

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE INMUNOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y ESTUDIO DE
ALGUNAS CARACTERÍSTICAS DEL LAVADO BRONCOALVEOLAR EN UN
MODELO EXPERIMENTAL MURINO DE OBSTRUCCIÓN RECURRENTE
DE LAS VÍAS AÉREAS**

Memoria de Título presentada como parte de
los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO.

GONZALO PATRICIO OJEDA BARRÍA

VALDIVIA – CHILE

2008

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Hugo Folch Vilches
Nombre

Firma

PROFESOR COPATROCIANTE

Dr. Gabriel Morán Ruz
Nombre

Firma

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. Enrique Paredes Herbach
Nombre

Firma

Dr. Juan Galecio Naranjo
Nombre

Firma

FECHA DE APROBACIÓN

11 de Marzo de 2008

ÍNDICE

Capítulo	Página
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
5. RESULTADOS.....	12
6. DISCUSIÓN.....	19
7. BIBLIOGRAFÍA.....	23

1. RESUMEN

El objetivo principal del presente estudio, fue montar un modelo experimental murino de Obstrucción Recurrente de las Vías Aéreas (ORVA), que permita estudiar este importante cuadro respiratorio, frecuente en los equinos estabulados, induciendo esta patología en ratones expuestos a las esporas de *Aspergillus fumigatus*. Para ello se utilizaron ratones de la cepa Rockefeller, empleándose como antígenos, extractos solubles de proteína de *A. fumigatus* para la inmunización y las pruebas de ELISA, además de heno de alfalfa contaminado con esporas de este hongo con el fin de ser usado como cama durante la exposición experimental de los ratones.

En este estudio se realizaron cuatro diseños experimentales, el primero tendiente a determinar el porcentajes de neutrófilos, linfocitos, mastocitos y macrófagos del recuento celular diferencial del lavado broncoalveolar (LBA) de ratones normales. Otros dos, dirigidos respectivamente a evaluar en ratones normales y en animales previamente inmunizados, el efecto del tiempo de exposición a las esporas de *A. fumigatus* en los niveles de anticuerpos específicos y la condición de las vías aéreas, y finalmente, un diseño que permitiera evaluar en ratones previamente inmunizados el efecto de la exposición a heno con distintos grados de contaminación de esporas del hongo. Cuando correspondió, y de acuerdo al diseño experimental, fueron obtenidas muestras individuales de suero y LBA, cuantificándose través de ELISA los niveles de IgE, IgG1 e IgG2a, además del porcentaje de neutrófilos del LBA. Los resultados del estudio demuestran que el LBA de ratones no inmunizados expuestos a las esporas de *A. fumigatus* presentaron aumentos significativos del porcentaje de neutrófilos a los 23 días de exposición, en contraste con lo encontrado en ratones previamente inmunizados, en los que este aumento se hace significativo a los 5 días de exposición. Con respecto a las inmunoglobulinas séricas y del LBA cuantificadas, los resultados de este estudio permiten indicar que la exposición a las esporas en animales normales, sólo evidenció aumentos significativos en los niveles séricos de IgE específicos a *A. fumigatus*, no observándose aumentos significativos de otras inmunoglobulinas. Por último se determinó que ratones inmunizados en forma parenteral, la exposición a las esporas de *A. fumigatus*, produce aumentos significativos en los niveles de IgE específicos contra este hongo tanto en el LBA como en el suero.

Estos resultados permiten concluir que la exposición de ratones a las esporas de *A. fumigatus*, favorece el desarrollo de una respuesta inmunológica de similares características a la de los equinos con ORVA, con compromiso del árbol respiratorio, por lo que éste modelo podría ser utilizado en el futuro para investigar esta importante patología de los equinos.

Palabras clave: ORVA, modelo murino, *Aspergillus fumigatus*, alergia.

2. SUMMARY

EVALUATION OF THE HUMORAL IMMUNE RESPONSE AND STUDY OF SOME CHARACTERISTICS OF BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID IN AN EXPERIMENTAL MURINE MODEL OF THE EQUINE RECURRENT AIRWAY OBSTRUCTION

The main objective of this study, was to set up a murine experimental model for the equine Recurrent Airway Obstruction (RAO) in order to be able to study this important respiratory disease, common in stabled horses. For this purpose previously immunized or non immunized Rockefeller mice were exposed to *Aspergillus fumigatus* spores. The specific immunoglobulins in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was determined by ELISA at different times of the fungus exposure and the predominant cells type of the BALF also was recorded. We used four experimental designs in order to reach objectives: a) first the cell type recovered from the BALF of normal mice were determined, b) non immunized or c) immunized mice were exposed for different periods of time to *A. fumigatus* spores and d) the effect of the spores amount in the bed was determined.

The results indicate that the predominant cell in normal mice BALF were macrophages, with an average 0.63% of neutrophils, non immunized mice exposed to the fungus spores show an important increase of BALF neutrophils at day 23, this effect is possible to observe in immunized mice only after 5 day of fungus exposure. To obtains these results were important that the amount of spores in the bed during exposure were high. With respect to the humoral response, the level of BALF and serum specific immunoglobulins, the results indicate that the fungus exposure induce increase of seric IgE levels in non previously immunized mice exposed to the fungus, in immunized mice, on the other hand, an increase of IgE in serum as well as in BALF could be demonstrated.

This results aloud us to conclude that it is posible to reproduce in mice a condition similar at the RAO seen in horses, and that this model can be used to further explore this equine disease.

Keywords: RAO, murine model, *Aspergillus fumigatus*, allergy.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. ANTECEDENTES

La obstrucción recurrente de las vías aéreas (ORVA), es una enfermedad respiratoria alérgica de los equinos, resultado de un proceso inflamatorio producido por la inhalación de alérgenos, caracterizada por inflamación de las vías aéreas, acumulación de mucus y obstrucción reversible producto de una hipersensibilidad bronquial (Jackson y col 2000). Clínicamente se caracteriza por disnea, tos seca, doble espiración abdominal y descarga nasal, la que a menudo es mucopurulenta debido a infecciones bacterianas secundarias (Araya 1999). En casos en que la patología se prolonga por varios meses, se puede evidenciar la “línea del esfuerzo”, producida por la hipertrofia de los músculos rectoabdominales en un intento de ayudar a la espiración (Araya 1999). En ciertos equinos no se aprecia una signología clínica importante y sólo es posible observar un menor rendimiento en la capacidad atlética del animal (Art y col 1998, Eder y col 2000).

Las causas que originan el ORVA son múltiples, existiendo factores predisponentes relacionados con las características ambientales que permiten el desarrollo y presencia de los antígenos desencadenantes del cuadro, como los son la ventilación, características de las pesebreras, paja de la cama, polvo ambiental, microorganismos y material de construcción de las pesebreras. También existen factores predisponentes propios del animal, como infecciones respiratorias virales previas y presencia de parásitos pulmonares (Araya 1999). Por otro lado, la predisposición genética se ha sugerido en varios reportes (Gerberg 1989).

Los agentes etiológicos causante de esta enfermedad son variados, dentro de los cuales se menciona a *Faenia rectivirgula* y *Thermoactinomyces vulgaris* como bacterias capaces de inducir hipersensibilidad (MacGorum y Dixon 1994). Por su parte, los ácaros del polvo que se alimentan de las esporas de los hongos, constituyen un importante factor en el desarrollo de la enfermedad (Clarke y Madelin 1987). Las condiciones de estabulación referidas especialmente a la ventilación de los establos, también juegan un papel preponderante en la presentación del cuadro alérgico pulmonar (Araya 1999), pero son sin duda las esporas de *Aspergillus fumigatus* los principales agentes etiológicos inductores de este cuadro alérgico (Araya 1999). Éste agente es un hongo cosmopolita, saprofítico que forma parte de la micota ambiental y juega un rol esencial en el reciclaje ambiental del carbón y del nitrógeno (Haines 1995). Taxonómicamente *Aspergillus fumigatus* se encuentra posicionado en el phylum *Ascomycota*, clase *Euascmycetes*, orden *Eurotiales*, familia *Trichocomaceae* (Pontón y col 2002). Sobrevive y crece en una gran variedad de restos orgánicos, siendo su nicho ecológico natural el suelo o la tierra. Aunque esta especie de hongo no es la más prevalente en el mundo, es uno de los más ubicuos de aquellos con conidias aero transportadas (Nolard 1994). Con respecto a ello, *Aspergillus fumigatus* lleva a cabo un proceso abundante de esporulación produciendo miles de conidias. Las conidias liberadas a la atmósfera tienen un diámetro aproximado de 2 a 3 μm . Al no poseer un mecanismo elaborado para la diseminación o liberación de sus conidias

al aire, ésta simplemente se da por los disturbios en el ambiente y por corrientes de aire (Goodley y col 1994). Pese a esto, el pequeño tamaño de su conidia, le otorga una importante facilidad de suspensión en el ambiente por largos periodos (Abarca 2000). Por su parte, la inhalación de las conidias por individuos inmunocompetentes raramente tiene un efecto adverso, dado que son eliminadas de forma relativamente eficaz por mecanismos innatos del sistema inmune (Latgé 1999).

Dentro de las reacciones que juegan un rol fundamental en la etiopatogenia del ORVA se encuentran las reacciones de hipersensibilidad broncopulmonar de tipo I, mediadas en parte importante por inmunoglobulina de la clase IgE, responsable clásica de la hipersensibilidad inmediata. La IgE se une a las células cebadas y basófilos por medio de su Fc a receptores específicos ubicados en la membrana de estas células (FceRI), las que al ser estimuladas por efecto del antígeno específico, liberan al medio extracelular mediadores bioactivos que inducen el desarrollo de la inflamación alérgica (Mekori y Matcalfe 1999). La IgE es una inmunoglobulina termolábil con una estructura convencional de cuatro cadenas, su cadena pesada contiene 4 regiones C_H y un dominio V_H, lo que le da un peso molecular aproximado de 200 kDa (Tizard 1998). Otro mecanismo que opera en la etiopatogenia del ORVA son las reacciones de hipersensibilidad de tipo III, la cual es responsable de la bronquiolitis neutrofílica originada por la formación de complejos antígenos-anticuerpo y la subsecuente activación de la cascada del complemento que genera C5a y C3a, péptidos quimiotácticos para polimorfos nucleares neutrófilos, causando por esta vía la característica acumulación de neutrófilos en el árbol bronquial, presente siempre en esta enfermedad (Lavoie y col 2000). Finalmente se encuentran las células T y otras células inflamatorias que también juegan un rol importante en la modulación de la respuesta inmune responsable de la patogenia de esta enfermedad (Lavoie y col 2000).

Con respecto al diagnóstico de este cuadro se menciona que el más difundido y utilizado para la identificación de caballos con ORVA es el lavado broncoalveolar (LBA). Técnica implementada por Viel en Canadá en 1980 (Moran y col 2006) que desde entonces se ha hecho muy popular por su simplicidad y bajo costo, además de ser una importante herramienta que permite la diferenciación entre enfermedades pulmonares infecciosas y alérgicas (Moore y Cox 1996). En el caso de animales sanos, la citología del LBA revela un predominio de macrófagos alveolares, linfocitos, células cebadas, pudiéndose encontrar también pequeñas cantidades de células epiteliales bronquiales ciliadas y no ciliadas, algunos neutrófilos y eosinófilos (McGorum y Dixon 1994). Por el contrario, en animales que presentan la enfermedad de forma clínica se encuentra un aumento del porcentaje de neutrófilos y en menor grado de eosinófilos y mastocitos, revelando de esta forma la importancia de los neutrófilos en el diagnóstico de esta patología (Robinson 2001).

La reducción de la exposición a los agentes etiológicos es de gran ayuda para el control y la prevención del ORVA, pero en los casos en que se presenta el cuadro clínico, la administración sistémica de glucocorticoides, como la dexametasona mejora la funcionalidad pulmonar y reduce el número de neutrófilos en el LBA (Rush y col 1998). Otros fármacos utilizados son la prednisolona y la triamcinolona, los cuales también producen una mejora en la funcionalidad pulmonar (Robinson 2001), pero sin duda, en la actualidad, el principal

tratamiento utilizado corresponde la administración de glucocorticoides aerolizados, los cuales resultan ser muy efectivos para tratamiento del ORVA (Varner y Busse 1996). La combinación terapéutica de broncodilatadores con glucocorticoides es apropiada en aquellos caballos que presenten ORVA moderado a severo, siendo los broncodilatadores la primera línea de terapéutica de emergencia para aliviar la obstrucción severa (Rush y col 1998). Otra alternativa existente, pero menos utilizada, es el uso de fármacos anticolinérgicos como la atropina y el ipatropium, así como también los agonistas α_2 -adrenérgicos como la xilacina, detomidina y romifidina, además de los estabilizadores de células cebadas, los cuales pueden ser de utilidad para contrarrestar y prevenir la broncoconstricción (Hare y col 1994).

La importancia de esta patología invita a la elaboración de distintos diseños de investigación, es así que la implementación de un modelo experimental de ORVA en ratones representa una nueva posibilidad de estudio de esta patología, permitiendo de esta forma la evaluación de los actuales tratamientos que existe para el ORVA, así como la ejecución de investigaciones futuras que apunten entre otras cosas al estudio de las citoquinas y poblaciones celulares involucradas en este cuadro respiratorio, además de la evaluación de la modificación del cuadro clínico con diferentes esquemas terapéuticos, entre otros.

3.2. HIPÓTESIS

Es posible inducir en la especie murina, un cuadro de características inmunológicas similares al ORVA equino, que permita su utilización como modelo experimental de esta patología.

3.3. OBJETIVOS DEL TRABAJO

3.3.1. Objetivo general

- Evaluar la respuesta inmune humoral y algunas características del lavado broncoalveolar en un modelo experimental murino de Obstrucción Recurrente de las Vías Aéreas.

3.3.2. Objetivos específicos

- Determinar si es posible la inducción de este cuadro respiratorio en ratones expuestos a las esporas de *Aspergillus fumigatus*.
- Establecer si la inmunización previa facilita la presentación del cuadro.
- Evaluar si la cantidad de esporas representa un factor importante en la presentación del cuadro respiratorio.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. ANIMALES

Para el presente estudio se utilizaron ratones (*Mus musculus*) de la cepa Rockefeller, obtenidos en el Bioterio del Instituto de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile. Estos animales tenían un peso aproximado de 40 gramos, siendo mantenidos en cajas transparentes de 31 cm de largo, 20 cm de ancho y 10 cm de alto. Cada una de las cajas poseía cama de viruta o heno seco que contenía en su interior entre 7 a 8 ratones, siendo mantenidos a una temperatura ambiental aproximada de 20°C con 10 horas de luz y 14 de oscuridad. Tanto la entrega de alimento como la de agua fue *ad libitum*.

La utilización de los animales del presente estudio y los procedimientos realizados en ellos, fueron aprobados por la comisión de Bioética de la Universidad Austral de Chile.

4.2. ANTÍGENO

Como antígeno se utilizaron en los diversos experimentos extracto de proteínas de *Aspergillus fumigatus* o esporas del hongo presentes en el heno de alfalfa de la cama. Para obtener la proteína, el crecimiento del *Aspergillus* se dividió en dos partes: cultivo en agar peptona por 7 días a 23°C y luego cultivo en suspensión en caldo malta por otros 7 días a 23°C. La extracción de proteína se basó en el método descrito por Céspedes y col (2000). Para esto, los microorganismos se cosecharon por centrifugación y se fijaron con etanol¹ al 60% por 24 horas. Luego, los microorganismos se centrifugaron por 10 minutos a 12.500 g, se eliminó el sobrenadante y se incubó en una solución salina hipertónica 1M NaCl, 0.1 M citrato de sodio y 0,5 mM de EDTA² por 24 horas a 4°C. Posteriormente, los microorganismos fueron sonicados³ durante 20 minutos a 90 W, las células desintegradas se centrifugaron a 25.000g por 30 minutos y el sobrenadante, que contenía las proteínas solubles, se dializó contra Buffer Fosfato Salino (PBS) por 2 días. Posteriormente, las proteínas obtenidas se concentraron mediante el uso de Speed Vac SC 110⁴ y fueron cuantificadas por el método Bradford (Bradford 1976), conservándose a -20°C hasta su utilización.

Para obtener heno contaminado con esporas de *Aspergillus fumigatus*, tanto éstas, como los micelios del hongo obtenidos del cultivo en suspensión en caldo malta fueron recuperados en forma manual, siendo luego diluidos en agua destilada a temperatura ambiente. Posterior a ello, utilizando un aspersor manual fueron realizadas cuatro aspersiones a 300 gramos de heno de alfalfa (*Medicago sativa*) obtenido del Hospital Clínico Veterinario de la

¹ Etanol (Merck)

² EDTA (Sigma Chemical Co.)

³ Ultrasonic Homogenizer, Serie 4710 (Cole Parmer, USA)

⁴ Speed Vac SC 110 (Savant)

Universidad Austral de Chile, el cual fue previamente esterilizado en autoclave⁵ por 25 minutos a 1 atmósfera de presión. El procedimiento de aspersión fue realizado en una habitación aislada del Bioterio, cuyo ingreso era efectuado con mascarillas que poseían filtro respiratorio⁶. Finalmente el heno fue incubado en bolsas de plástico en una estufa⁷ a 23°C por 10 días.

La cuantificación de las esporas de *Aspergillus fumigatus* en el heno de alfalfa se realizó mediante el método descrito por Araya y Zaror (1995), utilizando un muestreador manual de Burkard. Un portaobjeto cubierto con una gota de la siguiente preparación fue empleada para cada muestra: 5 g de gelatina, 4 g de fenol, 40 ml de glicerina, 15 ml de agua destilada y 0,01% tintura de safranina. Las muestras de heno (100 g aprox.) fueron puestas en una bolsa de plástico, agitadas y el muestreador puesto en la boca de la bolsa por 3 a 5 segundos. Luego, el portaobjeto fue removido y examinado al microscopio óptico de luz⁸, utilizando un aumento de 100X, tras lo cual las muestras fueron clasificadas en las siguientes categorías (Clarke y Madelin 1987).

- I. Menos de 5 esporas por campo.
- II. Entre 5 y 10 esporas por campo.
- III. Más de 10 esporas por campo.

Todo este procedimiento fue realizado en una habitación aislada del Bioterio y utilizando una mascarilla con filtro respiratorio.

4.3. DETERMINACIÓN DE LOS PORCENTAJES DE LAS CÉLULAS DE LA ESTIRPE HEMATOPOYÉTICA PRESENTES EN EL RECUENTO CELULAR DIFERENCIAL DEL LBA DE RATONES NORMALES

Para determinar los porcentajes de neutrófilos, macrófagos, linfocitos y mastocitos que se encuentran en el recuento celular diferencial del LBA murino, se tomaron muestras individuales de LBA de una población de 45 ratones normales. En dichos animales se cuantificó individualmente el porcentaje de cada una de las poblaciones celulares en estudio de un total de 200 células, calculándose posteriormente los promedios de dichos porcentajes.

4.4. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A LAS ESPORAS DE *ASPERGILLUS FUMIGATUS* EN RATONES NORMALES

En este diseño experimental se utilizaron cinco grupos de ocho ratones normales. Cuatro de los grupos fueron expuestos por distintos periodos a camas de heno con esporas de *Aspergillus fumigatus*, el grupo restante, que es el control, fue colocado en una cama de heno estéril en la cual no habían sido cultivadas las esporas del hongo. Luego, uno de los grupos

⁵ Autoclave (Webeco BI 46330)

⁶ Filtro Respiratorio FR-PT (Proseg)

⁷ Estufa (Memmert Tv4Ou 316135)

⁸ Microscopio Óptico de Luz (Olympus CX31)

expuestos y el grupo control fueron sacrificados a los 7 días de exposición a las esporas, posteriormente, a los 11, 17 y 23 días de exposición, fueron sacrificados respectivamente los grupos restantes. En el momento del sacrificio se obtuvieron en todos los grupos muestras individuales de sangre y LBA, realizándose el recuento celular diferencial del LBA y la medición de los valores séricos y del LBA de IgE, IgG1 e IgG2a.

4.5. EFECTO DEL TIEMPO DE EXPOSICIÓN A LAS ESPORAS DE *ASPERGILLUS FUMIGATUS* EN RATONES PREVIAMENTE INMUNIZADOS CON ESTE ANTÍGENO

En esta serie experimental se utilizaron ocho grupos de ocho ratones, cuya inmunización de siete de los grupos se basó en la inoculación subcutánea los días 0 y 10 con 50 µg de extracto proteico de *Aspergillus fumigatus* al cual se le adicionó 2 mg de hidróxido de aluminio⁹ como coadyuvante para favorecer la respuesta inmune humoral. El desafío mediante cama contaminada con esporas de *Aspergillus fumigatus* de los siete grupos inmunizados, se realizó a partir del día 18, prolongándose por diferentes periodos, siendo cambiadas las camas cada 6-7 días con el fin de mantener una carga de esporas homogénea. El grupo restante, que es el control no fue inmunizado ni desafiado con las esporas del hongo.

El sacrificio de los grupos inmunizados fue realizado a las 6 horas, 24 horas, 5 días, 7 días, 11 días, 17 días y 23 días de exposición a las esporas del hongo. El control fue sacrificado junto con el primer grupo experimental. Este diseño fue repetido en tres ocasiones de manera continua, en cada uno de dichos experimentos se efectuó el recuento diferencial de células del LBA, así como la medición de los valores séricos y del LBA de IgE, IgG1 e IgG2a.

4.6. EFECTO DE LA CANTIDAD DE ESPORAS EN LA INDUCCIÓN DEL CUADRO DE ORVA EN RATONES PREVIAMENTE INMUNIZADOS Y EXPUESTOS POR 7 DÍAS A HENO CON DISTINTOS GRADOS DE CONTAMINACIÓN POR *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

En este experimento se utilizaron cuatro grupos de ocho ratones, los cuales al igual que el diseño experimental anterior fueron inmunizados vía subcutánea los días 0 y 10 con 50 µg de extracto proteico de *Aspergillus fumigatus* al que se le adicionó 2 mg de hidróxido de aluminio. El desafío con las esporas de *Aspergillus fumigatus* fue realizado el día 18, exponiéndolos a heno con distintos grados de contaminación con esporas de este hongo. Existiendo de esta forma un grupo con heno libre de esporas, y tres grupos que según su cantidad de esporas fueron clasificados en las categorías I, II y III. El tiempo de exposición de los grupos al heno contaminado fue de 7 días, tras los cual fueron sacrificados, siendo obtenidas muestras individuales de LBA, cuantificándose en ellas el porcentaje de neutrófilos del recuento celular diferencial y los niveles de IgE, IgG1 e IgG2a.

⁹ Aluminio Hidróxido Gel (Laboratorio Maver S.A.)

4.7. OBTENCIÓN, PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

4.7.1. Obtención de sueros

Las muestras de sangre fueron obtenidas *in vivo* a través de una incisión realizada con un bisturí en la vena coccígea, para luego ser depositadas de forma individual en tubos Eppendorf de 500 μ l. Dichas muestras fueron centrifugadas por 3 minutos a 690g tras lo cual fue extraído el suero que fue guardado a -20°C , para ser luego sometido a la técnica de Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) para determinar IgE, IgG1 e IgG2a.

4.7.2. Eutanasia de los ratones

Para el sacrificio de los animales se elaboró una solución de anestesia que contenía 0,8 gramos de pentobarbital¹⁰ 0,5 ml de etanol absoluto¹¹, 1 ml de 1,2-propilenglicol¹², 3,5 ml de agua destilada y 45 ml de suero fisiológico, siendo administrada una dosis de 500 μ l vía intraperitoneal utilizando una jeringa hipodérmica con una aguja de 25G x 5/8¹³.

4.7.3. Obtención del lavado broncoalveolar

El lavado broncoalveolar fue realizado por vía trans-traqueal y con el animal previamente sacrificado utilizando el método de eutanasia señalado anteriormente. El procedimiento de obtención comienza con una incisión cutánea en forma de ojal de unos 25 mm de longitud realizada con una tijera de disección a través de la línea media ventral, comenzando 10 mm caudal a la punta de la nariz. Esta acción permite la visualización de las glándulas salivales, las cuales son desplazadas cranealmente con el fin de exponer la tráquea, luego, bajo ella, es colocada una pinza de disección que permite una mejor visualización de la estructura antes señalada. Expuesta la tráquea, se procedió a retirar el esófago de manera de visualizar de mejor forma los anillos traqueales. En seguida, se utilizó un catéter intravenoso de 22G x 1¼¹⁴, el cual fue introducido entre los anillos traqueales en dirección caudal, dirigiendo la aguja en un ángulo de 10-30° con el bisel dispuesto hacia arriba hasta penetrar al lumen traqueal, posteriormente se debe reducir el ángulo para evitar traspasar esta estructura. Inmediatamente se avanza el catéter y se retira simultáneamente la aguja guía. El catéter debe ser introducido alrededor de 10 mm en el interior de la tráquea, luego de lo cual se administró con una jeringa 500 μ l de NaCl al 0,9% a temperatura ambiente, recuperando inmediatamente la solución administrada. Para facilitar esta última acción es posible realizar una suave presión a nivel pulmonar al mismo tiempo que es aspirado el líquido administrado, luego, las muestras fueron depositadas en tubos Eppendorf de 500 μ l siendo procesadas inmediatamente.

Las muestras de lavado broncoalveolar obtenidas fueron centrifugadas¹⁵ por 30 segundos a 690g, recuperándose el sobrenadante y siendo almacenados a -20°C . Por otro lado, el “pellet” celular fue resuspendido en PBS, colocándolo en portaobjetos individuales para luego ser secados y teñido con tinción May-Grünwald-Giemsa. Para realizar dicha tinción se

¹⁰ Nembutal Pharm (Serva)

¹¹ Etanol Absoluto (Merck)

¹² Propandiol-(1,2) (Merck)

¹³ Jeringa Hipodérmica con Aguja 25G x 5/8 (BD Plastipak)

¹⁴ Catéter Intravenoso 22G x 1¼ IN (Nipro)

¹⁵ Zentrifuge 3200

debió cubrir las preparaciones con 1-3 gotas de eosina-azul de metileno en solución según May-Grünwald modificada¹⁶ durante 2 minutos, para luego volcar y lavar. Inmediatamente se procedió a preparar una solución acuosa de colorante Giemsa¹⁷ a razón de 1,5 gotas por cada ml de buffer fosfato. Con esta solución se cubrieron las preparaciones durante 3 minutos tras lo cual se lavaron con agua y secaron.

El montaje de la muestra se realizó utilizando un medio histológico de montaje¹⁸. Posterior a ello, se realizó el recuento diferencial de células, para el cual se empleó un microscopio óptico de luz, cuantificándose el porcentaje de neutrófilos, macrófagos, linfocitos y mastocitos de un total de 200 células utilizándose un aumento de 1000X.

4.7.4. Prueba de ELISA en lavado broncoalveolar y suero

Para la determinación de los niveles tanto séricos como del LBA de IgG1, IgG2a e IgE se utilizó la prueba de ELISA indirecto. Para ello, en una primera etapa se cubrieron los pocillos de la placa de ELISA con 100 µl de proteína soluble de *Aspergillus fumigatus* (1 µg por pocillo) diluido en buffer carbonato pH 9,5, finalizado este paso, la placa fue incubada toda la noche a 4°C. Luego, cada uno de los pocillos fue lavado 3 veces con 300 µl de PBS pH 7,0 al 0,05% de Tween 20. Posterior a ello, se procedió a bloquear la placa con 200 µl de PBS pH 7,0 con 5% de leche descremada por pocillo, incubando a temperatura ambiente por una hora, para luego nuevamente lavar 3 veces con la solución de lavado antes mencionada. Inmediatamente después de realizada esta última acción, se preparó la dilución de los sueros o fluidos del lavado broncoalveolar utilizándose un volumen de 100 µl por pocillo, siendo la placa incubada por 1 hora a 37°C para luego lavar nuevamente 3 veces. Luego fue agregado en cada pocillo 100 µl de un segundo Anticuerpo Anti IgG1¹⁹ de ratón en cabra conjugado a peroxidasa, para la determinación de IgG1, Anticuerpo Anti IgG2a²⁰ de ratón en cabra conjugado a peroxidasa para la determinación de IgG2a y Anticuerpo Anti-IgE²¹ de ratón en cabra para IgE en dilución 1:2000 para IgG1 e IgG2a y de 1:500 para IgE. Luego las placas se incubaron por una hora a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se lavó nuevamente 3 veces. Luego, sólo para la determinación de IgE se procedió a agregar en cada pocillo 100 µl de un tercer Anticuerpo Anti IgG²² de cabra en conejo conjugado Peroxidasa diluido 1:500, incubando por una hora a temperatura ambiente para luego lavar nuevamente 3 veces. Más tarde y para todos los ELISA se agregaron 100 µl de Sustrato o-Phenylenediamine dihydrochloride²³ (OPD) por pocillo, incubando las placas por 30 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad. Luego se agregaron 50 µl de H₂SO₄ 2,5 M a cada pocillo para detener la reacción y finalmente leer la absorbancia a 450 nm.

¹⁶ Eosina-azul de metileno en solución según May-Grünwald modificada (Merck).

¹⁷ Azur-eosina-azul de metileno según Giemsa (Merck).

¹⁸ Permout (Fisher Scientific).

¹⁹ Peroxidase-conjugated affinityPure Goat Anti-Mouse IgG Fc_γ Subclass 1 Specific (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.).

²⁰ Peroxidase-conjugated affinityPure Goat Anti-Mouse IgG, Fc_γ Subclass 2a Specific (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.).

²¹ Anti-Mouse IgE (Goat), liquid epsilon Chain (N Biomedicals, Inc.).

²² Peroxidase Conjugated Affinity Purified Anti-Goat IgG (Rabbit) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.).

²³ o-Phenylenediamine (1,2-benzenediamine) dihydrochloride (Sigma).

4.7.5. Análisis estadístico

Para este estudio, se determinó tanto la normalidad de los datos obtenidos del ELISA en suero y en LBA, como los porcentajes de neutrófilos en los distintos grupos. Cuando los datos analizados se distribuyeron normalmente, los resultados se interpretaron con pruebas inferenciales paramétricas como el análisis de varianza (ANDEVA) y cuando este indicó que existían diferencias se utilizó Tukey's Multiple Comparison Test.

Cuando los datos analizados no se distribuyeron normalmente, estos fueron interpretados con pruebas inferenciales no paramétricas como la prueba de Kruskal-Wallis, cuando esta prueba indicó que existían diferencias, se utilizó Dunn's Multiple Comparison Test.

En los distintos grupos $P < 0.05$ fue considerado como significativo. Todos cálculos estadísticos se realizaron con el programa computacional Graphpad Prism[®] versión 5.00.288²⁴.

²⁴ Graphpad Prism versión 5.00.288 (Graphpad Software Inc.).

5. RESULTADOS

5.1. PORCENTAJES DE LAS CÉLULAS DE LA ESTIRPE HEMATOPOYÉTICAS PRESENTES EN EL RECUENTO CELULAR DIFERENCIAL DEL LBA DE RATONES NORMALES

Como se mencionó con anterioridad, para determinar los porcentajes neutrófilos, macrófagos, linfocitos y mastocitos encontrados en el lavado broncoalveolar se tomaron muestras individuales de LBA de una población de 45 ratones normales. Los porcentajes determinados para neutrófilos, linfocitos, mastocitos y macrófagos en el recuento celular diferencial del LBA se indican en la tabla 1.

Tabla 1. Porcentajes promedios de neutrófilos, linfocitos, mastocitos y macrófagos presentes en el recuento celular diferencial del LBA de la población murina evaluada.

Tipo Celular	Promedio (%)
Neutrófilos	0,63
Linfocitos	0,40
Mastocitos	1,13
Macrófagos	97,85

5.2. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A LAS ESPORAS DE *ASPERGILLUS FUMIGATUS* EN RATONES NORMALES

En este experimento se utilizaron cinco grupos de ocho ratones normales, cuatro de los cuales fueron puestos en camas de heno con esporas de *Aspergillus fumigatus*, el grupo control fue colocado en heno estéril en el cual no habían sido cultivadas las esporas del hongo. Uno de los grupos expuestos y el grupo control fueron sacrificados a los 7 días de exposición a las esporas, posteriormente, a los 11, 17 y 23 días de exposición, fueron sacrificados los restantes grupos. Los resultados de este experimento se señalan a continuación.

5.2.1. Efecto de la exposición a las esporas de *Aspergillus fumigatus* en el porcentaje de neutrófilos del recuento celular diferencial del LBA de ratones normales

El gráfico 1 señala el porcentajes de neutrófilos encontrados en el LBA del grupo control y de los grupos expuestos por diferentes periodos a las esporas de *Aspergillus fumigatus*. En él se puede observar que sólo en el grupo expuesto por 23 días se aprecia un aumento significativo del porcentaje de neutrófilos del recuento celular diferencial del LBA.

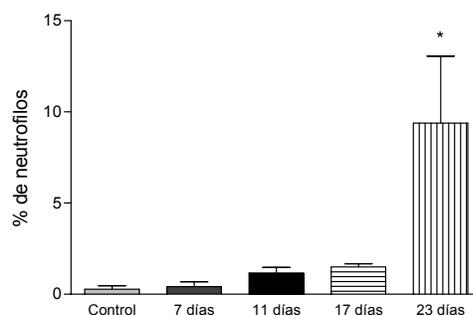


Gráfico 1. Resultados del recuento celular diferencial que indica el porcentaje de neutrófilos del LBA del grupo control y los grupos expuestos por diferentes periodos a las esporas de *Aspergillus fumigatus*.*($P < 0,05$) Diferencias significativas con respecto al grupo control.

5.2.2. Efecto de la exposición a las esporas de *Aspergillus fumigatus* en los niveles de inmunoglobulinas específicas del LBA de ratones normales

En el gráfico 2a que muestra los niveles de IgE específicos a *Aspergillus fumigatus* encontrados en el LBA del control y de los grupos expuestos por diferentes periodos, no se observan diferencias estadísticas con respecto al control en ninguno de los grupos, aún cuando se aprecia un pequeño aumento constante a medida que transcurre el tiempo de exposición.

En relación a los niveles de IgG1 encontrados en el LBA, representados en el gráfico 2b, se observa que no existen diferencias significativas con respecto al control en ninguno de los grupos inmunizados, mismo fenómeno presente en el gráfico 2c, que indica los niveles de IgG2a específicos a *Aspergillus fumigatus* presentes en el LBA.

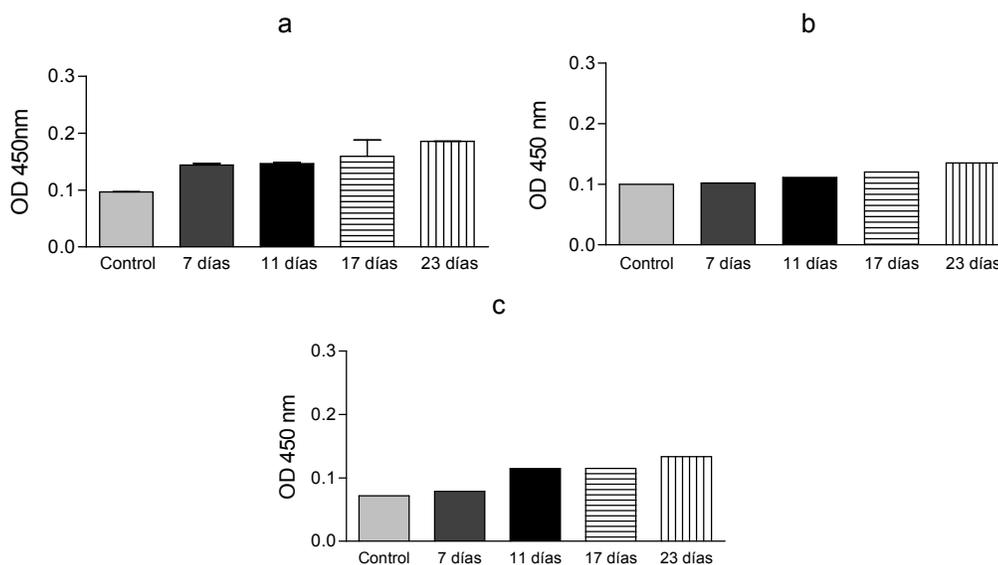


Gráfico 2. Niveles de IgE (a), IgG1 (b) e IgG2a (c) específicos a *Aspergillus fumigatus* encontrados en el LBA (1:1) del grupo control y los grupos expuestos por diferentes periodos a las esporas de *Aspergillus fumigatus*. Valores del ELISA representados por la densidad óptica (OD) a 450nm.

5.2.3. Efecto de la exposición a las esporas de *Aspergillus fumigatus* en los niveles séricos de inmunoglobulinas específicas de ratones normales

En relación a los niveles de IgE específicos a *Aspergillus fumigatus* encontrados en el suero indicados en el gráfico 3a, sólo es posible observar diferencias significativas con respecto al control en el grupo expuesto por 23 días a las esporas. Por su parte, tanto en los niveles séricos de IgG1 como en los de IgG2a representados respectivamente en los gráficos 3b y 3c, no se evidenciaron diferencias significativas con respecto al control en ninguno de los grupos.

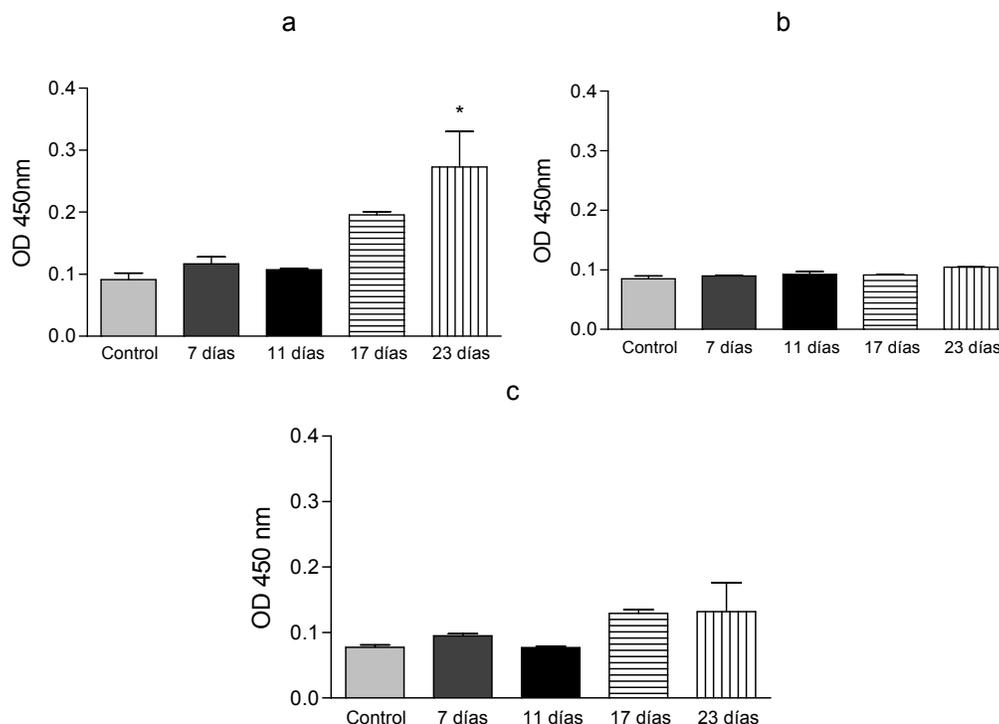


Gráfico 3. Niveles de IgE (a), IgG1 (b) e IgG2a (c) específicos a *Aspergillus fumigatus* encontrados en el suero (1:100) del grupo control y los grupos expuestos por diferentes periodos a las esporas de *Aspergillus fumigatus*. Valores del ELISA representados por la densidad óptica (OD) a 450nm. *($P < 0,05$) Diferencias significativas con respecto al grupo control.

5.3. EFECTO DEL TIEMPO DE EXPOSICIÓN A LAS ESPORAS DE *ASPERGILLUS FUMIGATUS* EN RATONES PREVIAMENTE INMUNIZADOS CON ÉSTE ANTÍGENO

En esta serie experimental se utilizaron ocho grupos de ocho ratones, siete de los cuales fueron inmunizados con extracto proteico de *Aspergillus fumigatus*. El desafío mediante cama contaminada de siete de los ocho grupos inmunizados se realizó a partir del día 18, el grupo restante que es el control no fue inmunizado ni desafiado con las esporas del hongo.

El sacrificio de los grupos inmunizados fue realizado a las 6 horas, 24 horas, 5 días, 7 días, 11 días, 17 días y 23 días de exposición a las esporas, el control fue sacrificado junto con el primer grupo experimental. Los resultados de este diseño se señalan a continuación.

5.3.1. Efecto del tiempo de exposición a las esporas de *Aspergillus fumigatus* en el porcentaje de neutrófilos del recuento celular diferencial del LBA en ratones previamente inmunizados.

En el gráfico 4 se muestra el porcentaje de neutrófilos presentes en el LBA de ratones inmunizados y expuestos a diferentes periodos a las esporas de *Aspergillus fumigatus*. Aquí se puede observar que recién a los 5 días de exposición a las esporas del hongo, se aprecia un incremento significativo del porcentaje de neutrófilos, incremento que se hace aún mayor a los 7 días post exposición, no pudiéndose observar desde este momento en adelante un aumento mayor en el porcentaje de neutrófilos.

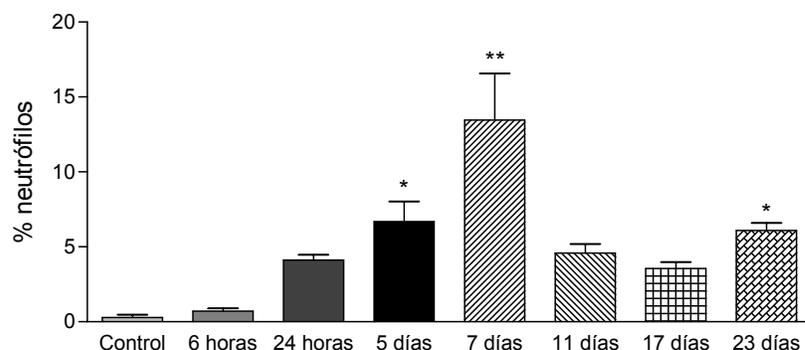


Gráfico 4. Resultados del recuento celular diferencial que indica el porcentaje de neutrófilos presentes en el LBA de ratones inmunizados y expuestos por diferentes periodos a las esporas de *Aspergillus fumigatus*.*(P<0,05) **(P<0,01) Diferencias significativas con respecto al grupo control.

5.3.2. Efecto del tiempo de exposición a las esporas de *Aspergillus fumigatus* en los niveles de inmunoglobulinas específicas del LBA en ratones previamente inmunizados.

En el gráfico 5a, que muestra los valores de IgE específicos a *Aspergillus fumigatus* encontrados en el LBA, se puede apreciar que a partir de los 5 días de exposición existen diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, diferencias que se ven incrementadas a los 7 días post exposición, no observándose diferencias significativas con respecto al control en los grupos expuestos por 11, 17 y 23 días.

Por su parte, en el gráfico 5b que muestra los niveles de IgG1 específicos a *Aspergillus fumigatus* encontrados en el LBA, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en ninguno de los grupos.

Finalmente, el gráfico 5c indica los niveles de IgG2a específicos a *Aspergillus fumigatus* encontrados en el LBA, en él sólo se observan diferencias significativas con respecto al control en los grupos expuestos por 7 y 11 días a las esporas de *Aspergillus fumigatus*.

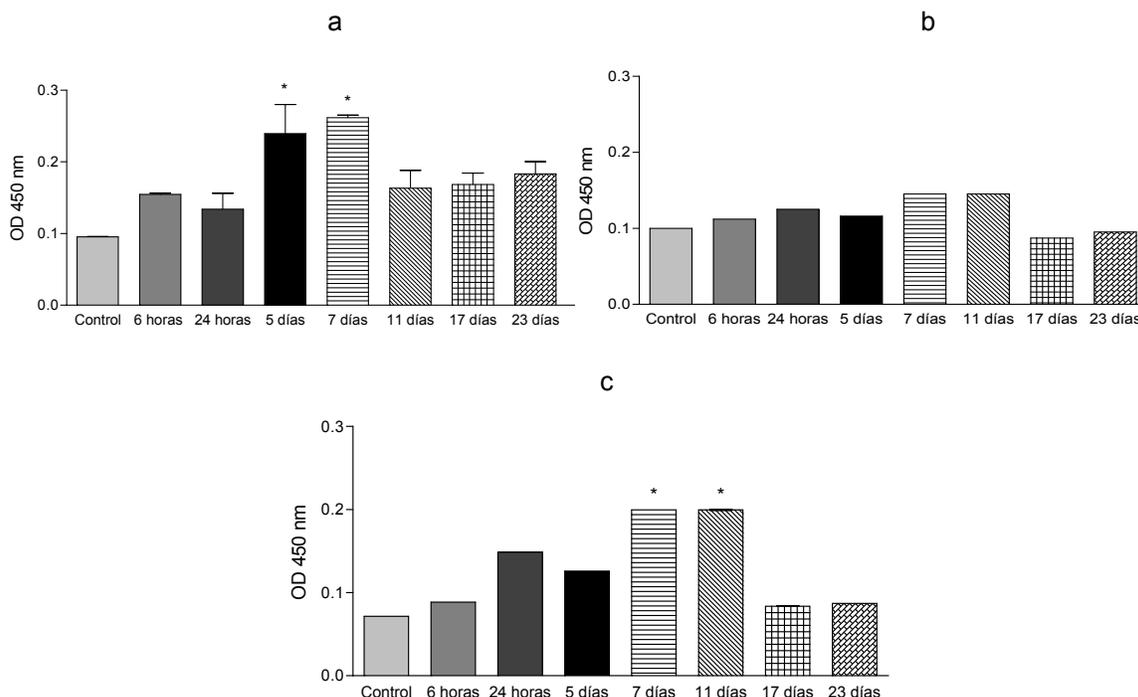


Gráfico 5. Valores de IgE (a), IgG1 (b) e IgG2a (c) específicos a *Aspergillus fumigatus* encontrados en el LBA (1:1) de ratones inmunizados y expuestos por diferentes periodos a las esporas de *Aspergillus fumigatus*. Valores del ELISA representados por la densidad óptica (OD) a 450nm. *($P < 0,05$) Diferencias significativas con respecto al grupo control.

5.3.3. Efecto del tiempo de exposición a esporas de *Aspergillus fumigatus* en los niveles séricos de inmunoglobulinas específicas en ratones previamente inmunizados.

El gráfico 6a muestra los niveles séricos de IgE específicos a *Aspergillus fumigatus*, en él se observan diferencias estadísticamente significativas con respecto al control sólo a partir del las 24 horas de exposición, apreciándose un aumento aún mayor a los 7 días post exposición y luego incrementos significativo a los 17 y 23 días, no observándose diferencias significativas con respecto al control en los grupos expuestos por 6 horas, 5 y 11 días.

En relación a los niveles séricos de IgG1 indicados en el grafico 6b, es posible apreciar que existen diferencias significativas con respecto al grupo control sólo en los grupos expuestos por 5, 7 y 17 días, mostrando a su vez los dos primeros diferencias significativas con respecto al grupos expuesto por 17 días.

Finalmente el grafico 6c muestra los niveles séricos de IgG2a específicos a *Aspergillus fumigatus*. En él es posible observar que los grupos expuestos por 5, 7 y 17 días a las esporas evidenciaron aumentos significativos en los niveles de esta inmunoglobulina con respecto al grupo control, siendo el grupo expuesto por 7 días el que alcanzó los mayores niveles de IgG2a, fenómeno que también fue posible de observar en la cuantificación de los niveles séricos de IgE e IgG1.

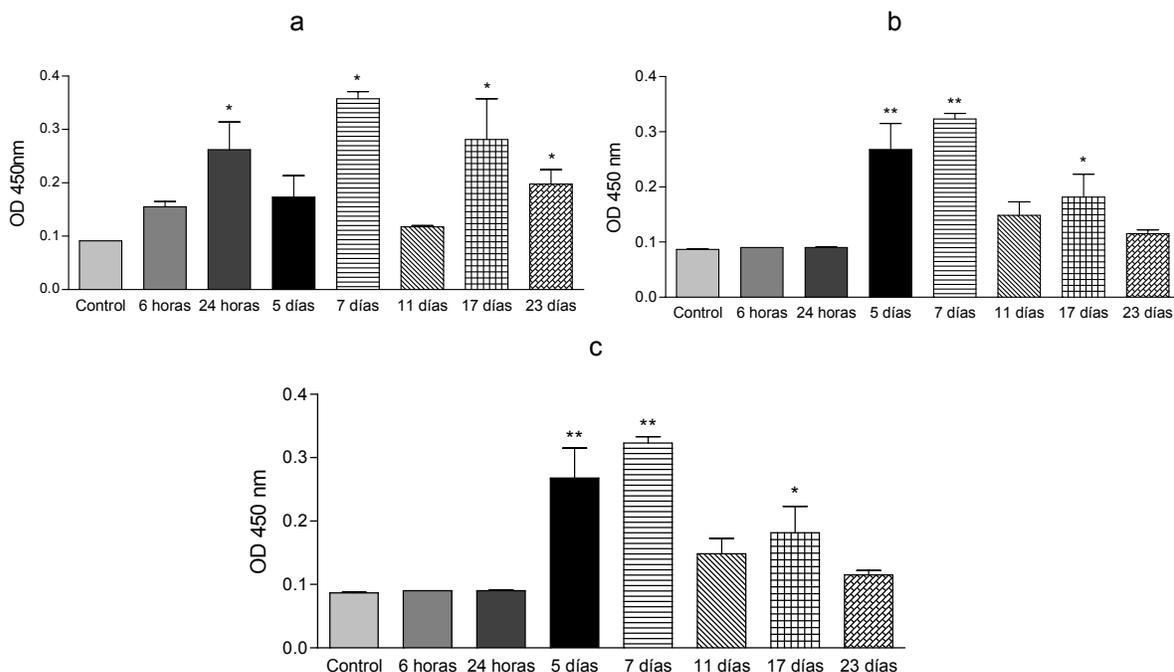


Gráfico 6. Niveles de IgE (a), IgG1 (b) e IgG2a (c) específicos a *Aspergillus fumigatus* encontrados en el suero (1:100) de ratones inmunizados y expuestos por diferentes periodos a las esporas de *Aspergillus fumigatus*. Valores del ELISA representados por la densidad óptica (OD) a 450nm. *(P<0,05) **(P<0,01) Diferencias significativas con respecto al grupo control.

5.4. EFECTO DE LA CANTIDAD DE ESPORAS EN LA INDUCCIÓN DEL CUADRO DE ORVA EN RATONES PREVIAMENTE INMUNIZADOS Y EXPUESTOS POR 7 DÍAS A HENO CON DISTINTOS GRADOS DE CONTAMINACIÓN POR *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

En este experimento se utilizaron cuatro grupos de ocho ratones, los cuales fueron inmunizados con extracto proteico de *Aspergillus fumigatus*. El desafío con las esporas del hongo fue realizado a partir del día 18, exponiéndolos a heno con distintos grados de contaminación esporas. El tiempo de exposición de los grupos fue de 7 días. Los resultados se señalan a continuación.

5.4.1 Efecto de la cantidad de esporas en el porcentaje de neutrófilos de recuento celular diferencial del LBA de ratones previamente inmunizados y expuestos por 7 días a heno con distintos grados de contaminación por *Aspergillus fumigatus*

El gráfico 7 muestra el porcentaje de neutrófilos del LBA, en él se puede observar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de neutrófilos de los grupos experimentales expuestos al heno limpio y los grupos expuestos a heno contaminado con esporas de *Aspergillus fumigatus* calificados en los grados de contaminación I y II. Si evidenciándose un aumento significativo del porcentaje de neutrófilos del LBA en el grupo expuesto al heno contaminado en categoría III.

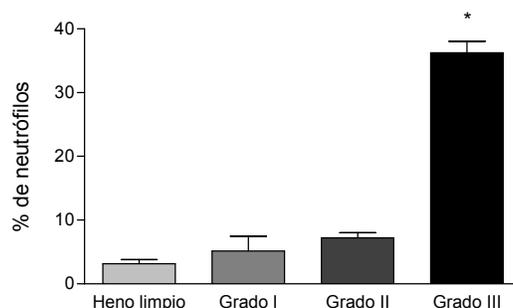


Gráfico 7. Resultados del recuento celular diferencial que indica el porcentaje de neutrófilos del LBA de ratones previamente inmunizados y expuestos por 7 días a heno con distintos grados de contaminación por *Aspergillus fumigatus*.*($P < 0,05$) Diferencias significativas con respecto al grupo expuesto a heno limpio.

5.4.2. Efecto de la cantidad de esporas en los niveles de inmunoglobulinas del LBA de ratones previamente inmunizados y expuestos por 7 días a heno con distintos grados de contaminación por *Aspergillus fumigatus*

El gráfico 8a que muestra los niveles de IgE del LBA realizada a los mismos grupos experimentales antes señalados, indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos expuestos al heno limpio y los expuestos al heno contaminado con esporas de *Aspergillus fumigatus* calificados en los grados de contaminación I y II, sí evidenciándose un aumento estadísticamente significativo en los valores de IgE encontrados en el LBA del grupo expuesto al heno contaminado en categoría III.

Con respecto al los niveles de IgG1 e IgG2a específicos a *Aspergillus fumigatus* encontrados en el LBA y en el suero representados en los gráficos 8b y 8c respectivamente, se puede mencionar que en ambos casos no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales con respecto al grupo expuesto al heno limpio.

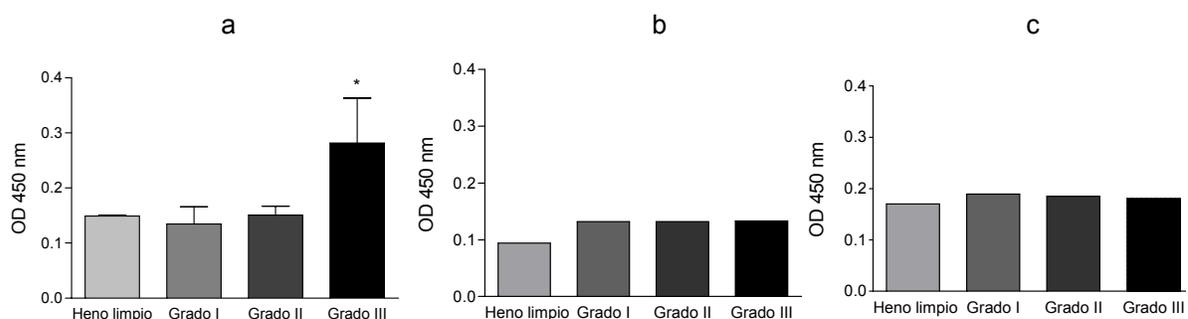


Gráfico 8. Niveles de IgE (a), IgG1 (b) e IgG2a (c) específicos a *Aspergillus fumigatus* encontrados en el LBA (1:1) de ratones previamente inmunizados y expuestos por 7 días a heno con distintos grados de contaminación por *Aspergillus fumigatus*. Valores del ELISA representados por la densidad óptica (OD) a 450nm.*($P < 0,05$) Diferencias significativas con respecto al grupo expuesto a heno limpio.

6. DISCUSIÓN

Como se mencionó con anterioridad, el desarrollo de esta investigación pretendía comprobar que es posible la utilización de la especie murina como base e instrumento científico para el estudio del ORVA equino, generando un modelo controlable en el cual el ratón sea sometido a condiciones similares a las que desencadenan la signología del ORVA en el equino. Para ello fue necesario en una primera etapa determinar los porcentaje de neutrófilos del recuento celular diferencial del lavado broncoalveolar (LBA) de la especie murina, elemento que en la especie equina corresponde a uno de los métodos de diagnóstico de ORVA más utilizados, dada su utilidad en el diagnóstico diferencial entre enfermedades pulmonares infecciosas y alérgicas (Moore y Cox 1996). En relación al LBA murino, éste estudio estableció los porcentaje de neutrófilos (0,63%), linfocitos (0,40%), mastocitos (1,13%) y macrófagos (97,85%), no contabilizando el porcentaje de células epiteliales, dado lo invasiva de la técnica y el excesivo arrastre de dichas células producto de las dimensiones del catéter utilizado en el procedimiento de extracción del LBA. Con respecto a los porcentajes de los tipos celulares antes mencionados presentes en el LBA equino, McGorum y Dixon (1994) señalan porcentajes promedios de 1,00% para neutrófilos, 39,70% de linfocitos, 9,30% de mastocitos y 49,70% de macrófagos.

Al evaluar el efecto de la exposición a las esporas de *Aspergillus fumigatus* en ratones normales, se logró determinar que ésta produjo incrementos significativas tanto del porcentaje de neutrófilos del LBA como de los niveles séricos de IgE específicos a *Aspergillus fumigatus*, afirmando con ello que la inmunización producto de la exposición a las esporas de este hongo es efectiva en los ratones. Por su parte, al momento de evaluar el efecto del tiempo de exposición a las esporas de *Aspergillus fumigatus* en ratones previamente inmunizados con este antígeno, se determinó que el tiempo de exposición mínimo necesario para producir un aumento significativo del porcentaje de neutrófilos del LBA fue de 5 días, alcanzado el máximo porcentaje a los 7 días de exposición. Dichos resultados difieren de los encontrados en el equino, ya que Fairbairn y col (1993) mencionan que ya es posible encontrar altos niveles de neutrófilos en el LBA de caballos clínicamente y experimentalmente afectados con ORVA dentro de las 6 horas posteriores al desafío inhalatorio con heno contaminado. Esta aparente contradicción puede deberse a que en el caso de los equinos con ORVA, el sistema inmune asociado a la mucosa del árbol respiratorio probablemente había tenido muchos más contactos con el hongo, a diferencia del ratón, el cual si bien se encuentra inmunizado en forma sistémica con proteínas de *Aspergillus fumigatus*, las células del sistema inmune residentes en la mucosa respiratoria y el pulmón no han mantenido contacto previo con este alérgeno. Por su parte, Miyamoto y col (2003) mencionan que en ratones y ratas la activación de linfocitos en el tejido pulmonar puede producir cantidades sustanciales de IL-17 y que el efecto de esta interleuquina en el epitelio respiratorio es producir citoquinas que favorecen la infiltración y la actividad de los neutrófilos (Laan y col 1999). Con respecto al equino, Afzali y col (2007) mencionan que IL-8 e IL-17 podrían explicar por si solos la presencia de los neutrófilos en el árbol bronquial de los caballos positivos a ORVA, tal como parece estar

demostrado en ratones y en el asma humano. Otros autores mencionan que el IL-8 juega un rol importante en la modulación de la enfermedad alérgica pulmonar, ya que su efecto sobre las vías aéreas se debe a su capacidad de atraer y activar neutrófilos, estimulando la exositosis de sus gránulos (Barnes y col 1998). Estos efectos explican los hallazgos de Franchini y col (2000) que demostraron un incremento del IL-8 en el LBA de caballos con ORVA y que dicho incremento presentaba una correlación positiva con el aumento del número de neutrófilos. Adicionalmente, Lavoie y col (2000) mencionan que el aumento en los neutrófilos pulmonares es característico de una reacción de hipersensibilidad tipo III que activa la cascada del complemento, causando por esta vía la característica acumulación de neutrófilos en el árbol bronquial, acumulación que también se encuentra siempre presente en el ORVA equino. Por su parte, Fischer y col (2007) mencionan que el característico influjo de neutrófilos en el espacio broncoalveolar durante la exacerbación del ORVA equino se encuentra fuertemente asociado a las citoquinas generadas por las células Th2, clasificando a esta patología como un desorden Th2, dado que las citoquinas relacionadas con estas células como IL-4 e IL-13, incrementan los componentes celulares del LBA durante la exacerbación de la enfermedad. Yamashita y col (2002) también mencionan que la inhalación de *Aspergillus fumigatus* promueve una respuesta Th2. Por su parte Ainsworth y col (2003) indican que los macrófagos alveolares podrían desempeñar un papel importante en la etiopatogenia y en el influjo de neutrófilos al pulmón en el ORVA.

En relación al los niveles de inmunoglobulinas del LBA en ratones previamente inmunizados y expuestos a las esporas, sólo IgE e IgG2a evidenciaron aumentos significativos en sus niveles, siendo en ambas inmunoglobulinas el grupo expuesto por 7 días el que presentó mayores niveles de anticuerpos específicos a *Aspergillus fumigatus*. Por su parte, al evaluar los niveles séricos de las inmunoglobulinas, se logró apreciar que tanto los niveles de IgE como los de IgG1 e IgG2a presentaron sus mayores niveles en el grupo expuesto por 7 días al antígeno, pero alcanzado diferencias significativas con respecto al control a las 24 horas post exposición para IgE y a los 5 días para IgG1 e IgG2a, fenómeno que en ratones no inmunizados y expuestos a las esporas ocurrió a los 23 días de exposición en el caso de la IgE, evidenciado de esta forma que la inmunización vía subcutánea aumenta la susceptibilidad de los animales. Con respecto a ello, un estudio realizado por Kurup y col (1992), menciona que en ratones inmunizados con extracto de *Aspergillus fumigatus* por vía parenteral e intranasal, se producían altos niveles séricos de inmunoglobulinas contra este hongo, particularmente IgE e IgG1, y que dichos niveles de anticuerpos producidos son consistentemente mas elevados después de la inmunización parenteral al compararlos con la vía intranasal. Por otro lado en un modelo murino de aspergillosis broncopulmonar alérgica (ABPA), el mismo autor (Kurup y col 1994^b) reafirma lo antes mencionado al encontrar altos niveles de IgE y eosinófilos, afirmando que las citoquinas juegan un rol importante en la regulación de la inducción de la eosinofilia y de la IgE. En relación a este mismo punto, Chu y col (1996) mencionan que la ABPA en ratones y humanos esta asociada a eosinofilia, y a un incremento en la producción de citoquinas Th2 como IL-4, IL-5 e IL-10 con aumento en los niveles totales y específicos de IgE, IgG1 e IgA. Por otro lado, un estudio en ratones realizado por Finkelman y col (1991) menciona que los fenómenos más importantes de las enfermedades alérgicas, como son el aumento de los niveles de IgE y la eosinofilia después de la administración de antígeno de *Aspergillus fumigatus*, son controlados tanto por IL-4 como por IL-5, citoquinas

predominantemente producida por las células Th2, y que tras la exposición a hongo, serían el IL-4 y IL-5 respectivamente los responsables de la mayor producción de IgE y la eosinofilia (Kurup y col 1994^a). En relación a este mismo punto Bergstedt-Lindqvist y col (1988) señalan que el IL-4 es uno de los mayores inductores de la producción de IgE e IgG1 en el ratón.

Con respecto al equino, uno de los principales fenómenos inmunológicos que explicaría el aumento de las inmunoglobulinas del LBA en el ORVA sería la hipersensibilidad broncopulmonar de tipo I, la cual es mediada en parte importante por inmunoglobulinas de la clase IgE (Hoffman 1999). Pese a que muchos estudios mencionan la participación de reacciones de hipersensibilidad mediadas por IgE en la patogénesis de esta enfermedad (Gerber y col 1982), el rol de estas reacciones es controversial dado los disímiles resultados encontrados en diversos estudios (Lavoie y col 2001). Por ejemplo, Halliwell y col (1993) señalan en uno de sus estudios que los caballos con ORVA muestran altos niveles de IgE en el LBA contra extractos de *Aspergillus fumigatus* en comparación con los controles sanos, no encontrando diferencias significativas en los niveles séricos de esta inmunoglobulina. Similares resultados son los que indican Schmallenbach y col (1998), los cuales también señalan altos niveles de IgE en el LBA de caballos con ORVA, no hallando diferencias en los niveles séricos de esta inmunoglobulina con respecto a los controles sanos. Diferentes resultados fueron señalados por Eder y col (2000), los cuales indicaron que en caballos afectados con ORVA existían altos niveles séricos específicos contra *Aspergillus fumigatus* tanto de IgE como de IgG al ser comparados con controles sanos. En resumen, dichos resultados indican que los valores de IgE específicos a *Aspergillus fumigatus* presentes en el pulmón pueden ser independientes de los valores sistémicos de dicha inmunoglobulina (Schmallenbach y col. 1998). Con respecto a los niveles IgG, Schmallenbach y col. 1998 indican que los niveles específicos a *Aspergillus fumigatus* de esta inmunoglobulina en el LBA de caballos afectados con ORVA eran significativamente mayores que los controles sanos. Los mismos autores no encontraron una correlación significativa en los niveles de IgG en el LBA y en suero. Estos resultados, al igual que como indicaron para la IgE, evidencian que tanto los niveles de esta inmunoglobulina como los de IgG específicos a *Aspergillus fumigatus* encontrados en el pulmón, son independientes de los valores sistémicos de dichas inmunoglobulinas. Por otro lado mencionan que existía una correlación entre los valores de IgE e IgG encontrados en el LBA, no existiendo tal correlación al relacionar los valores séricos de IgE e IgG. En lo que respecta a ésta investigación, es importante mencionar que las diferentes diluciones utilizadas en el ELISA para cuantificar los valores de IgE, IgG1 e IgG2a específicos a *Aspergillus fumigatus* del LBA y suero no permiten correlacionar de manera estadística los resultados y diferencias encontradas entre las inmunoglobulinas antes señaladas, dejando de manifiesto la necesidad de buscar estas correlaciones en posibles estudio futuros.

Finalmente, al momento de evaluar el efecto de la cantidad de esporas en la inducción del cuadro de ORVA en ratones previamente inmunizados y expuestos a heno con distintos grados de contaminación por *Aspergillus fumigatus*, en el presente estudio se determinó que sólo en el grado de contaminación III se observaron diferencias significativas en el porcentaje de neutrófilos y en los niveles de IgE del LBA, no observándose diferencias significativas tanto en los niveles de IgG1 como de IgG2a. Este fenómeno pone de manifiesto la importancia

de esta variable en cualquier futuro modelo murino de ORVA, dado su importante efecto sobre el porcentaje de neutrófilos del LBA.

En conclusión, éste investigación estableció en relación al recuento celular diferencial del LBA murino que:

- En el LBA de ratones normales se encuentra un 0,63% de neutrófilos, 0,40% de linfocitos, 1,13% de mastocitos y un 97,85% macrófagos.
- Para obtener un aumentos significativos del porcentaje de neutrófilos del LBA en ratones normales, estos deben ser expuestos por 23 días a las esporas de *Aspergillus fumigatus*.
- Para obtener en ratones previamente inmunizados aumentos significativos en el porcentaje de neutrófilos del LBA, estos deben se expuestos a las esporas de *Aspergillus fumigatus* por 5 días.
- El aumento del porcentaje de neutrófilos del LBA es dependiente de la cantidad de esporas, determinándose que el grado de contaminación III establecido por el método de Araya y Zaror (1995) produjo aumentos significativos del porcentaje de neutrófilos en relación al grupo control

Con respecto a la respuesta inmune humoral y a las inmunoglobulinas séricas y del LBA, los resultados obtenidos en este estudio permiten concluir:

- La exposición de ratones inmunizados a las esporas de *Aspergillus fumigatus*, produjo aumentos significativos en los niveles de IgE específicos contra este hongo tanto en el LBA como en el suero, fenómeno que en relación a la IgG1 e IgG2a sólo se evidenció a nivel sérico.
- La exposición de ratones normales a las esporas de *Aspergillus fumigatus* sólo mostró efectos significativos en los niveles séricos de IgE específicos a este hongo, aumento presente a los 23 días de exposición a las esporas, no observándose aumentos significativos tanto en los valores séricos como del LBA de IgG1 e IgG2a.
- La exposición a las esporas de *Aspergillus fumigatus*, favorece en el ratón el desarrollo de un cuadro inflamatorio de las vías aéreas de características similares a la de los equinos con ORVA, determinándose que este modelo puede ser utilizado en el futuro para investigar esta importante patología respiratoria de los equinos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abarca ML. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol* 17, S79-S84.
- Afzali B, G Lombardi, RI Lechler, GM Lord. 2007. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 148, 32-46.
- Ainsworth DM, G Grunig, MB Matychak, J Young, B Wagner, HN Erb, DF Antczak. 2003. Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN-gamma and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol* 96, 83-91.
- Araya O, L Zaror. 1995. Determinación de esporas de hongos y ácaros de vida libre en heno y paja de criaderos de caballos chilenos, *Arch Med Vet* 28, 41-45.
- Araya O. 1999. Enfermedades respiratorias crónicas del caballo y su relación con estabulación deficiente en Chile. Curso de afecciones respiratorias en caballos, Hospital Veterinario. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Art T, D Duvivier, D Votion, N Anciaux, S Vandenput, W Bayly, P Lekeux. 1998. Does an acute COPD crisis modify the cardiorespiratory and ventilatory adjustment to exercise in horse? *J Appl Physiol* 84, 845-852.
- Barnes PJ, KF Chung, CP Page. 1998. Inflammatory mediators of asthma: An Update. *Pharmacol Rev* 50, 515-596.
- Bergstedt-Lindqvist S, HB Moon, U Persson, G Möller, C Heusser, E Severinson. 1988. Interleukin 4 instructs uncommitted B lymphocytes to switch to IgG1 and IgE. *Eur J Immunol* 18, 1073-1077.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Céspedes S, E Andrews, H Folch, A Oñate. 2000. Identification and partial characterizations of a new protective antigen of *Brucella abortus*. *J Med Microbiol* 49, 165-70.
- Chu HW, JM Wang, M Boutet, M Laviolette. 1996. Tumor necrosis factor- α and interleukin-1- α expression in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Lab Anim Sci* 46, 42-47.

- Clarke AG, T Madelin. 1987. Technique for assessing respiratory health hazard from hay and other source materials. *Equine Vet J* 19, 442-447.
- Eder C, R Cramer, C Mayer, R Eicher, R Straub, H Gerber, S Lazary, E Marti. 2000. Allergen-specific IgE levels against crude mould and storage mite extracts and recombinant mould allergens in sera from horses affected with chronic bronchitis. *Vet Immunol Immunopathol* 73, 241-253.
- Fairbairn SM, CP Page, P Lees, FM Cunningham. 1993. Early neutrophil but not eosinophil or platelet recruitment to the lungs of allergic horses following antigen exposure. *Clin Exp Allergy* 23, 821-828.
- Finkelman FD, EJ Pearce, JF Urban Jr, A Sher. 1991. Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses. *Immunol Today* 12, A62-66.
- Fischer R, D Tomé, JR McGhee, PN Boyaka. 2007. Th1 and Th2 are required for both eosinophil and neutrophil-associated airway inflammatory response in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 357, 44-49.
- Franchini M, U Gilli, RV Fellenberg, VD Bracher. 2000. Interleukin-8 concentration and neutrophilic hemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay. *Am J Vet Res* 61, 1369-1374.
- Gerberg H. 1989. The genetic basis of some equine disease. *Equine Vet J* 21, 244-248.
- Gerberg H, P Hockenjos, S Lazary, M Kings, A de Weck. 1982. Histamine release from equine leukocytes provoked by fungal allergens. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 89, 267-270.
- Goodley JM, YM Clayton, RJ Hay. 1994. Environmental sampling for aspergilli during building construction on a hospital site. *J Hosp Infect* 26, 27-35.
- Haines J. 1995. *Aspergillus* in compost: straw man or fatal flaw. *Biocycle* 6, 32-35.
- Halliwell REW, PC McGorum, P Irving, PM Dixon. 1993. Local and systemic antibody production in horses affected with chronic pulmonary disease. *Vet Immunol Immunopathol* 38, 201-215.
- Hare JE, L Viel, PM O'Byrne, PD Conlon. 1994. Effect of sodium cromoglycate on light racehorses with elevated metachromatic cell numbers on bronchoalveolar lavage and reduced exercise tolerance. *J Vet Pharmacol Ther* 17, 237-244.
- Hoffmann AM. 1999. Bronchoalveolar lavage technique and cytologic diagnosis of small airway inflammatory disease. *Equine Vet Educ* 11, 330-336.

- Jackson CA, C Berney, AM Jefcoat, NE Robinson. 2000. Environment and prednisone interactions in the treatment of recurrent airway obstruction (heaves). *Equine Vet J* 32, 432-438.
- Kurup VP, A Kumar, WR Kenealy, PA Greenberger. 1994^a. *Aspergillus* ribotoxins react with IgE and IgG antibodies of patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Lab Clin Med* 123, 749-756.
- Kurup VP, H Choi, PS Murali, RL Coffman. 1994^b. IgE and eosinophil regulation in a murine model of allergic aspergillosis. *J Leukoc Biol* 56, 593-598.
- Kurup VP, S Mauze, H Choi, BW Seymour, RL Coffman. 1992. A murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis with elevated eosinophils and IgE. *J Immunol* 148, 3783-3788.
- Laan M, ZH Cui, H Hoshino, J Lötvall, M Sjöstrand, DC Gruenert, BE Skoogh, A Lindén. 1999. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol* 162, 2347-2352.
- Latgé JP. 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 12, 310-350.
- Lavoie JP, K Maghni, M Desnoyers, R Taha, JG Martin, Q Hamid. 2000. Bronchoalveolar cells from horses with "heaves" express a Th2-type cytokine profile. *Proceedings of the Annual Veterinary Medical forum* 18, Pp 751.
- Lavoie JP, K Maghni, M Desnoyers, R Taha, JG Martin, QA Hamid. 2001. Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 1410-1413.
- McGorum B, PM Dixon. 1994. The analysis and interpretation of equine bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology. *Equine Vet Educ* 6, 203-209.
- Mekori YA, DD Metcalfe. 1999. Mast cell-T cell interactions. *J Allergy Clin Immunol* 104, 517-523.
- Miyamoto M, O Prause, M Sjöstrand, M Laan, J Lötvall, A Lindén. 2003. Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. *J Immunol* 170, 4665-4672.
- Moore BR, JH Cox. 1996. Diagnostic use of bronchoalveolar lavage in horses. *Equine Practice* 5, 7-15.
- Moran G, O Araya, H Folch. 2006. Obstrucción recurrente de las vías aéreas del caballo. *Arch Med Vet* 38, 207-217.

- Nolard N. 1994. Les liens entre les risques d'Aspergillose et la contamination de l'environnement. *Revue de la littérature. Path Biol* 42, 706-710.
- Pontón J, MD Moragues, J Gené, J Guarro, G Quindós. 2002. Hongos actinomicetos alergénicos. En *Revista Iberoamericana de Micología* Bilbao, País Vasco, España.
- Robinson NE. 2001. International Workshop on Equine Chronic Airway Disease Michigan State University. *Equine Vet J* 33, 5-19.
- Rush BR, AA Worster, MJ Flmino, CJ Matson, JE Hakala, JR Gillespie. 1998. Pulmonary function in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively. *Am J Vet Res* 59, 1039-1043.
- Schmallenbach KH, I Rahman, HHL Sasse, PM Dixon, REW Halliwell, BC McGorum, R Cramer, HRP Miller. 1998. Studies on pulmonary and systemic *Aspergillus fumigatus*-specific IgE and IgG antibodies in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Vet Immunol Immunopathol* 66, 245-256.
- Tizard I. 1998. *Inmunología Veterinaria*. 5ª ed. McGraw-Hill Interamericana editores, S.A. de C.V. México, D.F.
- Varner AE, WW Busse. 1996. Are you undertreating inflammation in asthma? *J Resp Dis* 17, 656-668.
- Yamashita Y, M Okano, T Yoshino, H Hattori, T Yamamoto, T Watanabe, T Takishita, T Akagi, K Nishizaki. 2002. Carbohydrates expressed on *Aspergillus fumigatus* induce in vivo allergic Th2-type response. *Clin Exp Allergy* 32, 776-782.