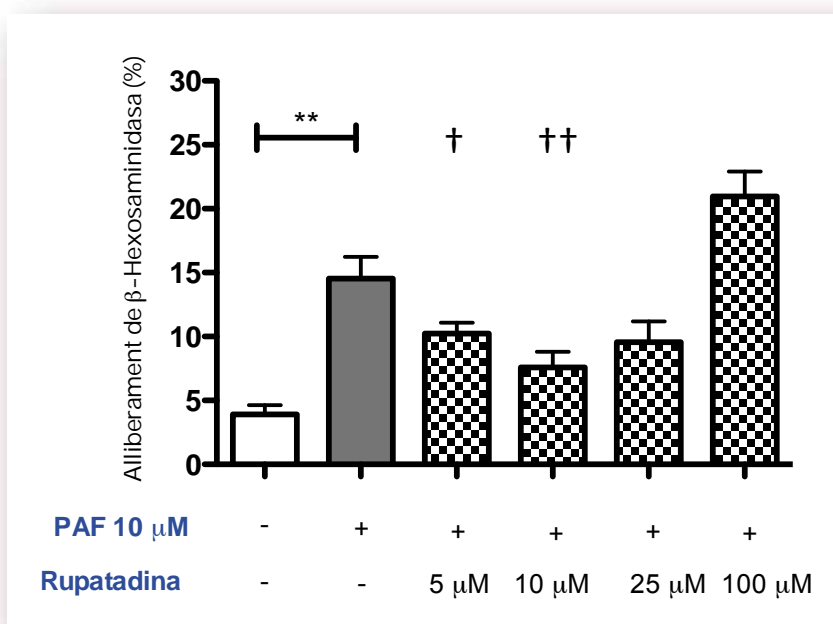
(C)



p 0.0001 p 0.01

Estadística	Control	PAF	PAF + LEV 1 $\mu$ M	PAF + LEV 5 $\mu$ M	PAF + LEV 10 $\mu$ M	PAF + LEV 25 $\mu$ M	PAF + LEV 100 $\mu$ M
<b>Mínim</b>	3,73	11,2	9,20	8,74	9,58	9,13	8,83
<b>25% Percentil</b>	3,83	11,5	9,35	8,83	9,68	9,83	10,62
<b>Mediana</b>	4,34	13,4	10,20	9,88	10,77	11,57	13,01
<b>75% Percentil</b>	4,61	18,2	12,59	10,33	12,57	13,17	16,03
<b>Màxim</b>	4,63	19,3	15,49	13,68	13,48	16,83	16,85
<b>Mitjana</b>	4,26	14,6	11,07	10,21	11,1	12,09	12,88
<b>Desviació Estàndard</b>	0,41	3,50	2,29	1,65	1,58	2,53	2,96
<b>Error Estàndard</b>	0,20	1,56	0,86	0,62	0,64	0,95	1,12

(D)



p 0.005  
p 0.05  
p 0.005

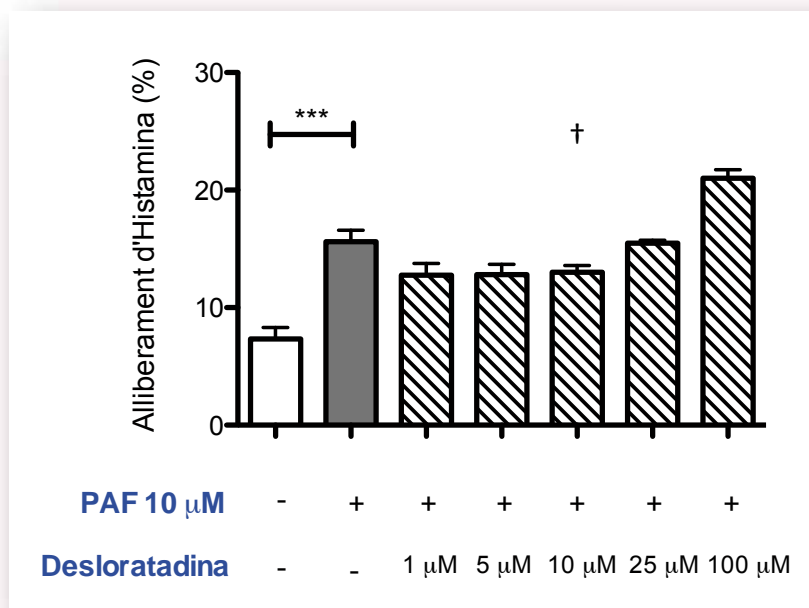
Estadístics	Control	PAF	PAF+ RUP 5 $\mu$ M	PAF + RUP 10 $\mu$ M	PAF + RUP 25 $\mu$ M	PAF + RUP 100 $\mu$ M
<b>Mínim</b>	3,21	10,39	7,18	3,87	2,21	13,47
<b>25% Percentil</b>	3,22	10,46	8,42	4,33	6,77	15,86
<b>Mediana</b>	3,88	13,92	10,32	7,69	10,58	23,31
<b>75% Percentil</b>	4,32	18,85	12,32	10,60	12,81	24,43
<b>Màxim</b>	5,24	20,04	12,54	11,41	12,97	24,78
<b>Mitjana</b>	3,91	14,53	10,24	7,58	9,56	20,97
<b>Desviació Estàndard</b>	0,74	4,17	2,07	3,04	3,99	4,76
<b>Error Estàndard</b>	0,30	1,70	0,85	1,24	1,63	1,94

### Assaigs d'alliberament d'histamina

La desloratadina va inhibir l'alliberament d'histamina amb les dosis de 1, 5 i 10  $\mu\text{M}$ , tot i que nom s va ser estadísticament significatiu a la dosi de 10  $\mu\text{M}$ . La levocetirizina va inhibir amb totes les dosis provades, però l'efecte va ser estadísticament significatiu nom s a 1,5,10 i 25  $\mu\text{M}$ . La rupatadina va inhibir l'alliberament d'histamina induïda per PAF a les dosis de 1, 5, 10 i 25  $\mu\text{M}$ , malgrat que nom s va ser estadísticament significatiu per les dosis de 1, 5 i 10  $\mu\text{M}$ . La desloratadina i la rupatadina 100  $\mu\text{M}$  van induir l'alliberament d'histamina però no de forma estadísticament significativa. Finalment, no es van observar diferències entre cap de les dosis de la desloratadina, la levocetirizina o la rupatadina (figura 26A, 26B i 26C).

figura . Resum de la desloratadina (A), la levocetirizina (B) i la rupatadina (C) sobre l'alliberament d'histamina induït per PAF a la línia cel·lular A-188.

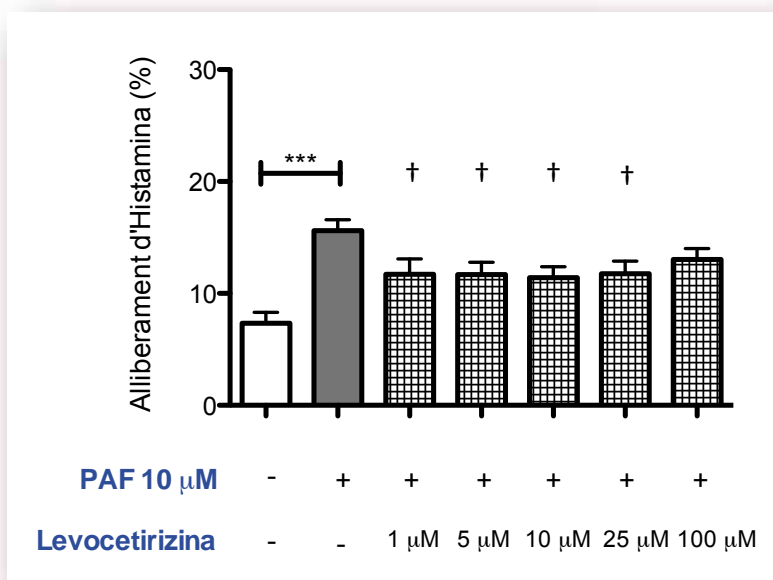
(A)



p < 0.0001 p < 0.05

	Control	PAF	PAF+ DL 1 µM	PAF+ DL 5 µM	PAF+ DL 10µM	PAF+ DL 25 µM	PAF+ DL 100 µM
<b>Mínim</b>	4,40	12,02	8,23	9,13	9,15	11,04	17,75
<b>25% Percentil</b>	4,66	14,20	9,04	10,70	11,01	11,82	19,85
<b>Mediana</b>	7,64	15,28	11,28	13,05	13,49	13,01	21,43
<b>75% Percentil</b>	9,71	17,75	12,47	14,24	14,50	14,43	22,34
<b>Màxim</b>	9,95	18,87	13,11	16,62	14,75	14,62	22,74
<b>Mitjana</b>	7,34	15,62	10,91	12,75	12,82	13,02	21,02
<b>Desviació Estàndard</b>	2,35	2,34	1,84	2,49	2,10	1,38	1,78
<b>Error Estàndard</b>	0,95	0,95	0,75	1,02	0,85	0,56	0,72

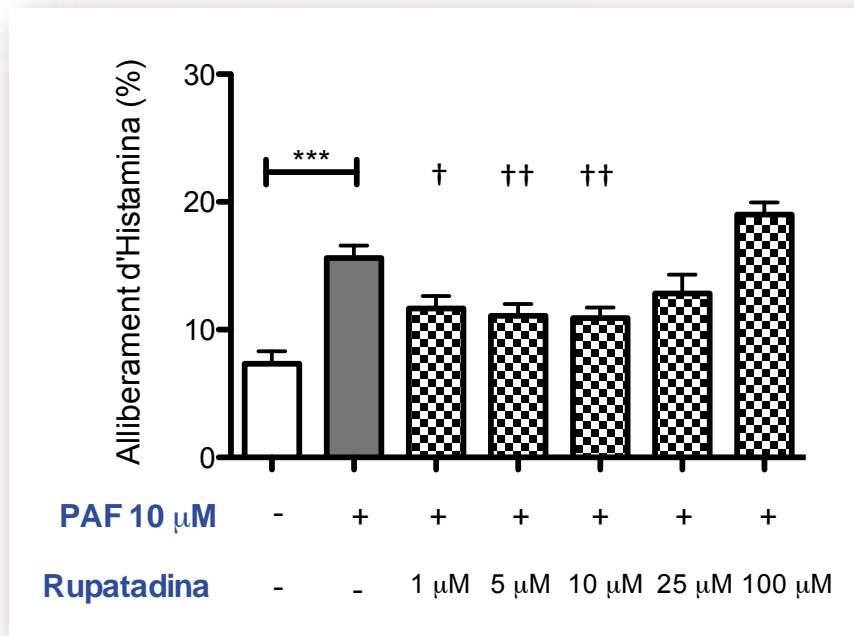
B)



p 0.001  
p 0.05

	Control	PAF	PAF+ LEV 1 µM	PAF+ LEV 5 µM	PAF+ LEV 10µM	PAF+ LEV 25 µM	PAF+ LEV 100 µM
<b>Mínim</b>	4,40	12,02	8,05	7,87	7,83	6,74	8,63
<b>25% Percentil</b>	4,66	14,20	8,70	9,39	9,74	10,07	11,42
<b>Mediana</b>	7,64	15,28	11,27	11,54	11,28	12,28	13,61
<b>75% Percentil</b>	9,71	17,75	14,73	14,56	13,72	13,58	14,67
<b>Màxim</b>	9,95	18,87	16,77	14,74	14,21	14,88	15,66
<b>Mitjana</b>	7,34	15,62	11,72	11,68	11,42	11,75	13,03
<b>Desviació Estàndard</b>	2,35	2,34	3,36	2,69	2,36	2,79	2,46
<b>Error Estàndard</b>	0,95	0,95	1,37	1,10	0,96	1,14	0,99

(C)



p 0.0001 p 0.05 p 0.005

	<i>Control</i>	<i>PAF</i>	<i>PAF+ RUP 1 μM</i>	<i>PAF+ RUP 5 μM</i>	<i>PAF+ RUP 10 μM</i>	<i>PAF+ RUP 25 μM</i>	<i>PAF+ RUP 100 μM</i>
<b>Mínim</b>	4,40	12,02	8,60	7,21	7,56	7,25	15,22
<b>25% Percentil</b>	4,66	14,20	9,95	9,55	9,19	9,49	16,67
<b>Mediana</b>	7,64	15,28	11,65	11,49	11,28	13,52	20,06
<b>75% Percentil</b>	9,71	17,75	12,93	12,45	12,67	16,19	20,69
<b>Màxim</b>	9,95	18,87	15,71	14,05	13,11	16,41	21,00
<b>Mitjana</b>	7,34	15,62	11,67	11,08	10,91	12,84	19,01
<b>Desviació Estàndard</b>	2,35	2,34	2,34	2,25	2,01	3,60	2,30
<b>Error Estàndard</b>	0,95	0,95	0,95	0,92	0,82	1,47	0,93



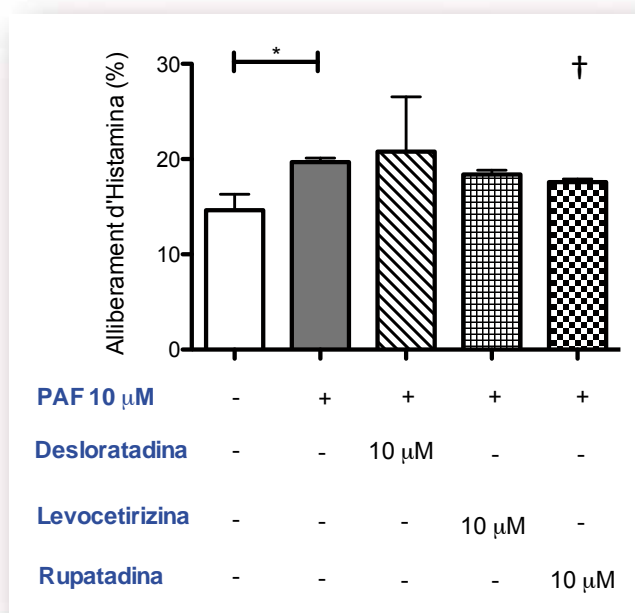
## 2.5.2. A un cultiu primari de mastòcits pulmonars

### Assaigs d'alliberament d'histamina

La rupatadina 10  $\mu\text{M}$  va inhibir l'alliberament d'histamina induïa per PAF als mastòcits humans aïllats a partir de mostres de pulmó de forma estadísticament significativa ( $p < 0.05$ ). En canvi ni la desloratadina ni la levocetirizina van aconseguir aquest mateix efecte.

(figura 27)

figura 27. Resum dels resultats de l'efecte de la desloratadina, la levocetirizina i la rupatadina sobre l'alliberament d'histamina induït per PAF en cultius primaris de mastòcits pulmonars (n = 10).

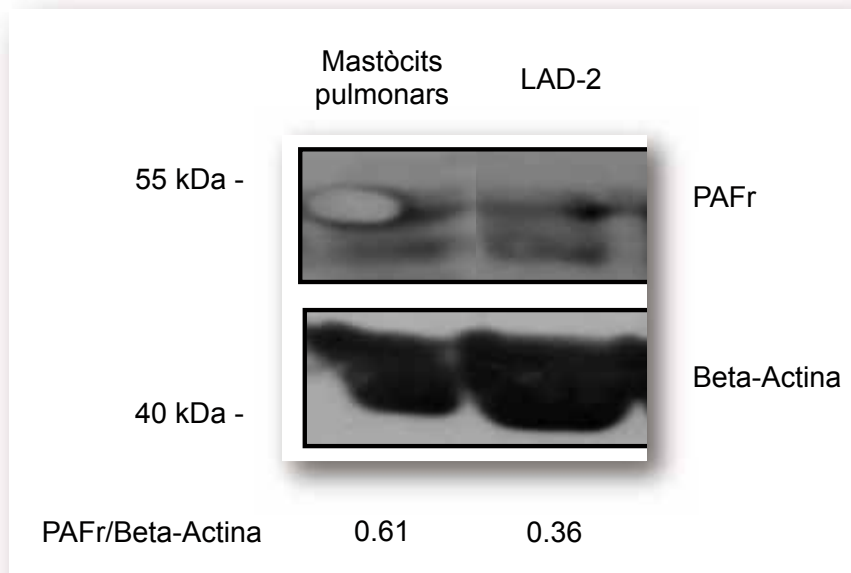


\* $p < 0.05$  † $p < 0.05$

Estadística	Control	PAF	DL 10 $\mu\text{M}$	LEV 10 $\mu\text{M}$	RUP 10 $\mu\text{M}$
Mínim	9,79	18,58	17,12	17,70	16,99
25% Percentil	11,16	18,79	17,36	17,78	17,08
Mediana	15,99	19,81	18,36	18,09	17,41
75% Percentil	16,79	20,44	26,67	19,33	18,26
Màxim	16,81	20,53	29,34	19,72	18,53
Mitjana	14,65	19,68	20,79	18,40	17,58
Desviació Estàndard	3,31	0,86	5,73	0,90	0,66
Error Estàndard	1,65	0,43	2,86	0,45	0,33

Mitjançant Western Blot s'ha demostrat l'existència del receptor del PAF en mastòcits de la línia cel·lular LAD-2 i s'ha corroborat als mastòcits humans d'origen pulmonar (figura 28).

Figura 28. Resum dels resultats de l'expressió proteica (Western Blot) del receptor de PAF a la línia cel·lular LAD-2 i als cultius primaris de mastòcits pulmonars. Es va comparar l'expressió del receptor del PAF a la línia cel·lular LAD-2 i a mastòcits de pulmó on s'havia descrit la seva presència.



PAFr receptor del PAF

## β

A la taula 7 es pot veure l'efecte inhibitori induït pels diferents antagonistes ( ) respecte a l'alliberament d'histamina o β-hexosaminidasa induïda per PAF. La rupatadina (100 μM) i la desloratadina (100 μM) indueixen l'alliberament tant d'histamina com de β-hexosaminidasa, però de forma no estadísticament significativa.

*Taula 7. Resum de l'efecte inhibitori que presenten els diferents antagonistes sobre l'alliberament d'histamina i β-hexosaminidasa induïdes per PAF a la línia cel·lular LAD-2. La desloratadina (100 μM) i la rupatadina (100 μM) indueixen alliberament d'histamina i desloratadina (1,10,100 μM) i rupatadina (100 μM) indueixen l'alliberament de β-hexosaminidasa però no en cap dels casos de forma estadísticament significativa.*

PAF + inhibidor (μM)	Alliberament d'Histamina		Alliberament de β-hexosaminidasa	
		p		p
<b>CV6209 0.2</b>			5	**p<0.005
<b>CV6209 2</b>	0	**p<0.005	5	***p<0.0005
<b>Desloratadina 1</b>	1			
<b>Desloratadina 5</b>	1			
<b>Desloratadina 10</b>	1	*p<0.05		
<b>Desloratadina 25</b>	1			
<b>Desloratadina 100</b>	5		1	
<b>Levocetirizina 1</b>	5	*p<0.05		
<b>Levocetirizina 5</b>	5	*p<0.05	0	*p<0.01
<b>Levocetirizina 10</b>		*p<0.05		
<b>Levocetirizina 25</b>	5	*p<0.05	1	
<b>Levocetirizina 100</b>	1		1	
<b>Rupatadina 1</b>	5	*p<0.05		
<b>Rupatadina 5</b>		**p<0.005		*p<0.05
<b>Rupatadina 10</b>	0	**p<0.005		**p<0.005
<b>Rupatadina 25</b>	1			
<b>Rupatadina 100</b>				

ns: no significatiu

% d'inhibició respecte a l'alliberament induït per PAF.

# DISCUSSIÓ

---

## **1. Projecte I: Valoració de l'efecte d'un antihistamínic amb activitat antagonista del PAF sobre els símptomes induïts per PAF en un model de provocació nasal in vivo**

Aquest estudi ha demostrat la capacitat del PAF per induir una resposta clínica a la mucosa nasal i que la rupatadina, un antihistamínic amb efecte antagonista del PAF, és capaç de disminuir els símptomes en comparació amb placebo. Així mateix s'ha observat que no existeixen diferències entre individus sans i a pacients amb rinitis al·lèrgica respecte a l'efecte del PAF o del rupatadina.

L'avaluació subjectiva de la resposta clínica l'hem realitzat mitjançant la utilització d'escala de puntuació de símptomes, com són l'escala de Likert o l'escala visual anàloga (EVA). Per a l'avaluació objectiva hem emprat la rinometria acústica, tècnica utilitzada per avaluar la geometria nasal i que ha demostrat tenir una gran correlació amb els símptomes, principalment amb la obstrucció nasal (127, 135). En estudis publicats prèviament s'havia utilitzat la rinomanometria com a mètode objectiu d'avaluació, però en contrast amb la rinometria acústica, ofereix una pobre correlació amb els símptomes (125, 127, 128) .

L'efecte del PAF sobre la mucosa nasal ja havia estat valorat prèviament per diversos autors però amb resultats contradictoris. Lementsson et al (37) havia demostrat que l'efecte del PAF només era observable en pacients amb rinitis al·lèrgica. En canvi d'altres autors com Fedeschi et al. (38) havia evidenciat que l'efecte del PAF només era evident en voluntaris sans, i aquest no era universal ja que només el presentaven un 30% dels individus. En la línia dels nostres resultats els treballs de Leggieri et al. (129) no van trobar cap diferència entre els individus sans o aquells amb rinitis al·lèrgica.

L'administració de PAF en el nostre estudi s'ha realitzat mitjançant un pauta d'increment progressiu de les dosis (100 nM, 200 nM i 400 nM). La resposta màxima l'hem observat als 60 minuts després de la darrera dosi de PAF (400 nM). En tots els estudis publicats prèviament utilitzaven una pauta d'administració única (entre 30 i 600 nM), i la màxima intensitat de la simptomatologia es produïa als 30 minuts (37, 38, 129). En el nostre treball hem observat una resolució gairebé completa dels símptomes als 240 minuts després de la primera dosi de PAF administrada, dades

similars a les observades per Fedeschi et al (38). En canvi d'altres autors han trobat que la resolució dels símptomes i de les resistències nasals (mesurades per rinomanometria) es produïa tan precoçment com als 60 minuts després de la provocació amb PAF. La variabilitat a les dosis utilitzades als diferents estudis (entre 30 i 700 nM) podria ser la causa de les discrepàncies observades en la durada dels símptomes.

El símptoma observat principalment en relació amb la administració de PAF ha estat la congestió nasal, mentre que la rinorrea, i sobretot els esternuts o la pruija han estat símptomes menors, reportats per pocs pacients i de baixa intensitat. Aquest patró clínic podria ser explicat per la ben coneguda capacitat del PAF per induir un increment de la permeabilitat vascular (37, 38, 129). És per aquest motiu que la utilització de la rinometria acústica per la valoració de la congestió nasal no ha estat un fet casual. La rinometria acústica ha estat utilitzada per valorar el canvi en els volums nasals inclús en patologies amb greus obstruccions nasals com la poliposi, on d'altres tècniques com la rinomanometria no poden ser utilitzades (125, 126, 128).

El nostre estudi ha demostrat que rupatadina inhibeix els símptomes nasals induïts per PAF quan es valora l'AUC (escala de Likert), tot i que no modifica l'obstrucció nasal mesurada de forma objectiva mitjançant la RAc. En canvi levocetirizina no ha evidenciat cap efecte sobre cap dels dos paràmetres. Diversos estudis han demostrat l'efecte inhibitor d'ambdós antihistamínics sobre els símptomes nasals (61, 113) o fins i tot sobre la obstrucció nasal (113, 114, 136) quan l'estímul desencadenant és un al·lèrgic. Però aquest és el primer estudi amb antihistamínics que utilitza el PAF com a inductor de la resposta clínic. De manera que les discrepàncies observades respecte a estudis previs podrien ser atribuïbles a la major capacitat del PAF d'activar diferents tipus cel·lulars en una fase inicial de la inflamació i així induir l'alliberament de múltiples mediadors més enllà de la histamina (12, 13). És ben tractaria d'una suposició, donat que no existeixen estudis que comparin la intensitat de la resposta al·lèrgica després de l'estimulació amb al·lèrgens o PAF. De totes maneres, tot i que cap dels dos fàrmacs ha demostrat induir una milloria estadísticament significativa de l'obstrucció nasal (mesurada per RAc), rupatadina sí que presenta un cert efecte que podríem ser atribuïble a l'activitat anti-PAF que no comparteix amb levocetirizina.

El paper del PAF com a mediador de la inflamació ha estat àmpliament estudiat a les patologies pulmonars. S'han trobat nivells de PAF elevats en pacients amb asma (137, 138), i varies línies d'evidència independents indiquen que el PAF pot ser un

mediador important implicat en la perpetuació de la inflamació dels asmàtics (139). Però malgrat la suposada rellevància d'aquest mediador a l'asma, els antagonistes del PAF que s'han utilitzat fins el moment no han demostrat una eficàcia terapèutica massa evident (26, 34, 140, 141). En canvi alguns antagonistes del PAF com el AB - 491 sí que han demostrat la seva eficàcia en models animals de rinitis (42, 43). Podria ser que estigués davant d'un efecte paradoxal dels antagonistes del PAF, sense efecte sobre el pulmó tot i la seva capacitat antiinflamatòria, però amb un potencial efecte sobre rinitis. Una situació similar al dels antihistamínics, amb un efecte clarament demostrat sobre els símptomes nasal en multitud d'estudis, a resultes dels quals es consideren de primera elecció en el tractament de la rinitis, però sense eficàcia demostrada a l'asma (20, 63). Malgrat que existeixen moltes evidències que recolzen el concepte d'una via respiratòria única, encara queden per dilucidar moltes incògnites sobre les similituds i diferències entre rinitis i asma. Serà aquest coneixement el que probablement ens permetrà realitzar un abordatge terapèutic més realista.

## 2. Projecte II: Valoració de l'efecte d'un antihistamínic amb activitat antagonista del PAF sobre l'alliberament de mediadors de la inflamació induïda per PAF en mastòcits humans

Amb aquest estudi hem demostrat que els antihistamínics rupatadina, levocetirizina, desloratadina i l'antagonista del PAF CV6209 inhibeixen la desgranulació induïda per PAF en un model in vitro de mastòcits humans (línia cel·lular LAD-2 i aïllats a partir de pulmó), tot i que rupatadina presenta un efecte lleugerament superior a la resta d'antihistamínics.

Inicialment vàrem establir mitjançant experiments de dosi-resposta que 10  $\mu$ M era la concentració òptima de PAF per induir la desgranulació dels mastòcits LAD-2. Els escassos estudis previs havien demostrat que dosis entre 1 nM i 1  $\mu$ M eren capaces d'induir desgranulació en mastòcits humans de pulmó, mastòcits derivat de sang perifèrica (17) o a la línia cel·lular HMC-1 (19). La dosi al nostre estudi és deu vegades superiors a l'utilitzada per altres autors, fet que es pot justificar per les diferències entre els mastòcits humans utilitzats.

Donat que no teníem referències sobre estudis previs que demostrassin l'existència de receptor de PAF a LAD-2, mitjançant tècniques de Western Blot vàrem confirmar la seva presència. Aquest fet, juntament amb algunes de les evidències obtingudes amb els antagonistes, ens fa suposar que l'efecte observat al nostre estudi podria ser depenent del receptor del PAF. Prèviament es tenia constància de la seva presència a mastòcits humans de pulmó i derivats de sang perifèrica, i la seva gairebé inexistència a mastòcits cutanis (17).

Es van realitzar experiment d'inhibició amb tres antagonistes del PAF, WEB2086, BN52021 i CV6209, que havien demostrat la seva eficàcia en diferents experiments i tipus cel·lulars (17, 84, 87). Només el CV6209, al igual que en estudis previs amb mastòcits humans (17), va demostrar poder inhibir la desgranulació de LAD-2 induïda per PAF. El BN52021 havia demostrat el seu efecte sobre l'alliberament de mediadors en mastòcits de rata, però al igual que va evidenciar Kajiwara et al. (17) a mastòcits humans, no va tenir cap efecte sobre la desgranulació a LAD-2. El WEB2086 no s'havia testat mai a mastòcits humans, però si a cèl·lules endotelials, leucòcits o macròfags no humans (85, 142).

Els mediadors alliberats com a conseqüència de la desgranulació mastocitaria tenen un efecte sobre un seguit de cèl·lules/estructura diana, però també exerceixen una

acció autocrina i paracrina, responsable de l'amplificació de la resposta al·lèrgica (17). Els antihistamínics, gràcies a la capacitat d'estabilitzar la forma inactiva del receptor d'histamina, inhibeixen parcialment aquestes efectes de l'histamina, disminuint la intensitat i durada de la reacció al·lèrgica a expenses de la reducció de l'alliberament de més mediadors (5). Aquest és l'efecte observat amb rupatadina i levocetirizina al nostre estudi amb LAD-2 (inhibició d'ambdós mediadors histamina i  $\beta$ -hexosaminidasa) però no pas amb desloratadina, que només és capaç d'inhibir l'alliberament d'histamina.

La justificació de com el PAF pot influir en la manera com els mastòcits desgranulen entra dintre del camp de l'especulació. Diversos treballs han demostrat l'existència d'una desgranulació diferencial o també anomenada piecemeal, on en resposta a un estimul no és produeix l'alliberament de tot el contingut dels grànuls mastocitaris, sinó només d'un part d'aquest (133, 143). Així per exemple l'amitriptilina pot induir l'alliberament de serotonina i no d'histamina (144) o els peptidoglicans són capaços d'alliberar LTC<sub>4</sub> però no  $\beta$ -hexosaminidasa (145). Tot i que no tenim constància de que es coneguin els mediadors que s'alliberen en relació amb l'estimulació induïda per PAF, podríem suposar a la vista dels resultats obtinguts que el PAF produeix una alliberament diferencial d'histamina i  $\beta$ -hexosaminidasa a LAD-2. D'aquesta manera qualsevol dels antagonistes testats podria bloquejar una alliberament d'histamina no massa important, però és requeririen fàrmacs més potents, en aquest cas levocetirizina i rupatadina, per inhibir una alliberament de  $\beta$ -hexosaminidasa més elevada.

Rupatadina 10  $\mu$ M inhibeix l'alliberament de  $\beta$ -hexosaminidasa més intensament que levocetirizina 10  $\mu$ M però d'igual manera que CV6209 2  $\mu$ M, efecte que no s'observa a d'altres dosis. D'aquesta manera podríem postular que la gran potencia inhibidora de rupatadina està justificada no només per l'efecte sobre els receptors de la histamina, ja que és similar al de levocetirizina (146, 147), sinó també pel seu efecte sobre el receptor de PAF. I que la seva capacitat inhibitòria equiparable al potent antagonista del PAF CV6209 seria el resultat d'un efecte moderat sobre el receptor del PAF (42 vegades menor que el CV6209) (78) però d'una gran activitat antihistamínica (figura 29a).

Però una altra possible explicació de perquè levocetirizina té un efecte més proper a rupatadina i que no pas a desloratadina, seria que també tingués un efecte sobre el receptor del PAF, tot i que probablement inferior a rupatadina (Figura 29b). Un

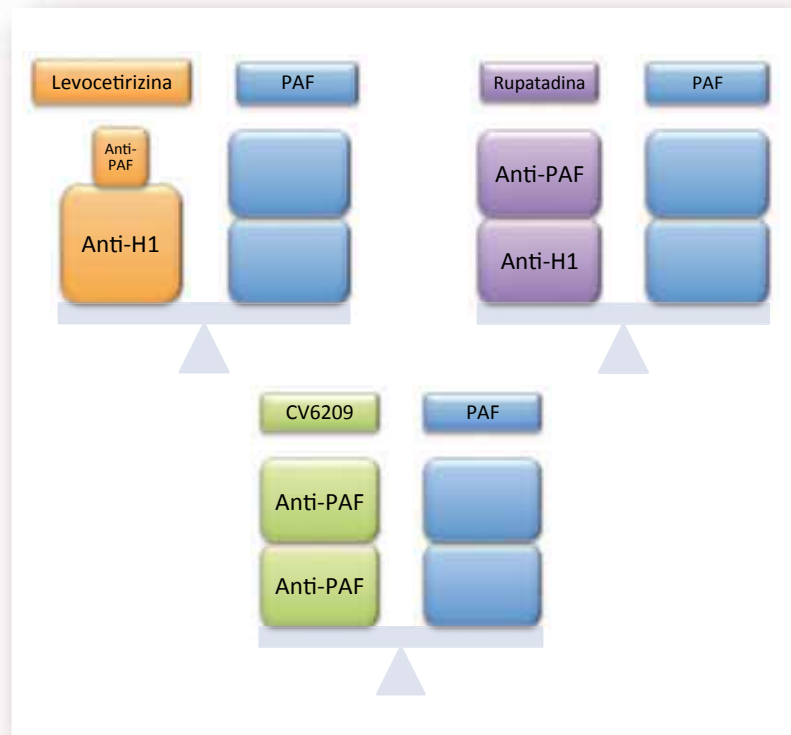


aspecte destacable del experiments realitzats amb levocetirizina és que s'han utilitzats dosis molt superiors a les reportades a la literatura, sempre en un rang entre 1 nM i 1  $\mu$ M. De manera que aquest fet ens podria fer especular que levocetirizina a dosis elevades també podria tenir un cert efecte sobre el receptor del PAF.

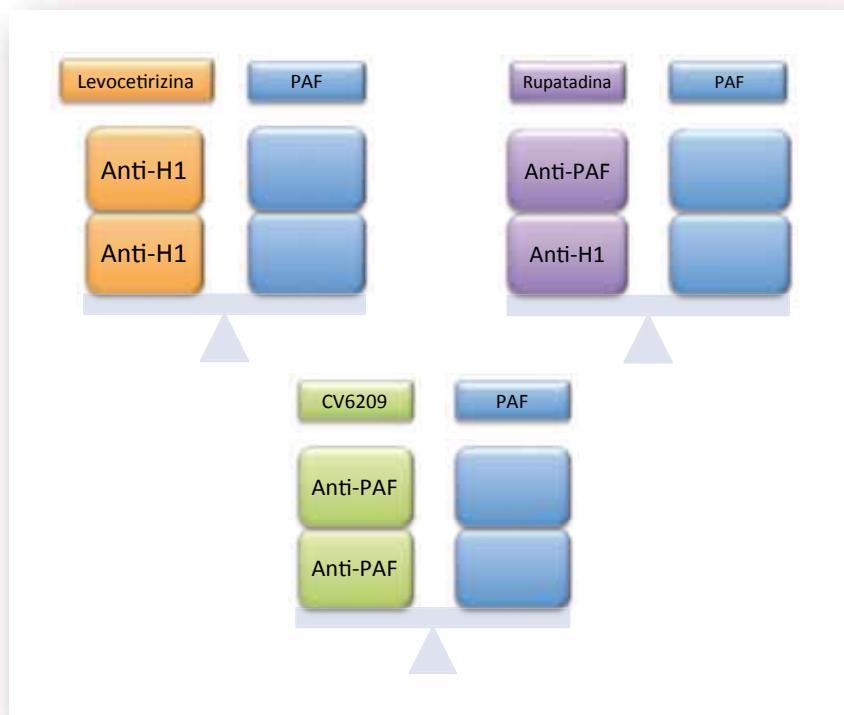
En canvi a la pràctica clínica habitual es produeix la situació contrària, ja que les dosis de levocetirizina aprovades són inferiors (5 mg) a les de rupatadina (10 mg). Això ens fa plantejar una altra pregunta, ja si baixes dosis de rupatadina no tenen un efecte sobre la inflamació induïda per PAF en el model in vitro, rupatadina 5 mg a la pràctica real potser no seria capaç de demostrar la mateixa eficàcia que levocetirizina a 5 mg. De fet en el nostre model de provocació nasal in vivo, levocetirizina 5 mg és igual d'eficaç que rupatadina 10 mg. Això voldria dir que ambdós fàrmacs utilitzats a la mateixa dosi (5 o 10 mg) podrien presentar diferències d'eficàcia?. La veritat és que resulta molt difícil extrapolar els resultats obtinguts en un model cel·lular on, en aquest cas els mastòcits, no presenten interaccions amb d'altres cèl·lules ni estan afectats per les diferents condicions a les que pot estar sotmès un organisme viu complet. I és encara més difícil extrapolar l'efecte de les dosis, on diferents factors que poden anar des de l'absorció gàstrica fins el metabolisme hepàtic o renal, poden influir en la concentració final que arriben als receptors cel·lulars.

Figura 1. Resum simplificat de l'hipotètic efecte de la levocetirizina, la rupatadina i el C<sub>17</sub> sobre l'alliberació de mediadors induïda per A<sub>242</sub> en el cas de que levocetirizina presentés A) o no B) un efecte anti-A<sub>242</sub>. Rupatadina inhibeix la desgranulació dels mastòcits de forma comparable a l'antagonista del A<sub>242</sub> C<sub>17</sub> tot i que l'efecte anti-A<sub>242</sub> de la rupatadina és menor, de manera que l'efecte net final seria resultat de l'efecte antihistamínic unit a l'efecte antagonista del A<sub>242</sub>. En cas de que la levocetirizina tingues efecte anti-A<sub>242</sub>, aquest sembla menor que el de la rupatadina, de manera que l'efecte net seria el resultat d'un gran efecte antihistamínic i un menor efecte anti-A<sub>242</sub>. Si assumim que la levocetirizina no té efecte anti-A<sub>242</sub>, l'efecte observat podria ser a expenses totalment de la seva capacitat antihistamínica.

(A)



(B)



# APLICABILITAT PRÀCTICA

---

En els darrers anys s'han invertit molts esforços en la recerca de dianes terapèutiques que permetin un millor control de la malaltia al·lèrgica. El que sembla clar és que no existeix un mediador únic responsable de les reaccions i que l'estratègia passa per intentar controlar la major quantitat de variables possibles, però sense caure en la trampa de pretendre bloquejar mediadors que no són rellevants (13). El paper del PAF a les malalties al·lèrgiques ha estat demostrat tant a la rinitis (16, 35, 37-40), considerat un problema creixent i que afecta a un gran percentatge de la població (20), com a l'anafilaxi, amb una incidència no menyspreable però amb un potencial risc per la vida dels pacients (44, 54, 55, 148).

L'anafilaxi és una entitat sovint infra-diagnosticada i alarmantment infra-tractada (44). L'adrenalina és el tractament d'elecció a l'anafilaxi i el retard en la seva administració suposa un risc afegit pel desenvolupament d'una reacció encara més greu que pot acabar amb la vida dels pacients. Però tot i que les guies de practica clínica insisteixen en aquest punt, en la immensa majoria dels casos el pacient que és atès a urgències amb un quadre suggestiu d'anafilaxi reb al menys una dosi d'antihistamínic i però en menys de la meitat de les ocasions adrenalina (47, 48, 85). Això ens hauria de fer reflexionar sobre la necessitat urgent de formar als metges no al·lèrgòlegs en el reconeixement i actuació correcta davant una reacció anafilàctica. Però per una altra banda i entenent que formar a tot un col·lectiu pot ser un procés lent, potser el menor de tots els mals seria utilitzar el millor dels antihistamínics possibles, aquell que ens permeti anar més enllà de la simple inhibició de la histamina. Amb aquesta afirmació no pretenem situar a la rupatadina en la primera línia del tractament d'una patologia tant greu com l'anafilaxi, perquè considerem que tot i els indicis encara li queda molt per demostrar en aquest camp. Però si pretenem que serveixi de reflexió i per evidenciar que tot i la seva potencia relativa, potser alguns antihistamínics poden oferir-nos quelcom més a l'anafilaxi que no només el control simptomàtic.

La rinitis no és considerada una malaltia greu que pot comprometre la vida del pacient, però en canvi sí afecta la qualitat de vida de una forma comparable a com ho fan malalties com la cardiopatia isquèmica (20, 62, 149). Els pacients amb rinitis moderada-greu amb freqüència requereixen més d'un fàrmac pel

control de la seva malaltia, situació que al igual que a d'altres patologies dificulta el compliment terapèutic. Els corticoides tòpics nasals són una molt bona opció terapèutica, però és ben conegut que la denominada corticofòbia està present en una part important dels pacients. D'aquesta manera considerem que es fa necessari la optimització del tractament, que en aquests pacients serà crònic, buscant la menor quantitat de fàrmacs possibles que puguin controlar els símptomes i amb el menor rebuig per la seva part. En aquesta posició podrien situar els antihistamínics, fàrmacs de primera línia en el tractament de la rinitis, prescrits habitualment tant per metges especialistes com a nivell de l'atenció primària, acceptats majoritàriament pels pacients i que han millorat en els darrers anys el seu perfil de seguretat i han disminuït els efectes indesitjables associats, com la somnolència (20, 62). Però la simple inhibició de la histamina, com en el cas de l'anafilaxi, no permetrà als antihistamínics ocupar aquesta posició preferencial en el tractament de la rinitis. Així es fa necessari investigar en els denominat efectes antial·lèrgics, com la inhibició del PAF en el cas de la rupatadina, ja que seran els que en un futur marcaran la diferència.

En definitiva, el nostre treball apunta a que la inhibició de dos mediadors rellevants de la resposta al·lèrgica com la histamina i el PAF aporta un avantatge terapèutic respecte a la inhibició de només un d'aquests mediadors. Així la recerca en fàrmacs tan ben coneguts com els antihistamínics pot millorar el tractament de patologies tan freqüents com la rinitis al·lèrgica i tan greus com les reaccions anafilàctiques.

# CONCLUSIONS

---

## 1. Projecte I: Valoració de l'efecte d'un antihistamínic amb activitat antagonista del PAF sobre els símptomes induïts per PAF en un model de provocació nasal in vivo

- El PAF és capaç d'induir símptomes característics de rinitis quan s'aplica sobre la mucosa nasal.
  - Els símptomes més freqüentment associats a l'administració del PAF són la obstrucció nasal i la rinorrea.
  - La màxima simptomatologia s'aconsegueix als 60 minuts i es resol als 180 minuts després de l'aplicació de la última dosi de PAF. És el mateix que dir que la simptomatologia màxima s'assoleix als 120 minuts i es resol als 240 minuts després de la primera dosi.
- L'efecte del PAF sobre la mucosa nasal no és diferent als individus sans o amb rinitis al·lèrgica
- Rupatadina, un antihistamínic amb activitat antagonista del PAF, disminueix els símptomes induïts per PAF (quan es valora l'AUC dels símptomes nasals valorats amb l'escala de Likert). En canvi levocetirizina, un antihistamínic sense activitat antagonista del PAF, no és capaç d'inhibir els símptomes induïts per PAF.
  - L'efecte de rupatadina o levocetirizina no és diferent en individus sans o amb rinitis al·lèrgica.

## 2. Projecte II: Valoració de l'efecte d'un antihistamínic amb activitat antagonista del PAF sobre l'alliberament de mediadors de la inflamació induïda per PAF en mastòcits humans

- Les dosis que hem requerit per estimular els mastòcits, tant LAD-2 com de pulmó, són 10 vegades superiors a les reportades prèviament a la literatura.
- L'efecte dels antagonistes (rupatadina, desloratadina i levocetirizina) sobre la resposta induïda per PAF és diferent als mastòcits de la línia cel·lular LAD-2 i als mastòcits humans de pulmó.

- L'efecte de l'antagonista del PAF CV6209 és igual a LAD-2 i mastòcits humans de pulmó.
- Els diferents antihistamínics testats inhibeixen de forma diferencial els mastòcits LAD-2. Rupatadina i levocetirizina inhibeixen histamina i  $\beta$ -hexosaminidasa en canvi desloratadina només inhibeix histamina.
- Levocetirizina podria tenir cert efecte antagonista del receptor del PAF a dosis elevades a LAD-2.
- PAF podria induir una activació-desgranulació diferencial als mastòcits LAD-2, produint una activació suficient però induint poca alliberament histamina.
- Rupatadina i levocetirizina han demostrat un efecte similar a l'antagonista del PAF CV6209 sobre la inhibició de la desgranulació induïda PAF a LAD-2.
- Rupatadina és l'únic antihistamínic efectiu inhibint la desgranulació als mastòcits de humans de pulmó.

## **CONCLUSIO FINAL**

Els dos projectes portats a terme han demostrat que rupatadina, un antihistamínic amb activitat anti-PAF, té un efecte lleugerament superior a levocetirizina i desloratadina, dos antihistamínics sense activitat anti-PAF, en un model in vivo de provocació nasal amb PAF i en un model in vitro d'estimulació amb PAF en mastòcits humans.

Per una banda hem demostrat que el PAF és capaç d'induir una resposta clínica en un model humà de provocació nasal, fet que ens fa especular sobre la seva possible implicació a la fisiopatologia de la rinitis. El fet que Rupatadina tingui un efecte superior a levocetirizina apunta la possibilitat de que la inhibició de dos mediadors de la inflamació, com histamina i PAF, podria tenir avantatges terapèutiques respecte al bloqueig de només d'un d'ells.

Per una altra banda, tot i que no podem extrapolar els resultats a un context clínic, rupatadina sembla tenir un efecte superior a levocetirizina i desloratadina sobre la desgranulació mastocitària induïda per PAF en un model in vitro amb mastòcits humans.

## Annex

Taula . Símptomes nasals induïts per A avaluats mitjançant l'escala de Likert (-3). Les diferències entre els valors als , , 1 o minuts i els valors basals (-3 i minuts) no van resultar estadísticament significatius. Tampoc es van observar diferències estadísticament significatives entre els voluntaris sans i els pacients amb RAE en cap dels símptomes individuals ni en cap dels temps avaluats. Dades expressades com a mitjana (E).

		-30 min	0 min	60 min	90 min	120 min	240 min
<b>Pruïja nasal</b>	Voluntaris Sans	0	0	0,2 (0,4)	0,3(0,7)	0,3(0,7)	0
	Rinitis Al·lèrgica	0	0,1(0,3)	0,7(0,7)	0,7(0,7)	0,7(0,9)	0,3(0,7)
<b>Rinorrea</b>	Voluntaris Sans	0	0	0,4(0,7)	0,6(0,7)	0,8(0,8)	0,3(0,7)
	Rinitis Al·lèrgica	0	0	0,5(0,5)	0,9(0,7)	1,6(0,7)	0,5(0,7)
<b>Obstrucció nasal</b>	Voluntaris Sans	0,1(0,3)	0,1(0,3)	0,5(0,7)	0,9(0,7)	1,7(0,8)	1(0,94)
	Rinitis Al·lèrgica	0,3(0,5)	0,3(0,5)	0,8(0,8)	1,1(0,9)	1,8(1,0)	1(1,0)
<b>Esternuts</b>	Voluntaris Sans	0	0,2(0,4)	0,3(0,5)	0,5(0,5)	0,3(0,5)	0
	Rinitis Al·lèrgica	0	0	0,6(0,7)	0,5(0,7)	0,7(0,8)	0,1(0,3)



## Bibliografia

---

1. R.M. Naclerio and F. Baroody. Understanding the inflammatory processes in upper allergic airway disease and asthma. *Allergy Clin Immunol*. 1998 101 (2 Pt 2) 345-351.
2. . . Canonica. Introduction to nasal and pulmonary allergy cascade. *Allergy*. 2002 57 ( suppl 75) 8-12.
3. M. . Repka-Ramirez. New concepts of histamine receptors and actions. *Curr Allergy Asthm R*. 2003 3 (3) 227-231.
4. P. Lieberman, . Kemp, . Oppenheimer, D. Lang, . Bernstein, R. Nicklas, . Anderson, D. Bernstein, . Bernstein and . Fink. The diagnosis and management of anaphylaxis An updated practice parameter. *Allergy Clin Immunol*. 2005 115 (3) 483- 523.
5. R. Leurs, M. . Church and M. Aglialatela. 1-antihistamines inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects. *Clin Exp Allergy*. 2002 32 (4) 489-498.
6. F.E. Simons. Advances in 1-antihistamines. *N Engl J Med*. 2004 351 (21) 2203-2217.
7. M. Stuetgen, . Blaser and C.A. Akdis. Histamine in chronic allergic responses. *Investig Allergol Clin Immunol*. 2005 15 (1) 1-8.
8. L.B. Schartz. Diagnostic Value of tryptase in Anaphylaxis and Mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2006 26 (3) 451-463.
9. . Caughey. Tryptase genetics and anaphylaxis. *Allergy Clin Immunol*. 2006 117 (6) 1411-1413.
10. A.B. Soupras, C. Atrou, C. Frangia and C.A. Demopoulos. The implication of platelet activating factor in cancer growth and metastasis potent beneficial role of PAF-inhibitors and antioxidants. *Infect Disord Drug Targets*. 2009 9 (4) 390-399.
11. P. Vadas, M. Gold, B. Perelman, .M. Liss, . Lack, . Blyth, F.E. Simons, . . Simons, D. Cass and . Leung. Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis. *N Engl J Med*. 2008 358 (1) 28-35.
12. C. Gui, . Hu, . Chen, . Luo, . . Lie , C.M. Puah, . Chen and . Jiang. Understanding the regulation mechanisms of PAF receptor by agonists and antagonists Molecular modeling and molecular dynamics simulation studies. *Proteins* 2007 67 (1) 41-52.
13. P. . Booth. Mediators of nasal blockage in allergic rhinitis. *Allergy*. 1997 52 (40 suppl) 12-18.
14. . Shii, . Nagase and . Shimizu. Platelet-activating factor receptor. Prostaglandins Ther Lipid Mediat. 2002 68-69 (Aug) 599-609.
15. M. Ito, . Ito, A. Achibana, . Ayashi, . Suchida and . Imura. Dual Signaling and Effector Pathways Mediate Human Eosinophil Activation by Platelet-Activating Factor. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004 134 ( suppl. 1) 37-43.
16. . Hirasaki, N. Eki, M. Ikuchi, E. Anaizumi, . Atanabe, N. Onno and . Imai. Expression and localization of platelet-activating factor receptor in human nasal mucosa. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2005 95 (2) 190-196.
17. N. Ajiwara, . Asaki, P. Bradding, . Cruse, . Agara, . Hmori, . Aito, C. Ra and . Kayama. Activation of human mast cells through the platelet-activating factor receptor. *Allergy Clin Immunol*. 2010 125 (5) 1137-1145 e1136.
18. . Colly, C. Thomas, B. Benicot, C.E. Dessy-Doiz , F.L. Coignoul and D. Desmecht. Effect of intravenous Platelet-activating Factor on Bovine Pulmonary Mast Cells. *Comp Path*. 2001 125 (2-3) 81-89.

19. Nilsson, D.D. Metcalfe and D.D. Aust. Demonstration that platelet-activating factor is capable of activating mast cells and inducing a chemotactic response. *Immunology*. 2000 99 (2) 314-319.
20. Bousquet, N. Galtaev, A.A. Cruz, Denburg, J. Fokkens, A. Gogias, G. Huber, C.E. Baena-Cagnani, Canonica, C. van Weel, Agache, N. Ait-Hahad, C. Bachert, M. Blaiss, Bonini, L.P. Boulet, P. Bousquet, P. Camargos, Carlsen, Chen, A. Custovic, R. Dahl, P. Demoly, Douagui, R. Durham, R. van Eijk, Galayci, M.A. Ghalibaf, Kim, M.L. Kowalski, P. Linares, L. Li, C. Lemiere, Li, R.F. Lockey, Mavale-Manuel, E. Meltzer, Mohammad, Mullol, R. Naclerio, R.E. Ockene, Ohta, Ouedraogo, Palkonen, N. Papadopoulos, Passalacqua, R. Panigrahi, A. Popov, F. Rabe, Rosado-Pinto, S. Sack, F.E. Simons, E. Skrzypala, E. Valovirta, P. van Cauwenberge, D. Wang, M. Wickman, B.P. Yoon, A. Yorgancioglu, M. Yusuf, Yuzufali, Annesi-Maesano, E.D. Bateman, A. Benhader, D.A. Boakye, Bouchard, P. Burney, Busse, M. Chan-eung, N. Chavannes, A. Chuchalin, Dolan, R. Emuzyte, L. Fouse, M. Humbert, C. Jackson, L. Johnston, P. Keith, P. Kemp, M. Lossek, D. Larenas-Linnemann, B. Lipworth, L. Malo, D. Marshall, C. Naspitz, Nekam, B. Niggemann, E. Nizankowska-Mogilnicka, Okamoto, M.P. Orru, P. Potter, D. Price, Stoloff, Vandenas, Viegi and D. Williams. Allergic Rhinitis and its impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, A(2)LEN and Allergen). *Allergy*. 2008 63 (suppl 86) 8-160.
21. A. Castillo, A. Navarro, Durce, Molina, L. Garcia-Marcos, B. Julia, A. Valero and Mullol. Prevalence and characteristics of rhinitis in adult asthmatic patients attending allergist, primary care and pulmonologist settings in Spain (ARIA study). *Med Clin (Barc)*. 2011 136 (7) 284-289.
22. R. Vinuya. Upper airway disorders and asthma: a syndrome of airway inflammation. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2002 88 (4 suppl 1) 8-15.
23. M. Hite. Mediators of inflammation and the inflammatory process. *Allergy Clin Immunol*. 1999 103 (3 Pt 2) 378-381.
24. R. Naclerio. Clinical manifestations of the release of histamine and other inflammatory mediators. *Allergy Clin Immunol*. 1999 103 (3 Pt 2) 382-385.
25. L. Smit and N.C. Barnes. PAF and asthma--time for an appraisal. *Clin Exp Allergy*. 1995 25 (12) 1159-1162.
26. D.P. Pence, L. Johnston, P.M. Calverley, P. Dhillon, C. Higgins, E. Ramhamadany, Turner, A. Wainman, Winter and Wolgate. The effect of the orally active platelet-activating factor antagonist EB 2086 in the treatment of asthma. *Am Respir Crit Care Med*. 1994 149 (5) 1142-1148.
27. M. Chan-eung, Lam, Chan, Chan and Salari. The release of platelet-activating factor into plasma during allergen-induced bronchoconstriction. *Allergy Clin Immunol*. 1991 87 (3) 667-673.
28. M. Mutel, Blaser and C.A. Akdis. Histamine in allergic inflammation and immune modulation. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005 137 (1) 82-92.
29. R. Henderson, Lu, M. Poole, N. Dietsch and E. Chi. Recombinant human platelet-activating factor-acetylhydrolase inhibits airway inflammation and hyperreactivity in mouse asthma model. *Immunol*. 2000 164 (6) 3360-3367.
30. N.R. Henig, M.L. Aitken, M.C. Liu, A. Lu and R. Henderson. Effect of recombinant human platelet-activating factor-acetylhydrolase on allergen-induced asthmatic responses. *Am Respir Crit Care Med*. 2000 162 (2 Pt 1) 523-527.
31. M. Mizuki, Komatsu, Akiyama, Kane and Suda. Inhibition of eosinophil activation in bronchoalveolar lavage fluid from atopic asthmatics by 24180, an antagonist to platelet-activating factor. *Life Sci*. 1999 65 (20) 2031-2039.

32. . oza a, . aruta, . shioka and M. amakido. Effects of a PAF antagonist, -24180, on bronchial hyperresponsiveness in patients ith asthma. *Am Respir Crit Care Med.* 1995 152 (4 Pt 1) 1198-1202.
33. M. agoshima, N. momatsu, . ahisa, . amaguchi, M. Matsuura, . a akami and M. erasa a. uppressive effects of -24180, a receptor antagonist to platelet activating factor (PAF), on antigen-induced asthmatic responses in guinea pigs. *nflamm Res.* 1997 46 (4) 147-153.
34. L.M. uitert, R.M. Angus, N.C. Barnes, P. . Barnes, M.F. Bone, .F. Chung, A. . Fairfax, . . igenbotham, B. . Connor, B. Piotro ska and et al. Effect of a novel potent platelet-activating factor antagonist, modipafant, in clinical asthma. *Am Respir Crit Care Med.* 1995 151 (5) 1331-1335.
35. V. Alfaro. Role of histamine and platelet-activating factor in allergic rhinitis. *Physiol Biochem.* 2004 60 (2) 101-111.
36. L. ouqui, N. erpin-Richard, R.M. ene, E. ullian, D. Aljabi, C. amberger, B.B. Vargaftig and .F. Dessange. Excretion of platelet activating factor-acetylhydrolase and phospholipase A2 into nasal fluids after allergenic challenge possible role in the regulation of platelet activating factor release. *Allergy Clin mmunol.* 1994 94 (1) 109-119.
37. . lementsson and M. Andersson. Eosinophil chemotactic activity of topical PAF on the human nasal mucosa. *Eur Clin Pharmacol.* 1992 42 (3) 295-299.
38. A. edeschi, N. Milazzo and A. Miadonna. Nasal eosinophilia induced by PAF-acether is accompanied by the release of eosinophil cationic protein. *Eur Respir .* 1994 7 (8) 1445-1451.
39. A. edeschi, . Palumbo, N. Milazzo and A. Miadonna. Nasal neutrophilia and eosinophilia induced by challenge ith platelet activating factor. *Allergy Clin mmunol.* 1994 93 (2) 526-533.
40. A. Miadonna, N. Milazzo, M. Lorini, A. ala and A. edeschi. Nasal neutrophilia and release of myeloperoxidase induced by nasal challenge ith platelet activating factor different degrees of responsiveness in atopic and nonatopic subjects. *Allergy Clin mmunol.* 1996 97 (4) 947-954.
41. C.E. Austin and .C. Foreman. he effect of platelet-activating factor on the responsiveness of the human nasal air ay. *Br Pharmacol.* 1993 110 (1) 113-118.
42. D. . Albert, P.E. Malo, P. apang, . . haughnessy, D. . Morgan, C.D. egnier, M.L. Curtin, . . heppard, L. u, . . Davidsen, .B. ummers and . . Carter. he role of platelet-activating factor (PAF) and the efficacy of AB -491, a highly potent and selective PAF antagonist, in experimental allergic rhinitis. *Pharmacol Exp her.* 1998 284 (1) 83-88.
43. M. Misa a and . amura. Platelet-activating factor (PAF)-induced rhinitis and involvement of PAF in allergic rhinitis in guinea pigs. *apanese journal of pharmacology.* 1990 54 (2) 217-226.
44. .A. ampson, A. Mu oz-Furlong, R.L. Campbell, N.F. Adkinson, .A. Bock, A. Branum, . .A. Bro n, C.A. Camargo, R. Cydulka, . . alli, . idudu, R. . ruchalla, A.D. arlor, D.L. epner, L.M. Le is, P.L. Lieberman, D.D. Metcalfe, R. Connor, A. Muraro, A. Rudman, C. chmitt, D. cherrer, F.E.R. imons, . homas, .P. ood and . . Decker. econd symposium on the definition and management of anaphylaxis ummary report econd National nstitute of Allergy and nfectious Disease Food Allergy and Anaphylaxis Net ork symposium. *Allergy Clin mmunol.* 2006 117 (2) 391-397.
45. . . ohansson, . Bieber, R. Dahl, P. . Friedmann, B. . Lanier, R.F. Lockey, C. Motala, .A. rtega Martell, .A. Platts-Mills, . Ring, F. hien, P. Van Cau enberge and .C. illiams. Revised nomenclature for allergy for global use Report of the Nomenclature Revie Committee of the orld Allergy rganization, ctober 2003. *Allergy Clin mmunol.* 2004 113 (5) 832-836.

46. F.E. Simons. Anaphylaxis, killer allergy long-term management in the community. *Allergy Clin Immunol*. 2006 117 (2) 367-377.
47. P. Lieberman, C.A. Camargo, Jr., J. Bohlke, J. Dick, R.L. Miller, A. Sheikh and F.E. Simons. Epidemiology of anaphylaxis findings of the American College of Allergy, Asthma and Immunology Epidemiology of Anaphylaxis Working Group. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006 97 (5) 596-602.
48. L.M. Webb and P. Lieberman. Anaphylaxis a review of 601 cases. 2006 97 (1) 39-43.
49. B. Pereira, C. Venter, J. Grundy, C.B. Clayton, J. Arshad and J. Dean. Prevalence of sensitization to food allergens, reported adverse reaction to foods, food avoidance, and food hypersensitivity among teenagers. *Allergy Clin Immunol*. 2005 116 (4) 884-892.
50. R. Trait, J.C. Morris, M. Wang, J. Wu and F.D. Finkelman. Pathways of anaphylaxis in the mouse. *Allergy Clin Immunol*. 2002 109 (4) 658-668.
51. T. Erashita, T. Mura, A. Hino and T. Nishikawa. A lethal role of platelet activating factor in anaphylactic shock in mice. *Pharmacol Exp Ther*. 1987 243 (1) 378-383.
52. T. Hibamoto, J. Liu, J. Cui, J. Hang, T. Akano and T. Urata. PAF, rather than histamine, participates in mouse anaphylactic hypotension. *Pharmacology*. 2008 82 (2) 114-120.
53. R. Trait, J.C. Morris and F.D. Finkelman. IgE-blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis in vivo through both antigen interception and Fc gamma R1b cross-linking. *Clin Invest*. 2006 116 (3) 833-841.
54. F.D. Finkelman. Anaphylaxis Lessons from mouse models. *Allergy Clin Immunol*. 2007 120 (3) 506-515.
55. J. Arias, M. Baig, M. Colangelo, D. Chu, J. Walker, J. Koncharova, A. Coyle, P. Vadas, J. Caserman and M. Jordana. Concurrent blockade of platelet-activating factor and histamine prevents life-threatening peanut-induced anaphylactic reactions. *Allergy Clin Immunol*. 2009 124 (2) 307-314.e302.
56. A. Sheikh, V. ten Broek, J. A. Bron and F.E.R. Simons. 1-antihistamines for the treatment of anaphylaxis Cochrane systematic review. *Allergy*. 2007 62 (8) 830-837.
57. F.E.R. Simons and J. Simons. Histamine and 1-antihistamines Celebrating a century of progress. *Allergy Clin Immunol*. 2011 128 (6) 1139-1150.e1134.
58. F.M. Baroody and R.M. Naclerio. Antiallergic effects of 1-receptor antagonists. *Allergy*. 2000 55 suppl 64 17-27.
59. M.E. Weinstein, A. J. Wolff and L. Bielory. Efficacy and tolerability of second- and third-generation antihistamines in the treatment of acquired cold urticaria a meta-analysis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2010 104 (6) 518-522.
60. J. Bousquet, C. Bachert, J. Canonica, J. Mullol, P. Van Cauwenberge, C. Bindslev Jensen, J. Fokkens, J. Ring, P. Keith, R. Lorber and J. Uberbier. Efficacy of desloratadine in intermittent allergic rhinitis a A(2)LEN study. *Allergy*. 2009 64 (10) 1516-1523.
61. A. Valero, J. Izquierdo, J. Miralt, J. Bartra, A. del Cuvillo and J. Mullol. Rupatadine improves nasal symptoms, quality of life (E PR N -15) and severity in a subanalysis of a cohort of Spanish allergic rhinitis patients. *Investig Allergol Clin Immunol*. 2011 21 (3) 229-235.
62. C. Colas, J. Alera, B. Anibarro, R. Coler, A. Navarro, J. Auregui and A. Pelaez. Disease severity impairs sleep quality in allergic rhinitis (the MN AAR study). *Clin Exp Allergy*. 2012 42 (7) 1080-1087.
63. E. J. Meltzer. Do use or not to use antihistamines in patients with asthma. *Ann Allergy*. 1990 64 (2 Pt 2) 183-186.

64. . . olgate and .P. Finnerty. Antihistamines in asthma. *Allergy Clin Immunol.* 1989 83 (2 Pt 2) 537-547.
65. . ch arzer, D. Bassler, A. Mitra, F.M. Ducharme and . Forster. cetotifen alone or as additional medication for long-term control of asthma and heeze in children. *Cochrane Database yst Rev.* 2004 (1) CD001384.
66. F.E. imons. Prospective, long-term safety evaluation of the 1-receptor antagonist cetirizine in very young children ith atopic dermatitis. *E AC tudy roup. Early reatment of the Atopic Child.* *Allergy Clin Immunol.* 1999 104 (2 Pt 1) 433-440.
67. A. . Be tra, R. . opp, N.M. Nair and R. . o nley. Effect of terfenadine on cold air-induced bronchospasm. *Ann Allergy.* 1989 62 (4) 299-301.
68. D.P. ashkin, A. Brik and . ong, r. Cetirizine inhibition of histamine-induced bronchospasm. *Ann Allergy.* 1987 59 (6 Pt 2) 49-52.
69. A. Cistero, M. Abadias, R. Lleonart, V. Lafuente, E. Pinto, . orrent and F. ane. Effect of astemizole on allergic asthma. *Ann Allergy.* 1992 69 (2) 123-127.
70. . uerra, D.L. herrill, F.D. Martinez and R.A. Barbee. Rhinitis as an independent risk factor for adult-onset asthma. *Allergy Clin Immunol.* 2002 109 (3) 419-425.
71. . Ciprandi, . Cirillo, M.A. osca and A. Vizzaccaro. Bronchial hyperreactivity and spirometric impairment in patients ith perennial allergic rhinitis. *nt Arch Allergy Immunol.* 2004 133 (1) 14-18.
72. . Crystal-Peters, C. Neslusan, . . Cro n and A. orres. reating allergic rhinitis in patients ith comorbid asthma the risk of asthma-related hospitalizations and emergency department visits. *Allergy Clin Immunol.* 2002 109 (1) 57-62.
73. . Corren, B.E. Manning, .F. hompson, . ennessy and B.L. trom. Rhinitis therapy and the prevention of hospital care for asthma a case-control study. *Allergy Clin Immunol.* 2004 113 (3) 415-419.
74. F.E. imons. First-aid treatment of anaphylaxis to food focus on epinephrine. *Allergy Clin Immunol.* 2004 113 (5) 837-844.
75. F.E. imons. orld Allergy rganization survey on global availability of essentials for the assessment and management of anaphylaxis by allergy-immunology specialists in health care settings. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2010 104 (5) 405-412.
76. .L. inbery and P.L. Lieberman. istamine and antihistamines in anaphylaxis. *Clin Allergy Immunol.* 2002 17 287-317.
77. E.B. Brandt, R. . trait, D. ershko, . ang, E.E. Muntel, .A. cribner, N. immermann, F.D. Finkelman and M.E. Rothenberg. Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea. *Clin nvest.* 2003 112 (11) 1666-1677.
78. M. Merlos, M. iral, D. Balsa, R. Ferrando, M. ueralt, A. Puigdemont, . arcia-Rafanell and . Forn. Rupatadine, a ne potent, orally active dual antagonist of histamine and platelet-activating factor (PAF). *Pharmacol Exp her.* 1997 280 (1) 114-121.
79. L.M. uitert, .P. ui, . Uthayarkumar, . Burke, A.C. Ne land, . Uden and N.C. Barnes. Effect of the platelet-activating factor antagonist U -74,505 on the early and late response to allergen. *Am Resp Rev Dis.* 1993 147 (1) 82-86.
80. .C. Lohman and M. alonen. he effects of combined histamine and platelet-activating factor antagonism on systemic anaphylaxis induced by immunoglobulin E in the rabbit. *Am Resp Rev Dis.* 1993 147 (5) 1223-1228.
81. . amura, . akishima, . Mue, . Makino, . toh, . Miyamoto, . hida and . Nakajima. Effect of a potent platelet-activating factor antagonist, EB-2086, on asthma. A multicenter, double-blind placebo-controlled study in apan. *Adv Exp Med Biol.* 1996 416 371-380.

82. L. Emeny, V. Rach and A. Dobozy. Effect of locally applied EB 2086, a platelet-activating factor antagonist, on inflammatory skin conditions in mice. *Arch Dermatol Res.* 1996 288 (8) 492-494.
83. D. Dupre, C. Thompson, J. Chen, J. Rollin, J.-F. Larrivée, C.L. Couill, M. Rola-Pleszczynski and J. Tankov. Inverse agonist-induced signaling and down-regulation of the platelet-activating factor receptor. *Cellular Signalling.* 2007 19 (10) 2068-2079.
84. D. Dupre, C. Le Couill, M. Rola-Pleszczynski and J. Tankova. Inverse agonist activity of selected ligands of platelet-activating factor receptor. *Pharmacol Exp Ther.* 2001 299 (1) 358-365.
85. A. Teichert, P.N. Dubbin, J. Harris and J. Dusting. Platelet-activating factor may act as a second messenger in the release of eicosanoids and superoxide anions from leukocytes and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 87 (8) 3215-3219.
86. J. Casals-Ruiz and J. Guerrer. Use of EB 2086 and EB 2170 as platelet-activating factor antagonists. *Methods in enzymology.* 1990 187 455-465.
87. A.M. Northover and B. Northover. Degranulation of rat omental mast cells by A(1) receptor agonists in vitro. *Mediators Inflamm.* 1996 5 (5) 341-345.
88. J.F. Wei, J.L. Wei, J. Mo and J. Lee. Induction of mast cell accumulation, histamine release and skin edema by N49 phospholipase A2. *BMC Immunol.* 2009 28 (10) 21.
89. J. Uehara, A. Uehara, R. Moqbel and A.B. Kay. Inhibition of platelet-activating factor (PAF)-induced chemotaxis and PAF binding to human eosinophils and neutrophils by the specific ginkgolide-derived PAF antagonist, BN 52021. *Allergy Clin Immunol.* 1989 83 (1) 83-90.
90. F. Bonin, J.D. Ryan, L. Migahed, F. Mo, J. Lallier, D. Franks, J. Arai and J.A.L. Bennett. Anti-apoptotic Actions of the Platelet-activating Factor Acetylhydrolase 2 Catalytic Subunit. *Bio Chem.* 2004 279 (50) 52425-52436.
91. J. Terashita, J. Mura, M. Akatani, J. Sushima and J. Nishikawa. CV-6209, a highly potent antagonist of platelet activating factor in vitro and in vivo. *Pharmacol Exp Ther.* 1987 242 (1) 263-268.
92. J. Zquierdo, M. Merlos and J. Garcia-Rafanell. Rupatadine: a new selective histamine H1 receptor and platelet-activating factor (PAF) antagonist. A review of pharmacological profile and clinical management of allergic rhinitis. *Drugs Today (Barc).* 2003 39 (6) 451-468.
93. M. Ueralt, M. Merlos, M. Miral and A. Puigdemont. Dual effect of a new compound, rupatadine, on edema induced by platelet-activating factor and histamine in dogs: Comparison with antihistamines and PAF antagonists. *Drug Dev Res.* 1996 7 (1) 7.
94. P. Tuebner, F. Horak, R. Dieglmayer, E. Arnaiz, C. Leuratti, J. Perez and J. Zquierdo. Effects of rupatadine vs placebo on allergen-induced symptoms in patients exposed to aeroallergens in the Vienna Challenge Chamber. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2006 96 (1) 37-44.
95. C. Picado. Rupatadine: pharmacological profile and its use in the treatment of allergic disorders. *Expert opinion on pharmacotherapy.* 2006 7 (14) 1989-2001.
96. F. Sain-Martin, J.P. Dumur, J. Perez and J. Zquierdo. A randomized, double-blind, parallel-group study, comparing the efficacy and safety of rupatadine (20 and 10 mg), a new PAF and H1 receptor-specific histamine antagonist, to loratadine 10 mg in the treatment of seasonal allergic rhinitis. *Investig Allergol Clin Immunol.* 2004 14 (1) 34-40.
97. J. Mullol, J. Bousquet, C. Bachert, J. Canonica, A. Gimenez-Arnau, M.L. Górecki, E. Marti-Lladano, M. Maurer, C. Picado, J. Cadding and P. Van

Caulenberg. Rupatadine in allergic rhinitis and chronic urticaria. *Allergy*. 2008 63 (suppl 87) 5-28.

98. M. Vasiadi, D. Aligeromitos, D. Kempuraj, A. Clemons, B. Chang, C. Chliva, M. Makris, A. Wolfberg, M. House and J.C. Theoharides. Rupatadine inhibits Proinflammatory Mediator secretion from human Mast Cells triggered by Different stimuli. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010 151 (1) 38-45.

99. M. Merlos, D. Balsa and M. Miral. Inhibition of rat peritoneal mast cell exocytosis by rupatadine fumarate a study with different secretagogues. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1997 (suppl. A) 148.

100. M. Ueralt, P. Brazis, M. Merlos, F. de Mora and A. Puigdemont. In vitro inhibitory effect of rupatadine on histamine and TNF- $\alpha$  release from dispersed canine skin mast cells and the human mast cell line MC-1. *Inflamm Res*. 2000 49 (7) 355-360.

101. M. Merlos, M. Miral and D. Balsa. Rupatadine inhibits the eosinophil recruitment in BAL fluid of ovalbumin-sensitized guinea pigs. *Allergy Clin Immunol*. 1998 abstract n 904.

102. J. Barron, J. Ramis and M. Merlos. Effect of rupatadine on lymphocyte cytokine production. *Allergy Clin Immunol Int*. 2005 abstract n 1175.

103. J. Canonica, F. Barantini, E. Compalati and M. Penagos. Efficacy of desloratadine in the treatment of allergic rhinitis a meta-analysis of randomized, double-blind, controlled trials. *Allergy*. 2007 62 (4) 359-366.

104. J. Chang, J. Schach, A. Harris, J. Reutner, A.F. Daly and J. J. J. J. J. J. J. J. J. J. J. J. J. J. Desloratadine prevents compound 48/80-induced mast cell degranulation visualization using a vital fluorescent dye technique. *Allergy*. 2005 60 (1) 117-124.

105. J. Keller and M. Maurer. Desloratadine inhibits human skin mast cell activation and histamine release. *Invest Dermatol*. 2009 129 (11) 2723-2726.

106. M.L. Góralski, A. Leandowska, J. Ozniak, J. Makońska, A. Ankońska and L. DuBuske. Inhibition of nasal polyp mast cell and eosinophil activation by desloratadine. *Allergy*. 2005 60 (1) 80-85.

107. J. Hao, P.C. Leung, J. Gao, J. Chen, J. Gong, J. Liu and C.A. Bassett. Inhibitory effects of budesonide, desloratadine and dexamethasone on cytokine release from human mast cell line (MC-1). *Inflammation Research*. 2004 53 (12) 664-669.

108. J. Schroeder, R.P. Schleimer, L.M. Lichtenstein and J. Reutner. Inhibition of cytokine generation and mediator release by human basophils treated with desloratadine. *Clin Exp Allergy*. 2001 31 (9) 1369-1377.

109. D. Singh-Franco, J. Lin, J. Robles, N. Borjesson and A. Perez. Levocetirizine for the treatment of allergic rhinitis and chronic idiopathic urticaria in adults and children. *Clin Ther*. 2009 31 (8) 1664-1687.

110. J.A. Rant, J.M. Riethuisen, B. Moulart and C. DeVos. A double-blind, randomized, single-dose, crossover comparison of levocetirizine with ebastine, fexofenadine, loratadine, mizolastine, and placebo suppression of histamine-induced wheal-and-flare response during 24 hours in healthy male subjects. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2002 88 (2) 190-197.

111. J.A. Popov, D. Dumitrascu, A. Bachvarova, C. Bocsan, V. Dimitrov and M. Church. A comparison of levocetirizine and desloratadine in the histamine-induced wheal and flare response in human skin in vivo. *Inflamm Res*. 2006 55 (6) 241-244.

112. A. Arppinen, J. Brummer-Orvenkontio, L. Petman, J. Autiainen, J. Perve and J. Reunala. Levocetirizine for treatment of immediate and delayed mosquito bite reactions. *Acta dermato-venereologica*. 2006 86 (4) 329-331.

113. P.C. Potter. Levocetirizine is effective for symptom relief including nasal congestion in adolescent and adult (PAR) sensitized to house dust mites. *Allergy*. 2003 58 (9) 893-899.

114. C. Bachert, . Bousquet, . . Canonica, .R. Durham, L. limek, . Mullol, P.B. Van Cau enberge and . Van ammee. Levocetirizine improves quality of life and reduces costs in long-term management of persistent allergic rhinitis. *Allergy Clin Immunol.* 2004 114 (4) 838-844.
115. . Ciprandi, . Cirillo, A. Vizzaccaro, E. Civardi, . Barberi, M. Allen and .L. Marseglia. Desloratadine and levocetirizine improve nasal symptoms, airflow, and allergic inflammation in patients with perennial allergic rhinitis a pilot study. *Int Immunopharmacol.* 2005 5 (13-14) 1800-1808.
116. M. Ciebiada, M. orska-Ciebiada, L.M. DuBuske and P. orski. Montelukast with desloratadine or levocetirizine for the treatment of persistent allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2006 97 (5) 664-671.
117. . . Canonica, F. Fumagalli, L. uerra, . Baiardini, E. Compalati, A. Rogkakou, P. Massacane, C. amalero, A.M. Riccio, A. cordamaglia and . Passalacqua. Levocetirizine in persistent allergic rhinitis continuous or on-demand use A pilot study. *Current medical research and opinion.* 2008 24 (10) 2829-2839.
118. M.L. Barnes, . . ard, .C. Fardon and B. . Lip orth. Effects of levocetirizine as add-on therapy to fluticasone in seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy.* 2006 36 (5) 676-684.
119. . Mullol, F. de Borja Callejas, M.A. Martinez-Anton, E. Mendez-Arancibia, . Alobid, L. Pujols, A. Valero, C. Picado and . Roca-Ferrer. Mometasone and desloratadine additive effect on eosinophil survival and cytokine secretion from epithelial cells. *Respir Res.* 2011 12 23.
120. L. homson, M. . Blaylock, D. . exton, A. Campbell and .M. alsh. Cetirizine and levocetirizine inhibit eotaxin-induced eosinophil transendothelial migration through human dermal or lung microvascular endothelial cells. *Clin Exp Allergy.* 2002 32 (8) 1187-1192.
121. . asala, M. anka- unttila, E. Moilanen and . ankaanranta. Levocetirizine and cytokine production and apoptosis of human eosinophils. *Allergy Asthma Proc.* 2007 28 (5) 582-591.
122. A. Menzies- o , . ing, . Phipps and A.B. ay. Interactions between eotaxin, histamine and mast cells in early microvascular events associated with eosinophil recruitment to the site of allergic skin reactions in humans. *Clin Exp Allergy.* 2004 34 (8) 1276-1282.
123. L. Petecchia, L. erpero, M. ilvestri, F. abatini, L. carso and .A. Rossi. The histamine-induced enhanced expression of vascular cell adhesion molecule-1 by nasal polyp-derived fibroblasts is inhibited by levocetirizine. *Am Rhinol.* 2006 20 (5) 445-449.
124. P. u, . Mitchell and .M. alsh. A new antihistamine levocetirizine inhibits eosinophil adhesion to vascular cell adhesion molecule-1 under flow conditions. *Clin Exp Allergy.* 2005 35 (8) 1073-1079.
125. A. Uzzaman, D.D. Metcalfe and .D. omaro . Acoustic rhinometry in the practice of allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2006 97 (6) 745-751 quiz 751-742, 799.
126. R. Munoz-Cano, R. alvador, A. Valero, . Berenguer, . Alobid, . Bartra, .M. uilemany, . Mullol and C. Picado. Accuracy of acoustic rhinometry versus computed tomography in the evaluation of nasal cavity in patients with nasal polyposis. *Rhinology.* 2010 48 (2) 224-227.
127. . . cadding, .C. Darby and C.E. Austin. Acoustic rhinometry compared with anterior rhinomanometry in the assessment of the response to nasal allergen challenge. *Clin otaryngol Allied ci.* 1994 19 (5) 451-454.
128. . Casadevall, P. . Ventura, . Mullol and C. Picado. Intranasal challenge with aspirin in the diagnosis of aspirin intolerant asthma evaluation of nasal response by acoustic rhinometry. *Laryngol.* 2000 55 (11) 921-924.



129. E. Leggieri, A. Fedeschi, M. Lorini, A. Bianco and A. Miadonna. Study of the effects of paf-acether on human nasal air ways. *Allergy*. 1991 46 (6) 466-471.
130. Schuhl, M. Babina, A. Neou, Schuberbier and M. Artuc. Mast cell lines MC-1 and LAD2 in comparison with mature human skin mast cells - drastically reduced levels of tryptase and chymase in mast cell lines. *Exp Dermatol*. 2010 19 (9) 845-847.
131. Mulka and D.D. Metcalfe. Isolation of tissue mast cells. *Curr Protoc Immunol*. 2010 Chapter 7 (Unit 7 ) 1.
132. Narahara, Tanaka, Tanano, Miyakawa and Johnston. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in human follicular fluid. *Adv Exp Med Biol*. 1996 416 121-127.
133. Lechartz, R.A. Lewis, D. Feldin and J.F. Austen. Acid hydrolases and tryptase from secretory granules of dispersed human lung mast cells. *Immunol*. 1981 126 (4) 1290-1294.
134. Strober. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*. 2001 Appendix 3 Appendix 3B.
135. Jaergaard, M. Cvancarova and Steinsvag. Nasal congestion index A measure for nasal obstruction. *Laryngoscope*. 2009 119 (8) 1628-1632.
136. A. Valero, C. Ferrano, Bartra, Quijerto, R. Munoz-Cano, Mullo and C. Picado. Reduction of nasal volume after allergen-induced rhinitis in patients treated with rupatadine a randomized, cross-over, double-blind, placebo-controlled study. *Investig Allergol Clin Immunol*. 2009 19 (6) 488-493.
137. A. Asporska-ajac, Brzoza and B. Rogala. Platelet activating factor as a mediator and therapeutic approach in bronchial asthma. *Inflammation*. 2008 31 (2) 112-120.
138. B.F. Marple. Allergic rhinitis and inflammatory air way disease interactions within the unified airspace. *Am Rhinol Allergy*. 2010 24 (4) 249-254.
139. M. Urosawa, Yamashita and F. Urimoto. Increased levels of blood platelet-activating factor in bronchial asthmatic patients with active symptoms. *Allergy*. 1994 49 (1) 60-63.
140. A. Asporska-ajac, Brzoza and B. Rogala. Platelet-activating factor (PAF) a review of its role in asthma and clinical efficacy of PAF antagonists in the disease therapy. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2008 2 (1) 72-76.
141. M. Agoshima, N. Tomomatsu, Tahisa, Yamaguchi, Takakami and M. Terasawa. Effect of -24180, a long-acting antagonist to platelet-activating factor (PAF), on PAF-induced reactions a relationship between the partial structure of the compound and its duration of the action. *Pharmacology*. 1997 54 (5) 261-270.
142. C. Centemeri, Colli, D. Cosarello, P. Ciceri and Nicosia. Heterogeneous platelet-activating factor (PAF) receptors and calcium increase in platelets and macrophages. *Biochem Pharmacol*. 1999 57 (3) 263-271.
143. A.M. Dvorak. Mast cell secretory granules and lipid bodies contain the necessary machinery important for the in situ synthesis of proteins. *Chem Immunol Allergy*. 2005 85 252-315.
144. Cheaharides, P. Bondy, N.D. Sakalos and P. Askenase. Differential release of serotonin and histamine from mast cells. *Nature*. 1982 297 (5863) 229-231.
145. D. McCurdy, Lynych, L. Maher and Marshall. Cutting edge distinct toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. *Immunol*. 2003 170 (4) 1625-1629.
146. R. Maiti, Aida, B.N. Raghavendra, P. Poud, Ahmed and A. Palani. Rupatadine and levocetirizine in chronic idiopathic urticaria a comparative study of efficacy and safety. *Drugs Dermatol*. 2011 10 (12) 1444-1450.

147. R. Maiti, . Rahman, . aida, U. Allala and A. Palani. Rupatadine and levocetirizine for seasonal allergic rhinitis a comparative study of efficacy and safety. *Arch otolaryngol.* 2010 136 (8) 796-800.
148. R. . trait, A. Mahler, . ogan, M. hodoun, A. hibuya and F.D. Finkelman. Ingested allergens must be absorbed systemically to induce systemic anaphylaxis. *Allergy Clin Immunol.* 2011 127 (4) 982-989 e981.
149. A. Valero, R. Munoz-Cano, .astre, A.M. Navarro, E. Marti- uadano, . Davila, A. Del Cuvillo, C. Colas, . Antepará, . zquierdo and . Mullol. The impact of allergic rhinitis on symptoms, and quality of life using the new criterion of AR A severity classification. *Rhinology.* 2012 50 (1) 33-36.